

# Thèse de Doctorat

Jessie PÉCOT

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Biologie Cellulaire

Spécialité : Cancérologie

Unité de recherche : CRCNA - U892

Soutenue le 26 octobre 2015

Thèse N° :

## Dépendance des cellules cancéreuses à BCL-xL

Ciblage thérapeutique du réseau d'interactions PUMA, BAX et BCL-xL  
Effets oncogéniques non canoniques de l'interaction RAS / BCL-xL

### JURY

Rapporteurs :	<b>Stephen MANON</b> , Directeur de recherche, Université de Bordeaux 2 <b>Laurent POULAIN</b> , Directeur de recherche, Université de Caen Basse-Normandie
Examineur :	<b>Pierre Germain GILLET</b> , Professeur des universités, Université Claude Bernard Lyon 1
Directeur de Thèse :	<b>Philippe JUIN</b> , Directeur de recherche INSERM, Université de Nantes
Co-directeur de Thèse :	<b>Fabien GAUTIER</b> , Chargé de recherche, Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO) – Université de Nantes

## **Remerciements**

Une thèse n'est pas une aventure que l'on mène seul. C'est pourquoi en premier lieu je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à mes deux directeurs, **Philippe** et **Fabien** qui m'ont si bien accompagnée durant ces années. Fabien, merci de m'avoir enseigné le travail au labo. J'ai été ta première étudiante en thèse, j'espère que tu garderas un bon souvenir de cette première expérience : à quand l'HDR ?! Philippe, merci pour tout ce que tu m'as appris au cours des discussions que nous avons eues, merci pour tes conseils, ta disponibilité, ton enthousiasme et ta capacité à redonner l'envie de toujours aller plus loin. Philippe, Fabien, j'ai apprécié la liberté que vous m'avez laissée tout en étant toujours à mes côtés et le fait que l'on puisse se parler sans détours. J'espère vous avoir communiqué à quel point cela a été un plaisir de travailler avec vous.

Pas de thèse sans jury : aussi, je remercie **Laurent Poulain** et **Stephen Manon** d'avoir accepté d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs, ainsi que **Germain Gillet** pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse.

Je remercie également **Olivier Coqueret** et **Patrick Legembre** pour leur implication dans mes comités de suivi de thèse.

Les résultats présentés dans cette thèse sont issus de mon travail mais aussi de collaborations de différentes natures : internes à l'équipe, nationales et internationales. Aussi je tiens à remercier **Laurent Maillet**, **Céline Séveno**, **Janic Le Pen**, **Sophie de Carné**, **Céline Vuillier**, **Delphine Loussouarn**, **Angelita Rebollo** (UPMC, Paris), **Gordon Tucker** (Servier, Paris) ainsi que **Kristopher Sarosiek** (Letai Lab, Boston) qui ont contribué à l'avancement de mes projets.

Merci à **l'ensemble de l'équipe 8 présente et passée** pour l'ambiance de travail si agréable au quotidien. En particulier, un grand merci à celles et ceux qui ont été bien plus que de simples collègues durant cette thèse : **Céline** (la grande), à cause de toi je ne sais plus « où j'ai mis mes pipettes, mes gants et mes plaques de BRET, oui je sais, je perds tout mais c'que j'veux pas, c'est qu'on se moque de moi ». Grazie mille per tutto ! Lunga vita alla felicità ! **Céline** (la petite), je suis ravie de t'avoir vue évoluer et t'épanouir au labo. Maintenant c'est toi la grande, je te donne le flambeau ! Et n'oublies pas « pour vaincre ta peur, il faut devenir ta peur... ». **Janiiiiic** ! Merci pour *la force* de ton grain de folie, *la puissance* des œuvres d'art sur ma paillasse, *combinées* au concours de cadeaux de vacances kitsch et surtout merciiii pour les paroles de notre chanson\* !!! **Eloïse** merci de m'avoir initiée aux sorties azote, la vierge Eloïse restera à jamais un symbole pour moi.

## Remerciements

---

**Kévin**, je me souviens avec le sourire de ton arrivée au labo, merci pour ta bonne humeur et bon courage pour ta thèse ! **Fred**, merci pour ton enthousiasme au quotidien. Tu sais garder le sourire en toutes circonstances et je t'admire vraiment pour ça. **Cécile**, merci d'avoir veillé au grain sur tes petits doctorants, j'espère que tu es fière de ce que nous devenons ! **La « presque équipe 8 »** : **David**, merci d'avoir répondu à mes interrogations chimiques et d'avoir été mon collègue de rédaction, **Mazène**, merci pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons eues et pour ton ouverture d'esprit. Enfin, mention spéciale à **Quentin**, merci pour ta sympathie et ton humour.

Merci à **Ginette, William & Kate** (merci Janiiiiic !), **St Blot** et **St BRET** (merci Fred Braun !) de m'avoir si bien tenu compagnie sur mon bureau.

Une pensée pour **mes collègues de promo de Master 2** qui sont actuellement en pleine rédaction ou préparation de soutenance : have fun !

Une pensée également pour **mes amis**, qui n'ont pas participé directement à ce travail, mais qui liront peut-être ces remerciements !

Mention spéciale pour **Filoute** : you're the best friend and the best assistant/coach ever (c'est é-vi-dent !). Merci beaucoup pour tout ce que nous avons partagé pendant ces neuf ans. Bon courage pour la fin de ta thèse, I'll be there for you ! (« on le fait ensemble ou on le fait pas ! »)

Merci à **Jojo et Seb** pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble.

Que serai-je sans ma famille ? **Papa, Maman**, merci de m'avoir toujours encouragée et soutenue dans mes choix et merci pour tout ce que nous vivons ensemble. **Fred**, je suis fière de ce que tu es devenu et heureuse de pouvoir partager de bons moments avec toi. Une pensée pour mes grands-parents, **Gaby et Raymond**, j'espère qu'ils auraient été fiers de moi. Spéciale dédicace à **Chilberounet** pour la gron-thérapie ainsi qu'à **BC et Leuleu** (merci **Mamie Marcelle** :-) pour les regonflages.

Mon **Patrick**, j'ai trouvé mon bonheur à tes côtés et cela m'aide chaque jour à avancer, merci pour tout ce que tu m'apportes.

Vous ne figurez pas dans mes remerciements mais vous souhaitez tout de même y être ? Cette rubrique vous est destinée : Je remercie.....de m'avoir fait remarquer qu'il / elle ne figurait pas dans mes remerciements (complétez les pointillés ;- ) .

\* disponible en édition limitée sur certains exemplaires de cette thèse

## **Table des matières**

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>1</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>3</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>10</b>
<b>PREAMBULE</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>13</b>
A.    LE CANCER OU LES CANCERS ?.....	13
I. <i>Caractéristiques des cellules cancéreuses</i> .....	13
II. <i>Hétérogénéité inter et intra-tumorale</i> .....	15
B.    LES MORTS CELLULAIRES.....	18
I. <i>L'autophagie</i> .....	18
II. <i>La nécrose</i> .....	20
III. <i>L'apoptose</i> .....	22
IV. <i>Les morts cellulaires régulent ensemble la destinée de la cellule</i> .....	26
 <b>PROJET 1 : CIBLAGE THERAPEUTIQUE DU RESEAU D'INTERACTIONS PUMA / BAX / BCL-XL</b>	
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>29</b>
A.    REGULATION DE L'APOPTOSE MITOCHONDRIALE PAR LES PROTEINES DE LA FAMILLE DE BCL-2 29	
I. <i>Les protéines de la famille de BCL-2</i> .....	29
II. <i>Mécanismes d'activation des effecteurs BAX et BAK</i> .....	33
III. <i>Régulation de l'apoptose mitochondriale par le réseau d'interactions impliquant la famille de BCL-2</i> .....	37
a.  Interactions entre pro-apoptotiques et anti-apoptotiques.....	37
b.  Pro-apoptotiques effecteurs : BAX et BAK .....	38
c.  Protéines pro-apoptotiques à BH3-seul .....	39
d.  Amorçage mitochondrial (ou priming).....	43
IV. <i>Régulation de l'activité des effecteurs BAX et BAK indépendamment de la famille de BCL-2</i> .....	45
V. <i>Régulation de l'activité des membres de la famille de BCL-2 par des modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles</i> .....	46
B.    CIBLAGE THERAPEUTIQUE DU RESEAU DYNAMIQUE IMPLIQUANT LES PROTEINES DE LA FAMILLE DE BCL-2 .....	48
I. <i>Structure des interactions entre anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille de BCL-2</i> .....	48
II. <i>Développement et utilisation de BH3-mimétiques pour le ciblage des anti-apoptotiques</i> .....	49
III. <i>Limites à l'utilisation des BH3-mimétiques</i> .....	51

## Table des matières

---

IV. Nouvelles stratégies de ciblage du réseau BCL-2 .....	52
V. Vers une meilleure compréhension du réseau BCL-2 pour un meilleur ciblage en thérapie .....	53
a. Vers une meilleure définition du domaine d'interaction entre anti et pro-apoptotiques .	53
b. Développement du ciblage de BCL-xL .....	54
c. Vers la compréhension des mécanismes de résistance induits par BCL-xL .....	55
C. OBJECTIFS DU PROJET 1 .....	57
<b>RESULTATS .....</b>	<b>59</b>
<b>ETUDE DU RESEAU D'INTERACTIONS BCL-XL / BAX / PUMA.....</b>	<b>59</b>
A. ARTICLE : "REFRACTORY INTERACTIONS BETWEEN BCL-xL AND PUMA IN LIVE CANCER CELLS UNDERMINE BH3 MIMETICS EFFICIENCY" .....	61
B. PUMA INTERAGIT AVEC BCL-xL VIA SON DOMAINE BH3 .....	104
C. PUMA MODIFIE LES PROPRIETES DE L'INTERACTION BAX / BCL-xL.....	106
D. ETUDE DE L'INTERACTION BAX / PUMA .....	111
E. COMMENT PREDIRE LA REPONSE DES CELLULES AUX BH3-MIMETIQUES ? .....	114
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>119</b>
A. PUMA MODULE LES INTERACTIONS BAX / BCL-xL .....	119
B. BCL-xL CONTRECARRE LES EFFETS DES BH3-MIMETIQUES.....	120
C. LA NATURE DES INTERACTIONS MISES EN JEU PAR BCL-xL DETERMINE LA SENSIBILITE DES CELLULES CANCEREUSES AUX BH3-MIMETIQUES.....	120
D. BCL-xL CONTRECARRE LA MORT CELLULAIRE INDUITE PAR PUMA .....	121
E. LES INTERACTIONS BAX / BCL-xL ET PUMA / BCL-xL NE SONT PAS CIBLEES AVEC LA MEME EFFICACITE PAR LES BH3-MIMETIQUES. ....	123
F. ROLE DES MEMBRANES MITOCHONDRIALES.....	125
G. COMMENT PREDIRE LA SENSIBILITE DES CELLULES AUX BH3-MIMETIQUES ? .....	127
<b>PROJET 2 : EFFETS ONCOGENIQUES NON CANONIQUES DE L'INTERACTION RAS / BCL-XL</b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>129</b>
A. FONCTIONS NON CANONIQUES DES PROTEINES DE LA FAMILLE DE BCL-2.....	129
I. <i>Localisations subcellulaires des protéines de la famille de BCL-2.....</i>	<i>130</i>
II. <i>Interactions non canoniques.....</i>	<i>131</i>
III. <i>Implication des interactions dans des fonctions non-canoniques .....</i>	<i>132</i>
a. Modulation de la réponse inflammatoire .....	132
b. Régulation de l'homéostasie calcique .....	132
c. Régulation transcriptionnelles de voies oncogéniques .....	133
d. Réparation de l'ADN .....	133
e. Rôle de protéine d'échafaudage .....	134
B. L'ONCOGENE RAS .....	134
I. <i>La signalisation RAS.....</i>	<i>135</i>

II.	<i>Isoformes de RAS</i> .....	138
III.	<i>Tumorigenèse induite par RAS</i> .....	139
IV.	<i>Stratégies de ciblage de RAS en thérapie</i> .....	140
a.	Ciblage de l'activité GTPase de RAS .....	140
b.	Inhibition de l'adressage membranaire .....	141
c.	Inhibition de l'expression de RAS .....	142
d.	Ciblage des voies de signalisation induites par RAS.....	142
e.	Approches de létalité synthétique .....	144
C.	L'INTERACTION RAS / BCL-xL COMME CIBLE THERAPEUTIQUE ? .....	146
D.	OBJECTIFS DU PROJET 2 DE THESE .....	147
<b>RESULTATS</b>	.....	<b>149</b>
A.	K-RAS INTERAGIT AVEC BCL-xL EN CELLULE ENTIERE VIVANTE .....	149
I.	<i>Mise au point d'un modèle de mesure des interactions K-RAS/BCL-xL en cellule entière par BRET</i> .....	149
II.	<i>Les deux isoformes de K-RAS interagissent avec BCL-xL</i> .....	151
III.	<i>BCL-xL interagit préférentiellement avec RAS activé</i> .....	152
B.	IDENTIFICATION DES DOMAINES D'INTERACTION ENTRE K-RAS ET BCL-xL PAR UNE APPROCHE DE PEP-SCAN.....	156
I.	<i>Identification de domaines d'interaction de RAS sur BCL-xL</i> .....	156
II.	<i>Identification de domaines d'interaction de BCL-xL sur RAS</i> .....	158
C.	IDENTIFICATION DE COMPOSES INHIBITEURS DE L'INTERACTION K-RAS / BCL-xL PAR UNE APPROCHE DE CIBLAGE .....	159
I.	<i>Criblage de la Chimiothèque Nationale Essentielle</i> .....	159
II.	<i>Evaluation du caractère concentration-dépendant de la réponse aux molécules sélectionnées</i> .....	162
III.	<i>Validation fonctionnelle de la molécule 14</i> .....	163
a.	La molécule 14 modifie la capacité de K-RAS à interagir avec ses effecteurs .....	164
b.	La molécule 14 module la voie de signalisation RAF1-MEK-ERK .....	165
c.	La molécule 14 affecte la prolifération cellulaire .....	166
d.	La molécule 14 diminue la capacité de cellules mammaires isolées à former des sphères.....	167
e.	Certaines tumeurs mammaires sont sensibles à la molécule 14 ex-vivo.....	168
<b>DISCUSSION</b>	.....	<b>171</b>
A.	K-RAS INTERAGIT AVEC BCL-xL EN CELLULE ENTIERE VIVANTE .....	171
B.	IDENTIFICATION DE DOMAINES D'INTERACTION PAR UNE APPROCHE DE PEP-SCAN .....	173
C.	IDENTIFICATION DE COMPOSES INHIBITEURS DE L'INTERACTION K-RAS/BCL-xL PAR UNE APPROCHE DE CIBLAGE .....	174
I.	<i>Effets de M14 sur les fonctions de RAS</i> .....	174
II.	<i>Effets de M14 sur les fonctions de BCL-xL ?</i> .....	176
III.	<i>Poursuite du développement de M14 ?</i> .....	177

## Table des matières

---

D. CONCLUSION .....	178
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>179</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>181</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>197</b>

## ***Table des figures***

<b>FIGURE 1 : STRATEGIES THERAPEUTIQUES DE CIBLAGE DES CARACTERISTIQUES DES CELLULES CANCEREUSES.....</b>	<b>14</b>
<b>FIGURE 2 : COMPLEXITE DU TISSU TUMORAL .....</b>	<b>15</b>
<b>FIGURE 3 : PROMOTION DE L'HETEROGENEITE DES CELLULES CANCEREUSES AU SEIN DE LA TUMEUR .....</b>	<b>16</b>
<b>FIGURE 4 : IMPORTANCE DU CIBLAGE DES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES (CSC) POUR LA REGRESSION TUMORALE COMPLETE.....</b>	<b>17</b>
<b>FIGURE 5 : BASES MOLECULAIRES DE L'AUTOPHAGIE .....</b>	<b>20</b>
<b>FIGURE 6 : BASES MOLECULAIRES DE LA NECROSE.....</b>	<b>22</b>
<b>FIGURE 7 : BASES MOLECULAIRES DE L'APOPTOSE .....</b>	<b>24</b>
<b>FIGURE 8 : L'APOPTOSE, L'AUTOPHAGIE ET LA NECROSE REGULENT ENSEMBLE LA DESTINEE CELLULAIRE.....</b>	<b>27</b>
<b>FIGURE 9 : STRUCTURE DES PROTEINES DE LA FAMILLE DE BCL-2.....</b>	<b>30</b>
<b>FIGURE 10 : CONTROLE DE LA PERMEABILISATION DE LA MEMBRANE EXTERNE MITOCHONDRIALE (MOMP) PAR LES PROTEINES DE LA FAMILLE DE BCL-2.....</b>	<b>32</b>
<b>FIGURE 11 : DECLENCHEMENT DE LA MOMP PAR BAX ET BAK .....</b>	<b>34</b>
<b>FIGURE 12 : CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS DE BAX LORS DE SON ACTIVATION DURANT L'APOPTOSE. ....</b>	<b>35</b>
<b>FIGURE 13 : STRUCTURE 3D DES INTERACTIONS ENTRE PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES ET PRO-APOPTOTIQUES DE LA FAMILLE DE BCL-2 : EXEMPLE DE L'INTERACTION BCL-XL / BAK.....</b>	<b>37</b>
<b>FIGURE 14 : RESEAU D'INTERACTIONS DECRITES ENTRE LES PROTEINES DE LA FAMILLE DE BCL-2 .....</b>	<b>38</b>
<b>FIGURE 15 : ISOFORMES DE PUMA .....</b>	<b>42</b>
<b>FIGURE 16 : L'AMORÇAGE MITOCHONDRIAL (PRIMING) DETERMINE LA REPONSE CELLULAIRE A UN SIGNAL PRO-APOPTOTIQUE.....</b>	<b>44</b>
<b>FIGURE 17 : STRUCTURE DES INTERACTIONS ANTI-APOPTOTIQUES / PRO-APOPTOTIQUES .....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURE 18 : BH3-MIMETIQUES DEVELOPPES POUR LE CIBLAGE DE BCL-2 ET BCL-XL.....</b>	<b>51</b>
<b>FIGURE 19 : POSSIBLES MODES DE REGULATION DE LA MOMP PAR LES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES DE LA FAMILLE DE BCL-2.....</b>	<b>56</b>
<b>FIGURE 20 : PRINCIPE DU BRET (BIOLUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER)...</b>	<b>60</b>



<b>FIGURE 21 : LE DOMAINE BH3 DE PUMA INTERAGIT AVEC BCL-XL .....</b>	<b>105</b>
<b>FIGURE 22 : LE COUPLE BAX(BH3PUMA) / BCL-XL EST SENSIBLE AUX BH3-MIMETIQUES. 106</b>	<b>106</b>
<b>FIGURE 23 : PUMA MODIFIE LES PROPRIETES DU COMPLEXE RLUC-BAX / EYFP-BCL-XL . 107</b>	<b>107</b>
<b>FIGURE 24 : L'ETOPOSIDE AUGMENTE L'EXPRESSION DES PRO-APOPTOTIQUES A BH3-SEUL PUMA ET BIM .....</b>	<b>108</b>
<b>FIGURE 25 : L'ETOPOSIDE MODIFIE LES PROPRIETES DU COMPLEXE RLUC-BAX / EYFP-BCL-XL INDEPENDAMMENT DE PUMA .....</b>	<b>110</b>
<b>FIGURE 26 : PUMA NE MODIFIE PAS LA CAPACITE DU COMPLEXE RLUC-BAX / EYFP-BCL-XL A REpondre AUX BH3-MIMETIQUES.....</b>	<b>111</b>
<b>FIGURE 27 : LES INTERACTIONS RLUC-PUMA / EYFP-BAX ET RLUC-BAX / EYFP-PUMA SONT DETECTABLES PAR CO-IMMUNOPRECIPITATION.....</b>	<b>112</b>
<b>FIGURE 28 : BCL-XL MODULE LES INTERACTIONS BRET ENTRE PUMA ET BAX.....</b>	<b>113</b>
<b>FIGURE 29 : L'INTERACTION PUMA / BAX DETECTEE PAR BRET EST SENSIBLE AUX BH3-MIMETIQUES.....</b>	<b>114</b>
<b>FIGURE 30 : UNE SUREXPRESSION DE BCL-XL AUGMENTE L'EXPRESSION DE BIM .....</b>	<b>115</b>
<b>FIGURE 31 : BCL-XL N'INFLUENCE PAS L'EXPRESSION DE BIM ET DE PUMA.....</b>	<b>116</b>
<b>FIGURE 32 : LES CELLULES SUREXPRIMANT BCL-XL EXPRIMENT MOINS DE BCL-2.....</b>	<b>117</b>
<b>FIGURE 33 : BCL-XL ET PUMA REGULENT L'EXPRESSION DU GENE BCL-2 .....</b>	<b>118</b>
<b>FIGURE 34 : PUMA REGULE L'EXPRESSION DE BCL-2.....</b>	<b>118</b>
<b>FIGURE 35 : LES INTERACTIONS PUMA / BCL-XL DIMINUENT L'EFFICACITE DES BH3-MIMETIQUES.....</b>	<b>122</b>
<b>FIGURE I : FONCTIONS CANONIQUES ET NON CANONIQUES EXERCEES PAR LES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES DE LA FAMILLE DE BCL-2 .....</b>	<b>129</b>
<b>FIGURE II : LA SIGNALISATION RAS .....</b>	<b>137</b>
<b>FIGURE III : MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE L'EXTREMITÉ C-TERMINALE DE RAS PERMETTANT L'ADRESSAGE AUX MEMBRANES CELLULAIRES .....</b>	<b>139</b>
<b>FIGURE IV : INHIBITEURS DE LA SIGNALISATION RAS .....</b>	<b>145</b>
<b>FIGURE V : RLUC-K-RAS ET EYFP-BCL-XL INTERAGISSENT EN CELLULE ENTIERE .....</b>	<b>150</b>
<b>FIGURE VI : LES ISOFORMES K-RAS4A ET K-RAS4B INTERAGISSENT AVEC BCL-XL .....</b>	<b>152</b>
<b>FIGURE VII : LA MUTATION V12 ACTIVATRICE MODIFIE LA CAPACITE DE LIAISON DE RAS A BCL-XL.....</b>	<b>153</b>
<b>FIGURE VIII : BCL-XL STABILISE RAS SOUS FORME ACTIVE.....</b>	<b>155</b>

---

<b>FIGURE IX : BCL-XL FAVORISE LES INTERACTIONS DE RAS AVEC SON EFFECTEUR RAF1156</b>	
<b>FIGURE X : IDENTIFICATION DE DOMAINES D'INTERACTION DE RAS SUR BCL-XL PAR PEP-SCAN.....</b>	<b>157</b>
<b>FIGURE XI : IDENTIFICATION DE DOMAINES D'INTERACTION DE BCL-XL SUR RAS PAR PEP-SCAN.....</b>	<b>159</b>
<b>FIGURE XII : SELECTION DE MOLECULES MODULATRICES DE L'INTERACTION K-RAS/BCL-XL SUITE AU CRIBLAGE PAR BRET DE LA CHIMIOTHEQUE NATIONALE ESSENTIELLE .....</b>	<b>161</b>
<b>FIGURE XIII : VALIDATION DES MOLECULES 7 ET 14 COMME MODULATRICES DE L'INTERACTION K-RAS/BCL-XL .....</b>	<b>163</b>
<b>FIGURE XIV : LA MOLECULE 14 MODULE LA CAPACITE DE K-RAS A INTERAGIR AVEC SON EFFECTEUR RAF1.....</b>	<b>165</b>
<b>FIGURE XV : LA MOLECULE 14 MODULE LA VOIE DE SIGNALISATION RAF1-MEK-ERK INDUITE PAR RAS .....</b>	<b>166</b>
<b>FIGURE XVI : LA MOLECULE 14 DIMINUE LA PROLIFERATION CELLULAIRE .....</b>	<b>167</b>
<b>FIGURE XVII : LA MOLECULE 14 DIMINUE LA CAPACITE DE CELLULES MAMMAIRES ISOLEES A FORMER DES SPHERES.....</b>	<b>168</b>
<b>FIGURE XVIII : CERTAINES TUMEURS MAMMAIRES REPONDENT A UN TRAITEMENT EX VIVO PAR LA MOLECULE 14.....</b>	<b>169</b>

## ***Liste des abréviations***

ABT-199 : ABbott compound n°199	HRK : Harakiri
ABT-263 : ABbott compound n°263	IP : Immuno-Precipitation
ABT-737 : ABbott compound n°263	IP3R : Inositol triphosphate Receptor
ATP : Adenosine TriPhosphate	kDa : kilo Dalton
BAD : BCL-2 Associated Death promoter	MCL-1 : Myeloid Cell Leukemia-1
BAK : BCL-2 Antagonist/Killer 1	MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
BAX : BCL-2 Associated X protein	MYC : myelocytomatosis oncogene
BCL-2 : B Cell Lymphoma-2	p53 : tumor protein p53
BCL-2A1 (BFL-1) : BCL-2 related protein A1	PARP : Poly ADP Ribose Polymerase
BCL-w : BCL-2 Like 2	PBS : Phosphate Buffer Saline
BCL-xL : B-Cell Lymphoma-extra Large	PI3K : Phospholinositide 3-Kinase
BH : BCL-2 Homology domain	PUMA : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
BID : BH3 Interacting Domain death agonist	RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
BIM : BCL-2 Interacting Mediator of cell death	RAS : RAt Sarcoma
BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfert	RE : Réticulum Endoplasmique
BSA : Bovine Serum Albumin	RLuc : Renilla Luciférase
CASPASE : CysteinyL-ASPartate-cleaving protease	SVF : Sérum de Veau Fœtal
CNE : Chimiothèque Nationale Essentielle	TM : TransMembrane Domain
EGF : Epithelial Growth Factor	VDAC : Voltage Dependent Anion Channel
ER : Endoplasmic Reticulum	WEHI-539 : Walter and Eliza Hall Institute of medical research compound n°539
ERK : Extracellular signal Regulated Kinase	
eYFP : enhanced Yellow Fluorescent Protein	
GAP : Guanosine triphosphatase Activating Protein	
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor	
GDP : Guanosine DiPhosphate	
GTP : Guanosine triPhosphate	
HCT : Human ColorecTal Carcinoma	

## **Préambule**

*BCL-xL est une protéine anti-apoptotique de la famille de BCL-2 participant à la régulation de l'apoptose mitochondriale. Elle est fréquemment surexprimée dans les cancers et est impliquée dans la résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies. Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur deux projets de recherche étudiant les mécanismes de **dépendance des cellules cancéreuses à BCL-xL pour leur survie** :*

Mon **premier projet de thèse** a porté sur l'étude d'**interactions canoniques** décrites entre BCL-xL et d'autres protéines de la famille de BCL-2. Ainsi, nous avons développé une approche basée sur l'utilisation du BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) pour étudier les interactions en cellule entière vivante entre les protéines **PUMA, BAX et BCL-xL**. L'objectif a été de comprendre comment fonctionne ce réseau dynamique d'interactions afin de mieux le cibler dans un contexte thérapeutique. Nous avons montré que des molécules BH3-mimétiques inhibitrices de BCL-xL restent inefficaces à antagoniser certaines interactions impliquant BCL-xL et participant à la survie des cellules cancéreuses. Cette étude souligne l'importance de la compréhension du rôle joué par le réseau d'interactions impliquant BCL-xL dans le contexte du développement tumoral.

*La vision selon laquelle les protéines de la famille de BCL-2 sont uniquement impliquées dans la régulation de l'apoptose mitochondriale est restrictive. Des travaux suggèrent que BCL-xL est capable de moduler des fonctions cellulaires qui vont au-delà de la régulation de l'apoptose, impliquant des interactions avec des protéines n'appartenant pas à la famille de BCL-2, dites non-canoniques.*

Dans ce contexte, mon **second projet de thèse** a été consacré à l'étude des conséquences fonctionnelles de l'**interaction non canonique entre BCL-xL et l'oncogène RAS** qui demeurent largement inconnues bien que des travaux lui attribuent des effets oncogéniques. Pour ce faire, dans la continuité de mon Master 2, nous avons développé des approches de BRET et de pep-scan en vue d'identifier des molécules capables de moduler la liaison de RAS à BCL-xL, constituant ainsi un outil d'étude pour une meilleure compréhension de cette interaction d'un point de vue structurel et fonctionnel.



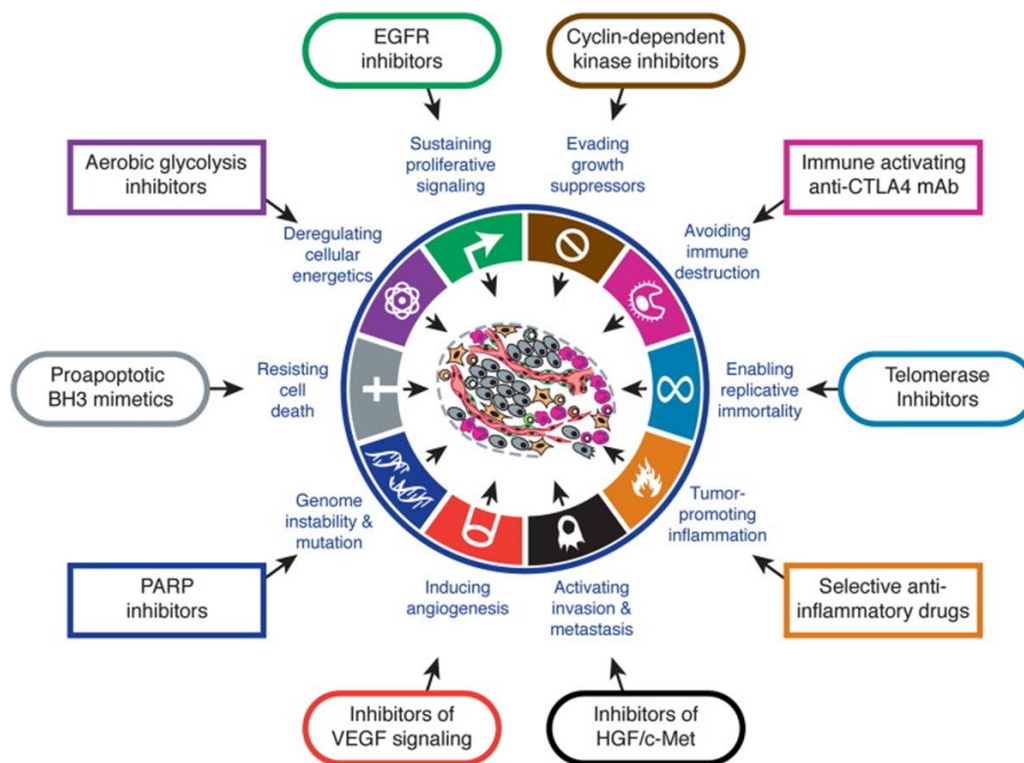
## ***Introduction générale***

### **A. Le cancer ou les cancers ?**

Le cancer est une maladie décrite pour la première fois dans l'Antiquité par le médecin grec Hippocrate (460-377 av. J.-C.). Ce dernier mit alors en évidence des différences entre des cellules malignes (cancer) et bénignes (normales) et donna le nom grec de « karkinos » (cancer) à des tumeurs malignes cutanées dont la forme ressemblait à celle d'un crabe. De nos jours, cette pathologie est toujours bien présente : en France, 350 000 nouveaux cas de cancer sont recensés chaque année (Institut National du Cancer, 2014). Le cancer se caractérise par une multiplication anarchique de cellules échappant aux processus normaux de croissance et de différenciation. D'un point de vue thérapeutique, le terme cancer désigne un ensemble de maladies ayant des caractéristiques communes mais très distinctes les unes des autres en terme de réponse aux traitements. Il n'existe donc pas un cancer mais des cancers.

#### **I. Caractéristiques des cellules cancéreuses**

En 2000, Hanahan et Weinberg ont proposé un modèle selon lequel les cellules cancéreuses, tous cancers confondus, possèdent six caractéristiques en commun leur permettant d'échapper au contrôle par l'organisme : une perte de contrôle du cycle cellulaire, une autosuffisance en signaux de croissance, une insensibilité à l'apoptose, une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, la présence d'une angiogenèse soutenue et l'acquisition de propriétés invasives (Hanahan et Weinberg, 2000). Ce modèle a été complété en 2011 (**figure 1**) par l'ajout de nouvelles caractéristiques de mieux en mieux décrites dans la littérature : la résistance aux cellules immunitaires, la reprogrammation métabolique, une importante instabilité génétique ainsi que la présence d'un environnement inflammatoire au niveau du tissu tumoral.



**Figure 1 : Stratégies thérapeutiques de ciblage des caractéristiques des cellules cancéreuses.**

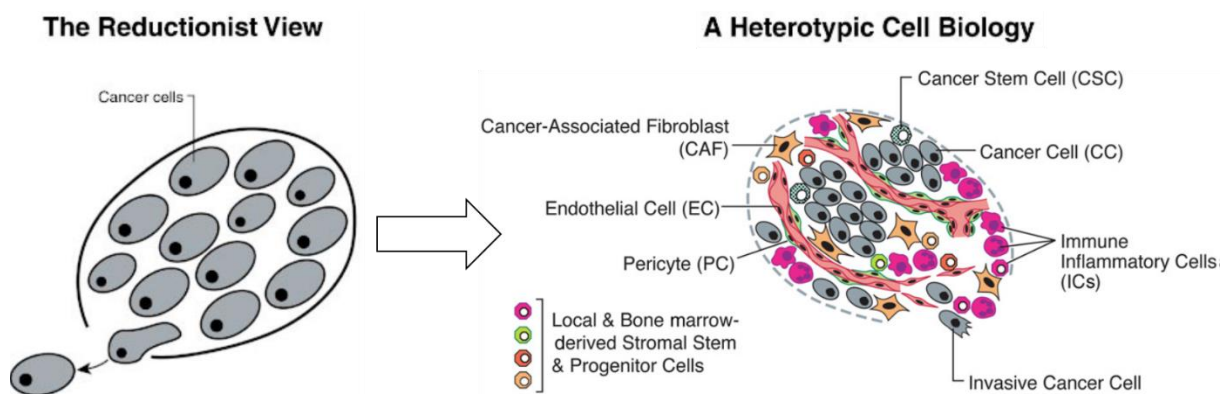
Exemples de molécules développées dans le but de cibler les propriétés des cellules tumorales (d'après Hanahan et Weinberg, 2011)

La classification des caractéristiques propres aux cellules cancéreuses a permis le développement d'approches thérapeutiques ciblées illustrées **figure 1**. Cependant, certains cancers résistent à toute forme de traitement actuelle et on compte encore 150 000 décès par cancer chaque année en France (Institut National du Cancer, 2014). Il paraît donc essentiel de comprendre les mécanismes conférant une résistance des cellules aux thérapies. Les différentes caractéristiques décrites ci-dessus ne sont pas indépendantes les unes des autres. En effet, des acteurs clés de la tumorigenèse peuvent être impliqués dans divers processus associés les uns aux autres. Ceci est à l'image de BCL-xL, une protéine anti-apoptotique de la famille de BCL-2 que nous étudions au laboratoire : il a été décrit que cette protéine joue un rôle dans des phénomènes tels que la résistance à la mort cellulaire (Minn et al., 1995), l'invasion (Weiler et al., 2006) ou encore la prolifération (Bonney-Berard et al., 2004). La considération de l'implication de ces acteurs dans ces différents phénomènes est indispensable à la compréhension des résistances aux traitements et des effets secondaires associés.

## II. Hétérogénéité inter et intra-tumorale

Il existe plus de cent types de cancers et des sous-types tumoraux existent pour chaque organe touché. De plus, plusieurs types cellulaires composent chaque tumeur. Cette complexité pose un certain nombre de questions : quelles dérégulations permettent à chaque type de cellule de devenir cancéreux ? Existe-t-il des dérégulations communes à toutes les cellules cancéreuses ? Comment expliquer que toutes les cellules constituant une seule et même tumeur ne répondent pas de façon équivalente à un traitement donné ? Quelle est la part de l'environnement tissulaire et du microenvironnement tumoral dans le développement du cancer ?

Le tissu tumoral a longtemps été appréhendé comme une structure simple, uniquement composée de cellules cancéreuses. Or, en réalité, une tumeur comporte également d'autres types cellulaires, constituant le microenvironnement tumoral (Bissell and Radisky, 2001). Le microenvironnement tumoral est constitué de fibroblastes associés au cancer (CAF = Cancer Associated Fibroblast), de cellules endothéliales, de péricytes ainsi que de cellules immunitaires participant à l'acquisition d'un contexte inflammatoire et de propriétés invasives (**figure 2**).



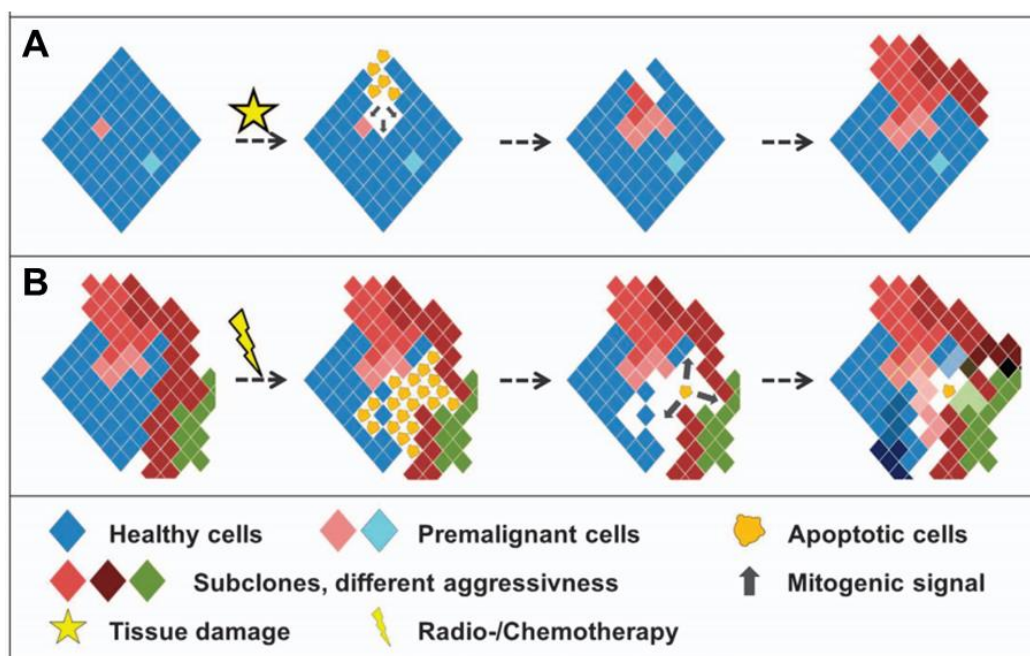
**Figure 2 : Complexité du tissu tumoral**

La tumeur, longtemps perçue comme une structure constituée uniquement de cellules cancéreuses comporte en réalité d'autres types cellulaires (constituant le microenvironnement tumoral) participant à l'acquisition des caractéristiques de la tumeur (modifié d'après Hanahan and Weinberg, 2011).

Un autre degré d'hétérogénéité réside entre les cellules cancéreuses elles-mêmes, qui constituent une population hétérogène au sein de la tumeur (Meacham and Morrison, 2013). Au cours de la tumorigenèse et en absence de thérapie anti-



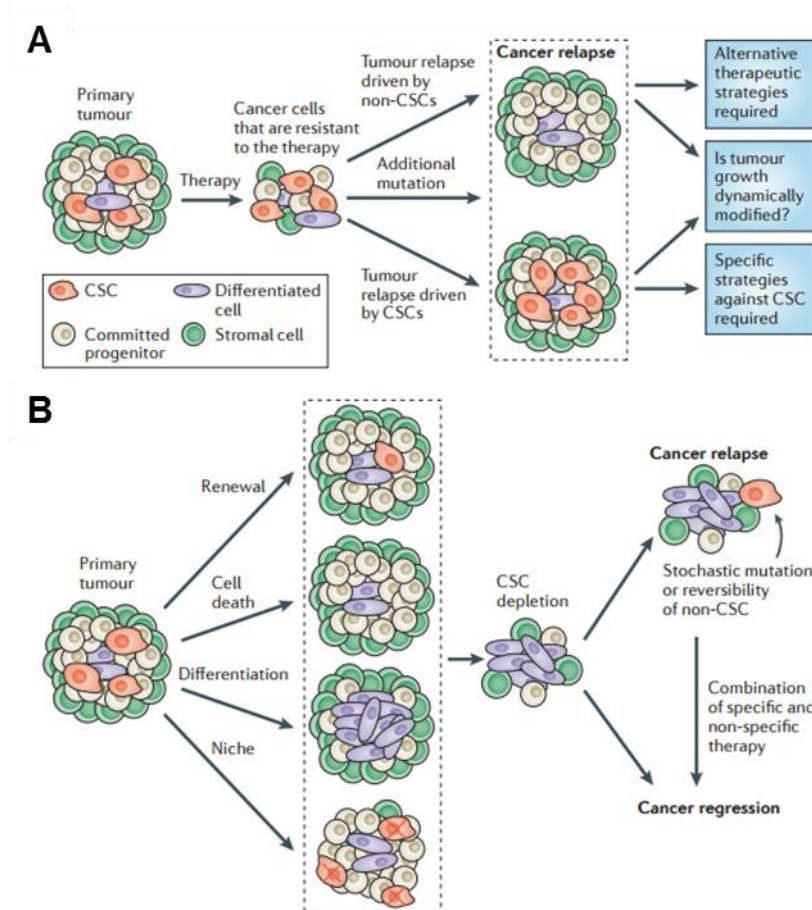
tumorale, plusieurs phénomènes concourent à l'émergence de sous populations distinctes. L'accumulation de dommages cellulaires, combinée à l'hyper-prolifération cellulaire et à l'instabilité génétique promeut la formation de sous-populations distinctes (Kreso and Dick, 2014). Ces sous-populations, bien que présentes au cœur d'une même entité tumorale, ont des propriétés différentes en termes de prolifération, de résistance à la mort, d'invasion etc. Un traitement par radiothérapie ou chimiothérapie sur une tumeur établie va provoquer l'apoptose des cellules cancéreuses les plus sensibles. En mourant, ces dernières vont libérer des facteurs pro-prolifératifs, ce qui induit la prolifération des cellules avoisinantes ainsi que l'émergence de clones résistants (**figure 3**).



**Figure 3 : Promotion de l'hétérogénéité des cellules cancéreuses au sein de la tumeur**  
**(A)** Dans des tissus sains ayant des cellules endommagées, une seconde agression provoque la mort des cellules les plus sensibles. Il s'en suit une prolifération importante des cellules avoisinantes et l'émergence de clones tumoraux ayant divers degrés d'agressivité. **(B)** Dans des tumeurs établies, les traitements radio ou chimio-thérapeutiques induisent l'apoptose des cellules les plus sensibles. Celles-ci libèrent des facteurs pro-mitogènes, provoquant ainsi la prolifération des clones résistants (d'après Labi and Erlacher, 2015)

L'hétérogénéité des cellules cancéreuses présentes dans une tumeur réside également dans leur capacité à initier ou non des cancers. En effet, de nombreux travaux ont mis en évidence l'existence d'une population particulière au sein de chaque tumeur, la seule capable d'initier et de promouvoir la croissance tumorale : les cellules souches cancéreuses (CSC) ou cellules initiatrices de cancer (CIC)

(Makino, 1959). Ce type de cellules représenté en faible proportion dans la tumeur tend à résister aux traitements conventionnels. Ceci est probablement dû à ses propriétés de quiescence. Néanmoins, ces cellules ont la capacité de reformer une tumeur hétérogène (Gómez-López et al., 2014) après un traitement. Plusieurs stratégies tendent à se développer afin de mieux caractériser et cibler ces cellules, car ce sont elles qui sont responsables des rechutes après traitements (**figure 4**).



**Figure 4 : Importance du ciblage des cellules souches cancéreuses (CSC) pour la régression tumorale complète**

(A) Les thérapies ne ciblent pas toutes les cellules tumorales avec la même efficacité. Des cellules souches cancéreuses (CSC) ou des cellules peu prolifératives peuvent être responsables d'une résistance de la tumeur aux traitements. De nouvelles stratégies doivent être développées afin d'éradiquer ces populations et d'empêcher ainsi les rechutes. (B) Le modèle de CSC suggère plusieurs stratégies ciblant les CSC et visant l'induction d'une régression tumorale. Ces stratégies passent par l'induction de la mort des CSC, l'inhibition de leur prolifération, l'induction de leur différenciation ou encore le ciblage de leur niche tumorale. Cependant, bien que le statut de CSC soit réversible, de nouvelles mutations peuvent apparaître et conférer à nouveau une résistance aux thérapies. La régression tumorale a lieu alors uniquement de façon transitoire, avant un échappement. (D'après Beck and Blanpain, 2013)

## B. Les morts cellulaires

La mort cellulaire est un phénomène biologique normal présent dans tout organisme vivant. Elle participe à des processus physiologiques essentiels tels que le développement de l'embryon, le contrôle de l'homéostasie des populations cellulaires ou l'établissement d'une immunité efficace. Elle est donc indispensable à la survie de l'organisme. Cependant, une mort cellulaire excessive est néfaste et peut participer au développement de pathologies telles que les maladies neurodégénératives. À l'opposé, l'incapacité des cellules à mourir explique la survenue des cancers.

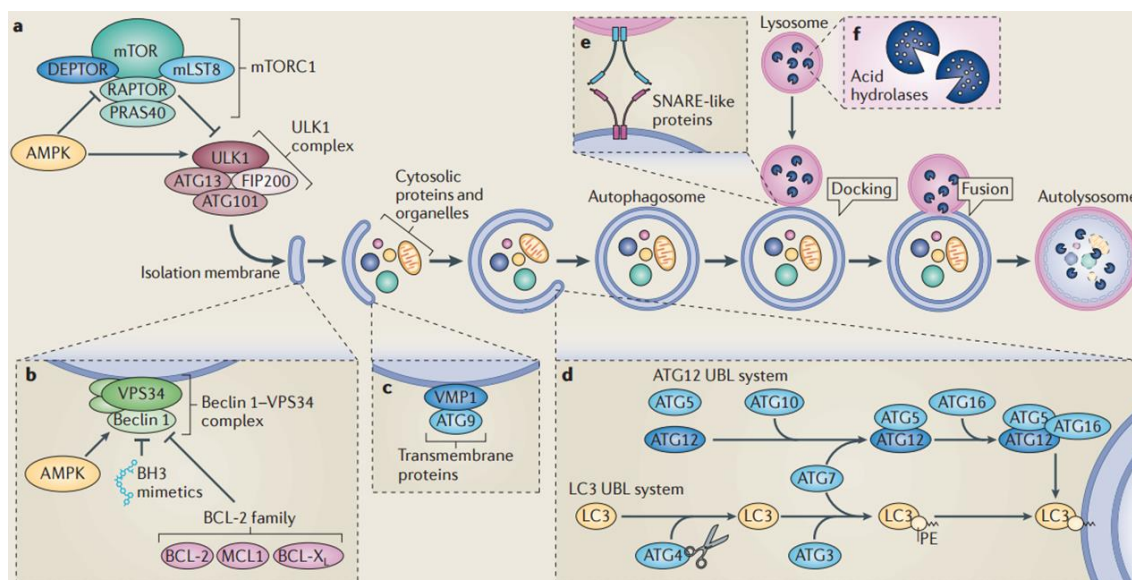
Il existe différents processus de mort cellulaire : l'apoptose, l'autophagie et la nécrose sont actuellement les plus décrits. Ceux-ci peuvent être classés selon des critères morphologiques, enzymatiques (impliquant des nucléases, des lipases ainsi que des protéases) et en fonction du contexte de leur survenue (mort programmée ou non, contexte physiologique ou pathologique). D'autres types de morts cellulaires ne présentant pas les caractéristiques morphologiques et biochimiques de la nécrose, l'autophagie et l'apoptose émergent dans la littérature. On peut notamment citer l'anoïkis, la catastrophe mitotique, la ferroptose, l'entose ou encore la pyroptose, mais cette liste non exhaustive est amenée à évoluer (Galluzzi et al., 2012).

### I. L'autophagie

L'autophagie, correspondant à un « auto-cannibalisme cellulaire », est un processus cellulaire finement régulé permettant à une cellule de survivre suite à une carence en nutriments ou à un stress (Murrow and Debnath, 2013). Elle se définit par la séquestration d'une partie du cytoplasme et d'organites cellulaires dans des vacuoles à double membrane : les autophagosomes. La fusion des autophagosomes et des lysosomes aboutit à la formation de vésicules appelées autolysosomes au niveau desquelles des hydrolases lysosomales (telles les cathepsines) peuvent initier la dégradation du contenu de l'autolysosome. Les détails moléculaires de l'autophagie sont décrits **figure 5** : ce phénomène nécessite l'activation spatiale et temporelle coordonnée de nombreux acteurs incluant le complexe ULK1 (UNC 51 like kinase 1) / FIP200 (FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa) / ATG13 /

ATG101. Ce complexe permettant l'initiation de l'autophagie est couplé au complexe régulateur, inhibiteur de l'autophagie mTORC1 (mTOR Complex 1). Le complexe VPS34 (Vacuolar Protein Sorting 34) / BECLIN1, lorsqu'il est activé, participe quant à lui à la formation du phagophore. ATG9 et VMP1 (Vacuole Membrane Protein 1), deux protéines transmembranaires, participent au recrutement de lipides au niveau du phagophore. Deux systèmes de conjugaison de protéines (UBL systems) catalysent la liaison covalente de ATG12 à ATG5 (qui, associés avec ATG16 forment l'E3-like ligase de LC3) et la liaison de phosphatidylethanolamine à LC3 (microtubule-associated protein 1 Light Chain 3). Des protéines transmembranaires appartenant à la famille des SNARE contrôlent la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes. Ces derniers contiennent des enzymes lysosomales capables d'hydrolyser les protéines, les acides nucléiques et les lipides contenus dans l'autolysosome formé. En fonction du contexte, l'autophagie permet l'élimination d'organites altérés ou l'adaptation de la cellule à une pénurie énergétique. Dans cette seconde condition, l'augmentation du catabolisme cellulaire permet de fournir aux cellules stressées de l'ATP (Adénosine TriPhosphate) et des substrats métaboliques en quantité suffisante afin de subvenir à leurs besoins énergétiques.

Depuis les années 2000, il est décrit que l'autophagie, à l'origine perçue comme une stratégie d'adaptation des cellules à un stress cellulaire afin d'éviter la mort, représente également une forme de mort cellulaire (Kroemer and Levine, 2008). Premièrement, l'autophagie est capable de médier une mort cellulaire dans un contexte physiologique. In vivo, ceci a notamment été montré au cours du processus de développement de la drosophile *Drosophila melanogaster* (Juhász et al., 2003). De plus, des cas de déclenchement de mort par autophagie sous traitement chimiothérapeutique ont été observés dans certains cancers, lorsque des médiateurs de l'apoptose tels que BAX, BAK (Shimizu et al., 2004) ou encore les CASPASES (Fazi et al., 2008) sont absents. Néanmoins, dans la plupart des cas, l'autophagie présente davantage un rôle de survie, permettant aux cellules de surmonter un stress. De plus, l'inhibition de l'autophagie est bien souvent corrélée à une augmentation de la mort cellulaire (Boya et al., 2005).



**Figure 5 : Bases moléculaires de l'autophagie**

L'autophagie requiert l'activation spatiale et temporelle coordonnée de nombreux composés moléculaires incluant le complexe ULK1–FIP200–ATG13–ATG101. Ce complexe qui permet l'initiation de l'autophagie est couplé au complexe régulateur, inhibiteur de l'autophagie mTORC1 (a). Le complexe VPS34–Beclin1, lorsqu'il est activé, mène à la formation du phagosome (b). ATG9 et VMP1, deux protéines transmembranaires, participent au recrutement de lipides au phagosome (c). Deux systèmes de conjugaison de protéines (UBL systems) catalysent la liaison covalente de ATG12 à ATG5 (qui, associés avec ATG16 forment l'E3-like ligase de LC3) et la liaison du PE à LC3 (d). Des protéines transmembranaires appartenant à la famille des SNARE contrôlent la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (e) qui contiennent des enzymes lysosomales capables d'hydrolyser les protéines, les acides nucléiques et les lipides (f). (d'après Mariño et al., 2014).

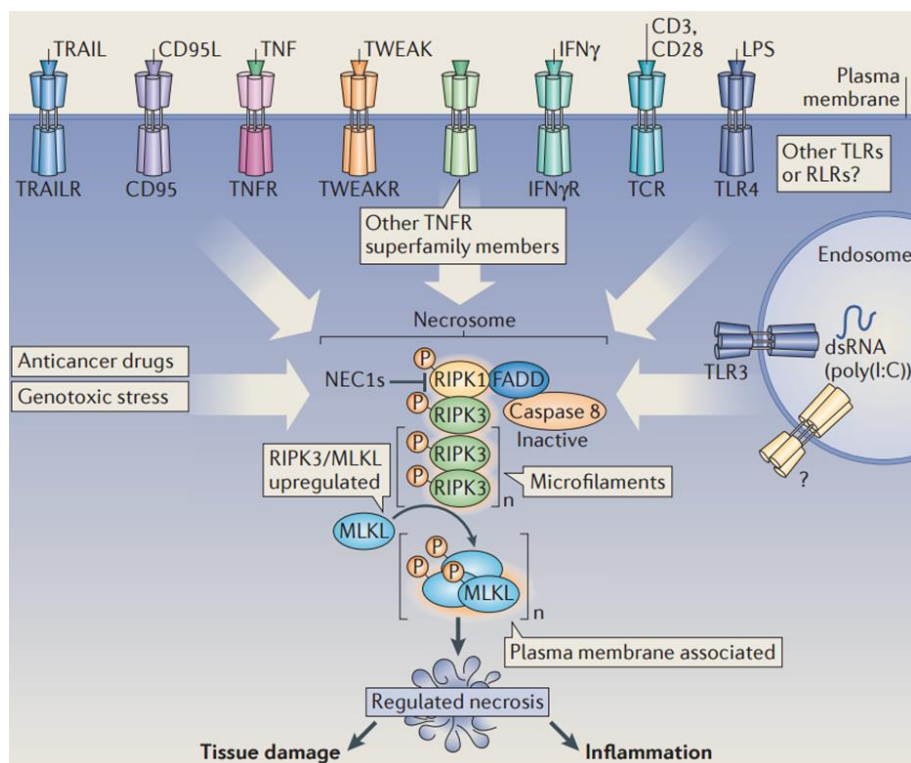
ATG, Autophagy related Gene / AMPK, AMP-activated protein kinase / BCL-XL, BCL extra large / BH3, BCL-2 homology 3 / DEPTOR, DEP domain-containing mTOR-interacting protein / FIP200, FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa / MCL-1, myeloid cell leukaemia sequence 1 / mLST8, mammalian lethal with SEC13 protein / mTORC1, mTOR complex1 / PRAS40, 40 kDa Pro-rich AKT substrate / PE, PhosphatidylEthanolamine / RAPTOR, regulatory-associated protein of mTOR / ULK1, UNC 51 like kinase 1 / UBL systems = Ubiquitin-Like systems / VMP1, Vacuole Membrane Protein 1 / VPS34, Vacuolar Protein Sorting 34.

## II. La nécrose

La nécrose (du grec nekros = cadavre), est un terme désignant à l'origine la présence de cellules ou de tissus morts. Il a longtemps été employé pour définir un processus de mort cellulaire survenant de façon accidentelle et ne présentant pas les caractéristiques morphologiques de l'apoptose (telles que la formation de corps apoptotiques) et de l'autophagie (Kroemer et al., 2009). Or, il se trouve que ce processus peut être déclenché de façon régulée (Hitomi et al., 2008) et joue un rôle dans de nombreux contextes physiologiques et pathologiques (Proskuryakov et al., 2003). D'un point de vue morphologique, la nécrose est associée à une augmentation du volume cellulaire, un gonflement des organites et une augmentation

de la perméabilité de la membrane plasmique. Ces phénomènes concourent à la rupture de la membrane plasmique et à la libération du contenu cellulaire dans le milieu environnant, ce qui déclenche une réaction inflammatoire (Majno et al., 1960). De nombreux stress sont capables de déclencher une mort par nécrose : l'activation de récepteurs de mort, la présence de toxines, l'induction de dommages à l'ADN suite à un stress génotoxique, le blocage des CASPASES (en particulier de la CASPASE 8). Les acteurs impliqués dans la signalisation cellulaire aboutissant au déclenchement de la nécrose sont décrits **figure 6**. L'activation de nombreux récepteurs peut induire cette mort : l'activation de récepteurs membranaires comme TNFR (Tumour Necrosis Factor Receptor), CD95 (= FAS), TRAILR (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor), TWEAKR (TNF-related WEAK inducer of apoptosis Receptor), ou encore l'activation de récepteurs à la membrane des endosomes tels que le TLR3 (Toll Like Receptor 3), suite à la reconnaissance de molécules associées à des pathogènes viraux ou bactériens. Il y a alors recrutement des protéines FADD (FAS-Associated with a Death Domain), RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1) et RIPK3 (Receptor Interacting Protein Kinase 3), formant le nécrosome. RIPK3 active ensuite MLKL (Mixed Lineage Kinase domain-Like), ce qui aboutit à la mort de la cellule par nécrose. Ces dernières années, des études ont suggéré que, comme l'apoptose, la nécrose peut être un événement programmé. Ceci a initié le terme de « nécroptose », initialement utilisé pour décrire une mort induite par l'activation du TNFR1, indépendante des CASPASES et inhibée par la nécrostatine-1 (agent inhibant RIPK1) (Degterev et al., 2005). La nécrose est une mort fréquemment observée au cœur des tumeurs où règne un contexte hypoxique (Steinbach et al., 2003). En mourant, les cellules libèrent leur contenu, ce qui contribue à l'entretien d'un contexte inflammatoire chronique et à la prolifération des cellules voisines (Vakkila and Lotze, 2004). De ce fait, la mort par nécrose au sein de la tumeur, bien qu'éliminant certaines cellules, peut malgré tout participer à la promotion de la croissance tumorale.





**Figure 6 : Bases moléculaires de la nécrose**

La nécrose peut être déclenchée suite à de nombreux stimuli : l'activation de récepteurs membranaires comme TNFR, CD95, TRAILR ou TWEAKR, la présence d'un stress génotoxique ou encore l'activation de récepteurs tels que le TLR3 à la membrane des endosomes suite à la reconnaissance de molécules associées à des pathogènes viraux ou bactériens. Il y a alors recrutement des protéines FADD, RIPK1 et RIPK3, formant le nécrosome. RIPK3 active ensuite MLKL, ce qui aboutit à la mort de la cellule par nécrose (d'après Vanden Berghe et al., 2014)

*CD95, FAS / FADD, FAS-Associated with a Death Domain / MLKL, Mixed Lineage Kinase domain-Like / RIPK1, Receptor Interacting Protein Kinase 1 / RIPK3, Receptor Interacting Protein Kinase 3 / TLR3, Toll Like Receptor 3 / TNFR, Tumour Necrosis Factor Receptor / TRAILR, TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor / TWEAKR, TNF-related WEAK inducer of apoptosis Receptor.*

### III. L'apoptose

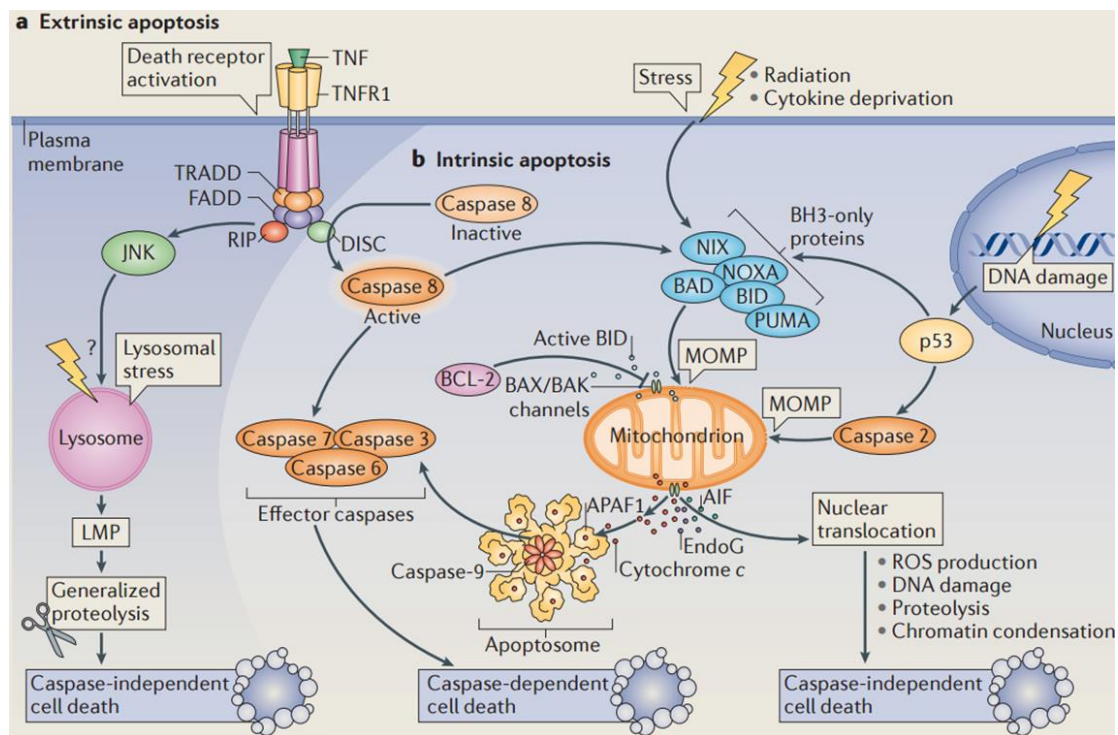
L'apoptose est le processus de mort cellulaire le plus étudié. Il est exécuté par des protéases à cystéine, les CASPASES (Cysteiny-ASpartate-cleaving proteases) (Degterev et al., 2003) et est indispensable au développement tissulaire, à l'homéostasie cellulaire (Saikumar et al., 1999) ainsi qu'à la suppression tumorale. Le terme « apoptose » vient du grec ancien apoptosis en référence à la chute des feuilles des arbres en automne (apo = éloignement et ptosis = chute). Ceci illustre par métaphore une mort cellulaire naturelle et intrinsèque. Le terme apoptose a été utilisé pour la première fois en 1972 par Kerr, Wyllie et Currie, trois chercheurs britanniques (Kerr et al., 1972) qui définissent alors une forme de mort morphologiquement distincte de la nécrose. Au cours de l'apoptose, les cellules

perdent contact avec les cellules avoisinantes, la chromatine nucléaire se condense, le noyau ainsi que le cytoplasme se fragmentent. Les cellules se fractionnent alors en de multiples corps présentant une membrane plasmique et contenant des morceaux de noyau et de cytoplasme. Ces corps apoptotiques sont ensuite reconnus et éliminés par des cellules phagocytaires. Cette première description de l'apoptose, faite uniquement sur la base d'observations morphologiques, constitue une référence définissant la mort cellulaire par apoptose et a par la suite permis d'identifier et de caractériser d'autres types de mort cellulaire. Dans les années 80, la découverte des premiers gènes contrôlant cette mort a été faite chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Ellis and Horvitz, 1986). Au cours de l'apoptose, la membrane plasmique conserve son intégrité. Cependant, un transfert de phosphatidylsérine (un phospholipide présent sur la face interne de la membrane plasmique d'une cellule intègre) vers l'extérieur de la membrane plasmique a lieu. Les phosphatidylsérines se trouvent alors exposées au milieu extérieur, constituant un signal de recrutement de macrophages capables de phagocyter les corps apoptotiques. Deux voies d'apoptose existent : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (ou mitochondriale). Elles sont décrites **figure 7**.

La voie extrinsèque est mise en jeu en réponse à l'activation de récepteurs de mort présents à la membrane plasmique. Parmi eux on trouve les récepteurs FAS (= CD95), TNFR1, TRAILR. Leur activation induit le recrutement au niveau de leurs domaines intracellulaires, de protéines telles que FADD, TRADD et la CASPASE 8 (CASPASE dite initiatrice). La CASPASE 8 ainsi recrutée est activée (suite à son clivage protéolytique) et est alors capable d'activer à son tour divers effecteurs par clivage protéolytique. Parmi ces effecteurs : les CASPASES effectrices (les CASPASES 7, 3 et 6) et la protéine à BH3-seul BID (appartenant à la famille de BCL-2, décrite dans la partie suivante de ce chapitre), qui co-active la voie intrinsèque de l'apoptose suite à sa translocation à la mitochondrie. Outre le déclenchement de voies dépendantes des CASPASES, il est aussi décrit que l'activation des récepteurs de mort présents à la membrane plasmique est en mesure de déclencher une apoptose indépendante des CASPASES. Celle-ci passe par l'activation de la voie JNK, engendrant un stress lysosomal. Les lysosomes voient alors leur membrane perméabilisée, libérant ainsi des protéases (les cathepsines) qui vont alors dégrader leurs protéines cibles dans le cytosol.



La voie intrinsèque de l'apoptose est régulée par les protéines de la famille de BCL-2 (dont la structure et les fonctions seront décrites dans la suite de cette introduction) et est caractérisée par le déclenchement de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP = Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization). Ceci induit la libération de cytochrome c de l'espace inter-membranaire mitochondrial vers le cytosol, qui participe alors à l'assemblage de l'apoptosome dans le cytosol. L'apoptosome est une structure constituée des protéines APAF1 et cytochrome c. Cette structure recrute la pro-CASPASE 9, et la clive en CASPASE 9 pour l'activer (Zou et al., 1999).



**Figure 7 : Bases moléculaires de l'apoptose**

(a) La voie extrinsèque de l'apoptose est déclenchée en réponse à l'activation de récepteurs de mort présents à la membrane plasmique, qui sont les récepteurs FAS (= CD95), ou TRAILR. Leur activation induit le recrutement de protéines telles que FADD, TRADD et la CASPASE 8. La CASPASE 8 activée est ensuite capable d'activer à son tour, par clivage protéolytique, des effecteurs tels que des CASPASES effectrices ou encore la protéine à BH3 seul BID (BH3-Interacting Domain death agonist) qui co-activerait la voie intrinsèque de l'apoptose suite à sa translocation à la mitochondrie. (b) La voie intrinsèque de l'apoptose est caractérisée par le déclenchement de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP). Ceci induit la libération de cytochrome c de l'espace inter-membranaire, qui régule alors l'assemblage de l'apoptosome dans le cytosol. La MOMP peut être déclenchée suite à l'activation de protéines à BH3 seul (via des modifications post-traductionnelles) ou l'augmentation de la transcription des gènes codant pour celles-ci. Parmi les protéines libérées lors de la MOMP, les AIF et endonucléases G sont capables de déclencher une mort CASPASE-indépendante, pouvant stimuler la perméabilisation des membranes lysosomales et libérer ainsi des cathepsines qui vont aller exercer leurs fonctions protéolytiques dans le cytosol (d'après Mariño et al., 2014).

*AIF, Apoptosis Induced Factor / DISC, Death-Inducing Signaling Complex / FADD, FAS-Associated with a Death Domain / FAS (= CD95) / JNK, JUN N-terminal Kinase / ROS, Reactive Oxygen Species*

---

*/ TRADD, TNFR1 Associated Death Domain / TRAILR, TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor / TNFR1, Tumour Necrosis Factor receptor 1*

Les mitochondries jouent un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire. Elles sont le site de synthèse de l'ATP, molécule riche en énergie et indispensable aux réactions biochimiques dans les cellules. Organites clés de la survie cellulaire, les mitochondries ont paradoxalement un rôle dans le déclenchement de l'apoptose intrinsèque : elles régulent la mort cellulaire subséquente à l'activation des CASPASES, par le phénomène de MOMP (Wei et al., 2001). L'origine de ce phénomène a longtemps été controversée. En effet, deux structures distinctes constituent des canaux de mort présents aux membranes mitochondriales et régulent la perméabilisation mitochondriale : le PTP (Permeability Transition Pore), exprimé à la membrane interne mitochondriale et le MAC (Mitochondrial Apoptosis-induced Channels), exprimé à la membrane mitochondriale externe (Kinnally and Antonsson, 2007). Ces deux structures ont la fonction commune de déclencher la libération de facteurs mitochondriaux tels que le cytochrome c dans le cytosol durant l'apoptose. Ainsi, l'ouverture des canaux PTP aboutit à la libération de la fraction matricielle de la mitochondrie dans l'espace inter-membranaire, induisant la rupture de la membrane externe mitochondriale et la libération subséquente de protéines inter-membranaires dans le cytosol. Cependant, des études suggèrent que l'ouverture du PTP est davantage une cause qu'une conséquence de l'apoptose, et que ce canal serait davantage impliqué dans le déclenchement de la nécrose. La composition des PTP reste à ce jour mal connue et impliquerait des interactions entre plusieurs protéines telles que la cyclophiline D, l'ANT (Adenine Nucleotide Transporter) et la F1/F0 ATP synthase à la membrane interne mitochondriale (Halestrap and Richardson, 2015). L'activation pharmacologique de ces canaux constitue a priori une stratégie prometteuse pour le traitement du cancer. Cependant, les mitochondries présentes dans les cellules cancéreuses s'avèrent souvent désensibilisées face à des signaux activant l'ouverture des PTP dans des mitochondries de cellules saines (Rasola and Bernardi, 2014). L'activation des canaux MAC est quant à elle régulée par les protéines de la famille de BCL-2. Ces canaux, dont BAX et BAK sont des constituants essentiels (Dejean et al., 2005, Martinez-Caballero et al., 2009), constituent des pores permettant le passage spécifique de protéines dans le cytosol. De plus, des études ont montré l'importance de la présence de lipides de la voie des

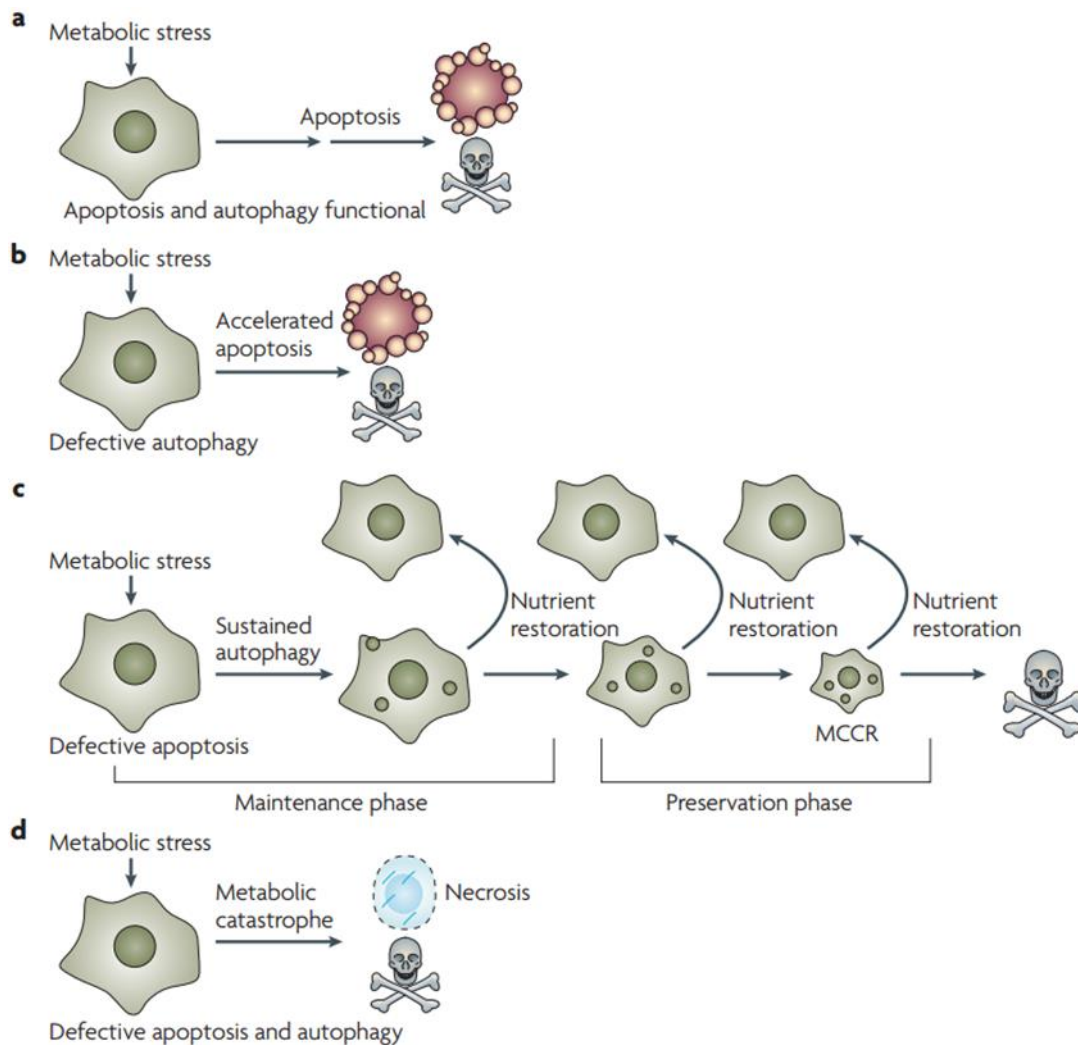
céramides dans la formation des MAC, suggérant que ces canaux ne sont pas de nature totalement protéique (Siskind et al., 2010).

Les protéines de la famille de BCL-2 régulent la formation et l'activité des canaux MAC. Elles contrôlent ainsi l'intégrité de la membrane externe mitochondriale dans des cellules saines, ainsi que la perméabilisation de cette membrane en réponse à un stimulus apoptotique. La MOMP peut être déclenchée sous un stress cellulaire provoquant la synthèse et l'activation de protéines à BH3-seul comme BID ou PUMA (via l'augmentation de la transcription de leurs gènes ou des modifications post-traductionnelles). Par ailleurs, la voie intrinsèque de l'apoptose peut engendrer une mort indépendante des CASPASES (Kroemer and Martin, 2005). En effet, parmi les protéines libérées lors de la MOMP, les AIF (Apoptosis Induced Factor) et endonucléases G sont capables de déclencher une mort CASPASE-indépendante, en stimulant le stress lysosomal. La perméabilisation des membranes lysosomales qui s'en suit provoque la libération des cathepsines qui vont alors exercer leurs fonctions protéolytiques dans le cytosol. La surexpression de protéines anti-apoptotiques de la famille de BCL-2 est corrélée à la tumorigenèse et à la résistance des cellules aux thérapies, faisant de cette famille une cible de choix pour le développement de stratégies anti-tumorales. Ce point sera développé dans le projet 1 de cette thèse.

#### **IV. Les morts cellulaires régulent ensemble la destinée de la cellule**

Dans les cellules cancéreuses, l'apoptose, la nécrose et l'autophagie ne peuvent pas être perçues comme étant totalement indépendantes les unes des autres. Ceci pour deux raisons : d'une part, ces différentes morts engagent certains partenaires communs (récepteurs de mort, CASPASES, protéines de la famille de BCL-2). D'autre part, ces trois processus agissent de façon coordonnée et contexte-dépendante dans la cellule (**figure 8**). Ainsi, suite à la survenue d'un stress cellulaire (métabolique, génotoxique, lysosomal...), l'apoptose est la mort cellulaire déclenchée de façon privilégiée. Un défaut d'autophagie peut quant à lui augmenter la réponse apoptotique à certains stress en abaissant le seuil de déclenchement de l'apoptose. De nombreux types de cancers possèdent des défauts de fonction de l'apoptose (absence de fonction de BAX, BAK ou des CASPASES). Dans ces cellules, la survie sous exposition à un stress est dépendante de l'autophagie. En

revanche, si le stress se prolonge, l'autophagie peut aussi aboutir à la mort. Enfin, les cellules ayant une apoptose et une autophagie non fonctionnelles sont incapables de tolérer un stress important et meurent alors par nécrose.



**Figure 8 : L'apoptose, l'autophagie et la nécrose régulent ensemble la destinée cellulaire**

(a) Suite à un stress métabolique, l'apoptose est la mort cellulaire déclenchée de façon privilégiée dans les cellules cancéreuses. (b) Un défaut d'autophagie peut augmenter la réponse apoptotique à certains stress. (c) Dans des cellules ayant une apoptose non fonctionnelle, la survie en présence de stress dépend de l'autophagie mais la mort par autophagie peut aussi être déclenchée si le stress se prolonge. (d) Les cellules ayant une apoptose et une autophagie non fonctionnelles sont incapables de tolérer un stress métabolique et meurent alors par nécrose (d'après Mathew et al., 2007)



---

## **Projet 1 : Ciblage thérapeutique du réseau d'interactions PUMA / BAX / BCL-xL**

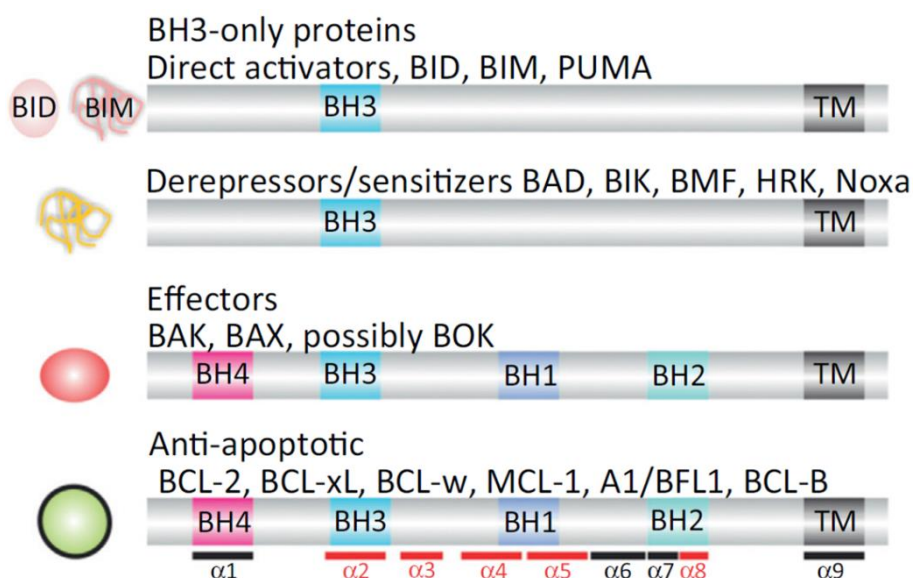
### **Introduction**

#### **A. Régulation de l'apoptose mitochondriale par les protéines de la famille de BCL-2**

##### **I. Les protéines de la famille de BCL-2**

Les protéines de la famille de BCL-2 (B-Cell Lymphoma-2) jouent un rôle central de régulation de l'apoptose mitochondriale. BCL-2, le premier membre de cette famille à avoir été décrit (Tsujimoto et al., 1985), a été identifié dans les lymphomes. Dans cette pathologie, suite à une translocation chromosomique, le gène *BCL-2* se retrouve juxtaposé au locus codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines dans les lymphocytes B. Il en résulte une surexpression de la protéine BCL-2 dans ces cellules. Les protéines de la famille de BCL-2 comportent des domaines BH (domaines homologues à ceux présents dans BCL-2) et sont classées en trois groupes (Cory et al., 2003) : les membres anti-apoptotiques à quatre domaines BH (BCL-2, BCL-xL, MCL-1...), les membres pro-apoptotiques à multi-domaines BH (BAX et BAK) et les protéines à BH3-seul activatrices (BIM, BID, PUMA...) ou sensibilisatrices (NOXA, BIK...) (**figure 9**). Les membres pro-apoptotiques à multi-domaines BH comportent des similarités de structure avec leurs homologues anti-apoptotiques. Ils sont classiquement décrits comme possédant trois domaines BH, numérotés de BH1 à BH3 (Zha et al., 1996). Cependant, des études suggèrent l'existence d'un quatrième domaine BH (BH4) dans leur structure (Kvansakul et al., 2008). Certaines protéines de la famille de BCL-2 possèdent un domaine transmembranaire dans leur structure, leur permettant de s'ancrer aux membranes intra-cellulaires. Bien que leur localisation soit majoritairement décrite comme mitochondriale, diverses autres localisations subcellulaires pour ces protéines ont été rapportées (réticulum endoplasmique, noyau) suggérant un rôle de cette famille dans des processus allant au-delà de la régulation de l'apoptose mitochondriale : ce point sera développé dans le projet 2 de ce manuscrit.

Les membres de la famille de BCL-2 possèdent au moins un domaine BH. Sur cette définition, un nombre grandissant de travaux a mené à l'identification de nouvelles protéines à BH3-seul. Or, la plupart de ces protéines n'ont pas de fonctions similaires à celles décrites pour les membres de la famille de BCL-2. Aussi, des analyses phylogénétiques effectuées chez plusieurs espèces suggèrent que peu de motifs BH3 sont en réalité homologues, conservés au cours de l'évolution et donc issus d'un ancêtre commun. En effet, de nombreux domaines BH3 putatifs sont des homoplasies : ils sont apparus de façon indépendante chez des espèces éloignées au cours de l'évolution (Aouacheria et al., 2013). La nécessité de la prise en compte de données fonctionnelles et phylogénétiques souligne alors toute la difficulté de l'établissement d'une classification stable des protéines de la famille de BCL-2.



**Figure 9 : Structure des protéines de la famille de BCL-2**

Les protéines anti-apoptotiques (BCL-xL, BCL-2...) et pro-apoptotiques à multi-domaines BH (BAX, BAK) sont constitués de 4 domaines BH (BCL-2 Homology domains), numérotés de BH1 à BH4. Les protéines pro-apoptotiques à BH3-seuls ont des structures variées mais ont en commun le domaine BH3. Parmi cette dernière catégorie de protéines, on distingue les BH3-seuls activateurs (BIM, BID, PUMA) et les BH3-seuls sensibilisateurs (BAD, HRK, NOXA...) (d'après Moldoveanu et al., 2014).

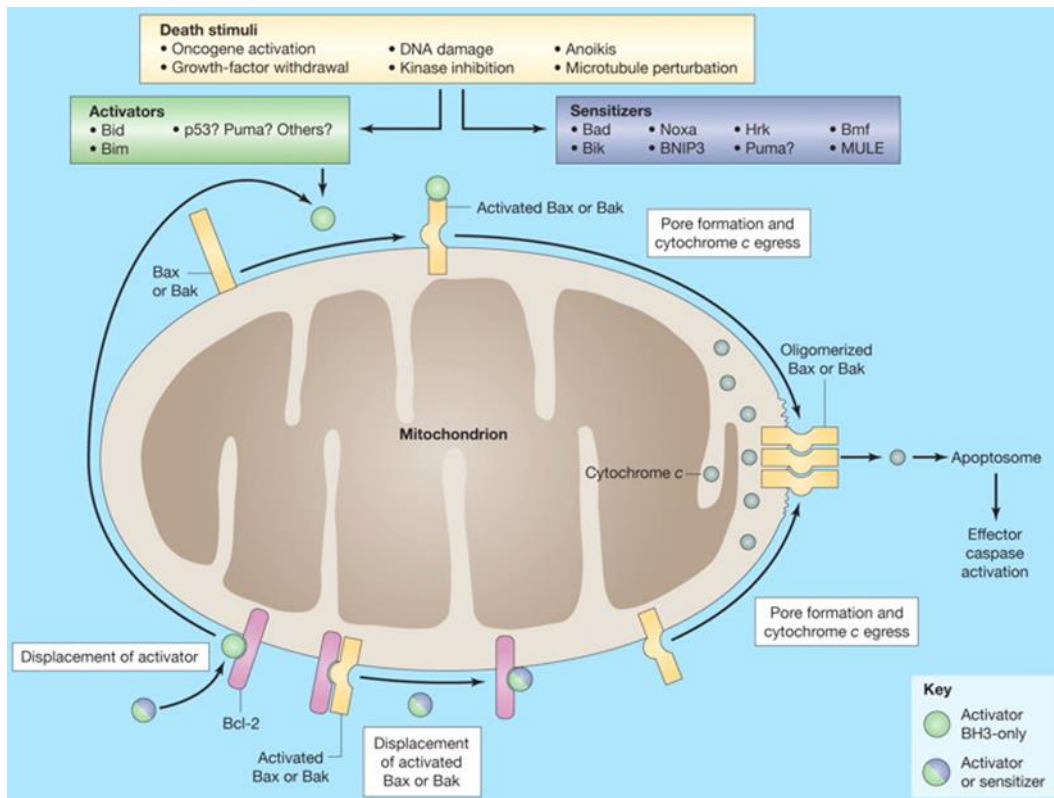
*A1/BFL1 : BCL-2 related protein A1 / BAD : BCL-2 Associated Death promoter / BAK : BCL-2 Antagonist/Killer 1 / BAX : BCL-2 Associated X protein / BCL-2 : B-Cell Lymphoma 2 / BCL-w : BCL-2 Like 2 / BID : BH3 Interacting Domain death agonist / BIK : BCL-2 Interacting Killer / BIM : BCL-2 Interacting Mediator of cell death / BMF : BCL-2 Modifying Factor / HRK : Harakiri / PUMA : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis / TM : TransMembrane domain.*

Les protéines de la famille de BCL-2 régulent le déclenchement de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP), phénomène engageant la cellule vers l'apoptose (**figure 10**). Les protéines pro-apoptotiques à BH3-seul activatrices et sensibilisatrices agissent comme des senseurs de stress

cellulaire. Ainsi, suite à la survenue d'un signal de mort (dommages à l'ADN, activation d'oncogènes, privation en nutriments...), l'activation de facteurs de transcription tels que p53, E2F1 et FOXO3A aboutit à la synthèse de protéines à BH3-seul activatrices et sensibilisatrices. Ces protéines participent activement au déclenchement de la MOMP : les protéines à BH3-seul activatrices (BIM, BID, PUMA), alors présentes sous une forme libre dans le cytosol, vont interagir avec les effecteurs pro-apoptotiques BAX et BAK afin de les activer. BAX et BAK activés sont ensuite capables de s'homo-oligomériser au niveau de la membrane externe mitochondriale et d'y former des pores aboutissant à la MOMP et à la mort cellulaire. Les membres anti-apoptotiques de la famille de BCL-2 maintiennent la survie cellulaire en interagissant avec les effecteurs BAX et BAK ainsi qu'avec les BH3-seuls activateurs au niveau de la membrane mitochondriale externe : ils bloquent ainsi le déclenchement de la perméabilisation mitochondriale. Suite à la survenue d'un stress, les protéines à BH3-seul sensibilisatrices entrent en compétition avec BAX, BAK et les BH3-seuls activateurs pour la liaison aux anti-apoptotiques. Les effecteurs et BH3-seuls activateurs sont alors libérés et prêts à interagir entre eux afin d'engager l'activation des effecteurs BAX et BAK et la MOMP. Ainsi, les protéines à BH3-seul activent BAX et BAK de façon directe en interagissant avec eux (rôle des BH3-seuls activateurs), ou indirecte en agissant sur les protéines anti-apoptotiques homologues de BCL-2 (rôle des BH3-seuls sensibilisateurs). Le processus de cette activation de BAX et BAK sera exposé dans la suite de cette introduction. Le domaine BH3 des protéines à BH3-seul est nécessaire et suffisant pour exercer leur fonction pro-apoptotique. Lorsque BAX et BAK activés s'homo-oligomérisent à la membrane externe mitochondriale, ils provoquent une libération de protéines apoptogènes de tailles variées (jusqu'à 100 kDa, Rehm et al., 2003) présentes dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie (cytochrome c, SMAC/DIABLO) vers le cytosol. Ces molécules permettent la formation de l'apoptosome (dont APAF-1 est un constituant principal) ainsi que l'activation d'une cascade de CASPASES effectrices. Ces CASPASES procèdent à la protéolyse de leurs nombreux substrats nucléaires et cytoplasmiques, ce qui aboutit à la mort de la cellule. Parmi une centaine de substrats on trouve PARP (Poly ADP Ribose Polymerase), la DNase CAD (CASPASE Activated DNase), la LAMINE ou encore l'ACTINE (Utz and Anderson, 2000). Outre leurs interactions avec les pro-



apoptotiques, les anti-apoptotiques sont également capables d'interagir avec les CASPASES, empêchant leur maturation, leur activation et par là même le déclenchement de l'apoptose. Ainsi, BCL-2 interagit avec la pro-CASPASE 8, la maintenant sous cette forme inactive (Poulaki et al., 2001). De plus, BCL-xL inhibe la formation de l'apoptosome en interagissant avec la CASPASE 9 et APAF-1 (Hu et al., 1998).

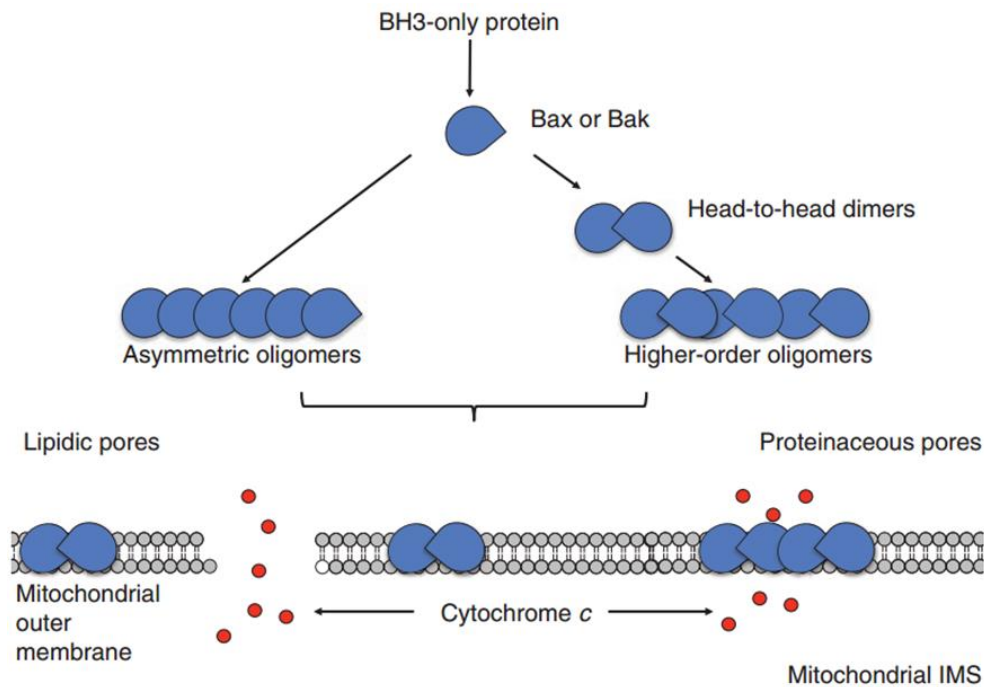


**Figure 10 : Contrôle de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) par les protéines de la famille de BCL-2**

Les protéines anti-apoptotiques de la famille de BCL-2 interagissent avec BAX et BAK afin d'empêcher le déclenchement de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) et la mort cellulaire qui en découle. En présence de signaux de mort, les protéines à BH3-seul sont activées. Les BH3-seuls activateurs vont interagir avec les pro-apoptotiques BAX et BAK afin d'engager leur oligomérisation et la MOMP. Les BH3-seuls sensibilisateurs vont quant à eux interagir avec les membres anti-apoptotiques tels que BCL-2 et BCL-xL afin de lever leur action inhibitrice sur BAX et BAK. L'oligomérisation de BAX et BAK induit la formation de pores dans la membrane externe mitochondriale, la libération de cytochrome c dans le cytosol, la formation de l'apoptosome et l'activation subséquente des CASPASES effectrices aboutissant à la mort cellulaire (d'après Brunelle and Letai, 2009). *BNIP3 : Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa protein-Interacting Protein 3 / MULE : Mcl-1 Ubiquitylation Ligase E3*

## II. Mécanismes d'activation des effecteurs BAX et BAK

La MOMP est un phénomène régulé par les protéines de la famille de BCL-2 (Youle and Strasser, 2008). Bien que l'implication de BAX et BAK dans la MOMP soit avérée, les mécanismes mis en jeu par ces protéines pour rendre la perméabilisation effective demeurent mal connus. Deux modèles, décrits **figure 11**, proposent que BAX et BAK induisent la MOMP soit en provoquant la formation de pores lipidiques dans la membrane, soit en formant eux-mêmes des pores protéiques. Le modèle impliquant des pores protéiques est soutenu par des études de patch-clamp sur mitochondries isolées. Celles-ci suggèrent que la formation d'un canal protéique nécessitant BAX et BAK à la membrane externe est associée au phénomène de perméabilisation (Martinez-Caballero et al., 2009b). La taille des pores décrits dans cette étude permet le transport du cytochrome c, mais pas celui de molécules de taille plus importante. Un autre modèle émet l'hypothèse d'une induction de pores lipidiques dans la membrane externe mitochondriale en réponse à l'activation de BAX et BAK. Ce modèle est en accord avec un transport de molécules de grande taille de l'espace inter-membranaire vers le cytosol durant la MOMP. Des études de microscopie sur liposomes perméabilisés par BAX ont mis en évidence l'existence de pores allant jusqu'à 100 nm de diamètre dans ces structures. Ces pores s'avèrent dépourvus de protéines dans leur composition, et leur fonction est bloquée par BCL-xL (Schafer et al., 2009). Malgré la présence d'arguments en faveur de chacun de ces modèles, les modalités d'induction de la MOMP par BAX et BAK demeurent floues. En effet, les pores protéiques permettent uniquement le passage de petites molécules, ce qui n'est pas en accord avec le fait que des molécules de grande taille sont également transportées de l'espace inter-membranaire mitochondrial vers le cytosol durant la MOMP. Cependant, les pores lipidiques, bien qu'ayant été décrits dans un modèle de liposomes, n'ont jamais été visualisés sur des mitochondries.

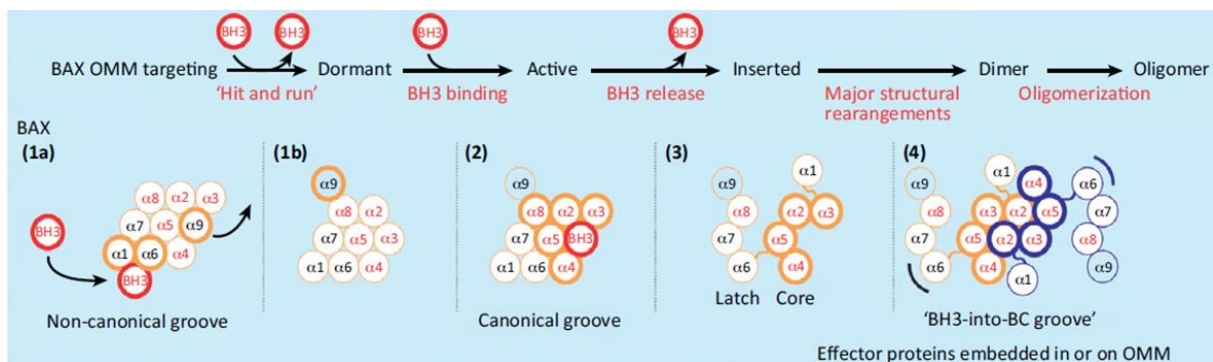


**Figure 11 : Déclenchement de la MOMP par BAX et BAK**

L'activation directe de BAX et BAK par des protéines à BH3-seul aboutit à la formation de dimères puis d'oligomères de BAX et BAK à la membrane mitochondriale externe. BAX et BAK perméabilisent alors cette membrane par des mécanismes encore mal connus. Deux modèles sont présentés. Le premier décrit l'induction de la formation de pores lipidiques dans la membrane, tandis que le second argumente en faveur de la formation de pores protéiques (d'après Tait and Green, 2013). *IMS* : *Inter-Membrane Space*.

BAX inactif est décrit comme étant majoritairement cytosolique (Wolter et al., 1997), alors que BAK est mitochondrial. Suite à leur activation par des protéines à BH3-seul de la famille de BCL-2, BAX et BAK s'oligomérisent et s'insèrent dans la membrane externe mitochondriale (Eskes et al., 2000, Wei et al., 2000). L'oligomérisation de ces effecteurs est essentielle. Il a en effet été décrit qu'un défaut d'oligomérisation bloque le déclenchement de la perméabilisation (George et al., 2007). Les mécanismes d'activation de BAX et BAK sont encore mal décrits. Cependant, un modèle présenté **figure 12** propose une activation de BAX par les BH3-seuls activateurs (PUMA, BIM, tBID) via l'interaction de ces derniers au niveau d'un site d'interaction non canonique sur BAX, constitué des hélices 1 et 6, et opposé à sa poche hydrophobe (Gavathiotis et al., 2008). Ceci déplie BAX en libérant l'hélice 9 de sa poche hydrophobe. Cette hélice libre s'insère alors dans la membrane externe mitochondriale. Les protéines à BH3-seul activateurs viennent ensuite se loger dans la poche hydrophobe (Czabotar et al., 2013). Suite à cette seconde activation, BAX se déplie en relâchant le BH3-seul et vient former deux domaines

distincts : un domaine « loquet » (hélices 6 à 9) et un cœur globulaire (hélices 1 à 5). BAX ainsi déplié s'homodimérise de façon symétrique, le domaine BH3 de chaque monomère interagissant avec la poche hydrophobe de son partenaire (Dewson et al., 2012). Cette dimérisation dévoile des domaines d'interactions permettant la formation d'oligomères d'homodimères, ce qui conduit à la MOMP (Dewson et al., 2009). A noter que la formation d'hétérodimères de BAX/BAK est possible, cependant les homodimères semblent majoritaires dans les cellules en apoptose. Ce modèle d'activation suppose que BAX interagit en deux étapes avec les BH3-seuls activateurs : une première fois au niveau du site non-canonique (formé par les hélices 1 et 6) et une seconde fois via le sillon hydrophobe, décrit comme site canonique. Seul l'exemple de BAX est donné ici, mais il est décrit que l'activation de BAK a lieu selon les mêmes modalités, hormis la première étape, car BAK est une protéine localisée de façon constitutive à la membrane externe de la mitochondrie.



**Figure 12 : Changements conformationnels de BAX lors de son activation durant l'apoptose.**

(1) La forme inactive de BAX est cytosolique et repliée sur elle-même. Lors d'un stress apoptotique, BAX subit une série de changements de conformation : la liaison d'un BH3-seul activateur au niveau des hélices 1 et 6 entraîne le dépliement de l'hélice 9, dégageant ainsi la poche hydrophobe et permettant l'insertion de BAX dans la membrane externe mitochondriale. (2) La liaison d'un BH3-seul à la poche hydrophobe provoque un nouveau changement de conformation permettant de distinguer deux domaines dans BAX : (3) un domaine loquet (latch) et un cœur globulaire (core). (4) Un ultime changement conformationnel permet la formation de dimères symétriques de BAX. Le domaine BH3 de chaque monomère interagissant avec la poche hydrophobe de son partenaire. (d'après Moldoveanu et al., 2014)

Le déclenchement de l'apoptose a longtemps été considéré comme un point de non-retour car il aboutit souvent à la mort de la cellule, dépendante ou non des CASPASES. Historiquement, la MOMP a été définie comme étant un événement régit par le principe du « tout ou rien » (Goldstein et al., 2000). Or, de récentes études ont montré la survenue d'une MOMP partielle dans certaines cellules, qui conservent malgré tout une part de mitochondries intactes et fonctionnelles (Tait et

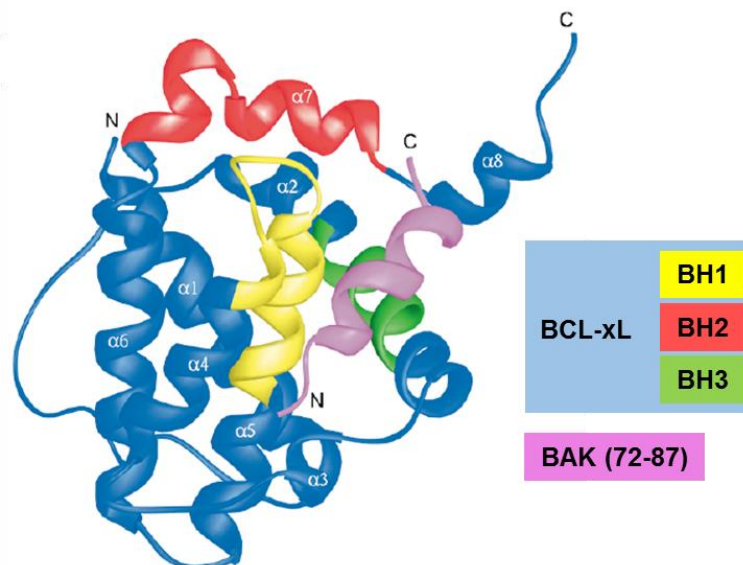
al., 2010). Ces cellules sont ensuite capables de survivre et de reformer leur « stock » de mitochondries. La capacité de certaines mitochondries à résister à la MOMP est liée au niveau d'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille de BCL-2 à leur membrane externe. Des observations tendent à prouver que les mitochondries restées intactes constituent une source pour la synthèse de nouvelles mitochondries fonctionnelles dans la cellule (Tait et al. 2010). La résistance des cellules à une MOMP a d'importantes répercussions physiopathologiques car ceci favorise la tumorigenèse (Gama and Deshmukh, 2015). Des travaux menés ces dernières années ont montré que des mécanismes tels que l'inhibition de l'activité des CASPASES permettent aux cellules tumorales de résister à une MOMP. De plus, des études décrivent l'implication de la GAPDH (GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase) dans la protection des cellules à une mort CASPASES-indépendante suite à une MOMP. Ce rôle protecteur de la GAPDH est lié à son activité glycolytique bien connue mais aussi à une fonction de promotion de l'autophagie (Colell et al., 2007).

L'apoptose (et plus particulièrement la MOMP) joue un rôle déterminant dans le devenir de la cellule. Une dérégulation des mécanismes de perméabilisation impacte le déclenchement de la mort cellulaire et peut participer à la croissance tumorale. La modulation de la MOMP semble donc constituer une stratégie thérapeutique prometteuse.

### III. Régulation de l'apoptose mitochondriale par le réseau d'interactions impliquant la famille de BCL-2

#### a. Interactions entre pro-apoptotiques et anti-apoptotiques

Le réseau d'interactions impliquant les protéines de la famille de BCL-2 régule le déclenchement de la perméabilisation mitochondriale via une action directe sur BAX et BAK. Les protéines anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-xL, BCL-w, MCL-1) régulent le déclenchement de la perméabilisation mitochondriale en interagissant avec le domaine BH3 de leurs contreparties pro-apoptotiques (protéines à multi-domaines ou BH3-seuls activateurs et sensibilisateurs) au niveau d'une poche (ou sillon) hydrophobe contenant les domaines BH1, BH2 et BH3 (Sattler et al. 1997). Cette poche correspond au domaine d'interaction dit « canonique ». Ainsi, les protéines anti-apoptotiques séquestrent les protéines effectrices BAX et BAK ainsi que les protéines à BH3-seul activatrices via une interaction poche hydrophobe/domaine BH3 (**figure 13**). Ceci empêche la MOMP en bloquant l'activation et l'oligomérisation de BAX et BAK à la membrane externe de la mitochondrie (Reed et al., 1996). La présence de ces complexes anti-apoptotiques/pro-apoptotiques est donc essentielle pour la survie de la cellule.



**Figure 13 : Structure 3D des interactions entre protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille de BCL-2 : exemple de l'interaction BCL-xL / BAK**

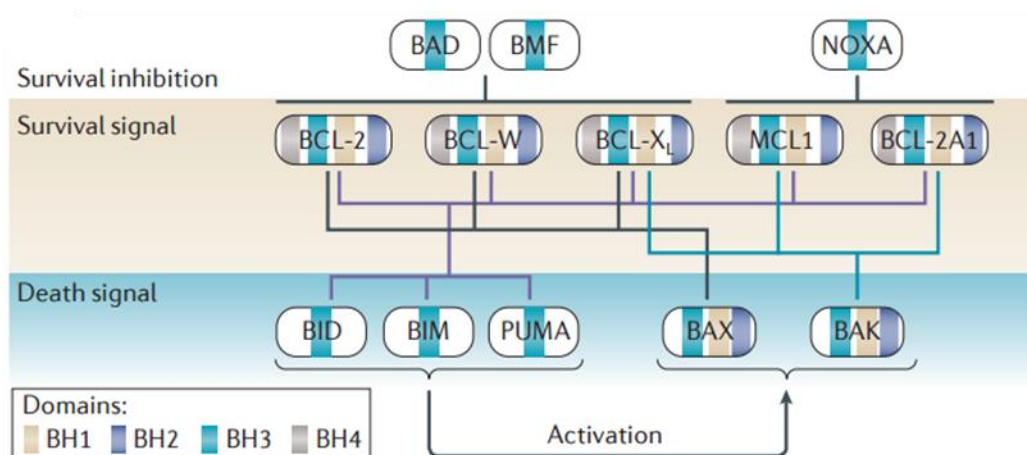
Représentation en ruban de la structure de l'interaction entre BCL-xL (bleu) et le domaine BH3 de BAK (rose) obtenue par la technique de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire. Les domaines BH1, BH2 et BH3 de BCL-xL appartiennent à la poche hydrophobe de cette protéine, dans



laquelle vient s'enchâsser le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques telles que BAX (modifié d'après Sattler et al., 1997)

### **b. Pro-apoptotiques effecteurs : BAX et BAK**

Bien que tous les membres anti-apoptotiques jouent un rôle dans ce phénomène de survie, ils ne sont pas tous capables d'inhiber BAX et BAK avec la même efficacité. En effet, il est décrit que BCL-xL inhibe BAX et BAK, BCL-2 et BCL-w inhibent préférentiellement BAX, alors que MCL-1 interagit avec uniquement avec BAK (Willis et al., 2005, Juin et al., 2013, **figure 14**).



**Figure 14 : Réseau d'interactions décrites entre les protéines de la famille de BCL-2**

Les membres anti-apoptotiques assurent la survie cellulaire en empêchant les protéines pro-apoptotiques de déclencher l'apoptose mitochondriale. En l'absence de protéines anti-apoptotiques fonctionnelles, l'expression de BAX et BAK combinée à celle de BIM, BID et PUMA (capables d'activer BAX et BAK) aboutit à la mort cellulaire. BAD, BMF et NOXA sont quant à elles capables d'inhiber la fonction de survie assurée par les protéines anti-apoptotiques en interagissant directement avec elles. Les lignes reliant les protéines entre elles représentent les interactions décrites dans la littérature. Les domaines BH de chaque protéine sont également représentés (d'après Juin et al., 2013).

Les anti-apoptotiques jouent également un rôle dans la localisation de BAX à la mitochondrie, celui-ci étant majoritairement cytosolique sous sa forme inactive (Wolter et al., 1997). De plus, suite à son interaction avec BAX à la mitochondrie, il a été décrit que BCL-xL est capable de rétrotransloquer BAX au cytosol (Edlich et al., 2011). Ce phénomène empêche une accumulation de BAX aux mitochondries qui les rendrait vulnérables à la MOMP en favorisant l'auto-activation de BAX. BAK est également capable de rétrotranslocation en absence de signaux pro-apoptotiques (Todt et al., 2015). En outre, notre équipe a montré un rôle de BCL-xL dans le maintien d'un BAX actif dans les cellules. En effet, BCL-xL se lie à BAX lorsque

celui-ci expose son domaine BH3 (= BAX « actif ») et la liaison d'un BAX inactif à BCL-xL promeut l'exposition de son domaine BH3, favorisant le maintien d'un BAX déplié (Gautier et al., 2011). Au-delà de la simple séquestration de BAX, BCL-xL favorise donc son maintien sous une conformation active. La cellule dispose alors d'une fraction de BAX actif rapidement mobilisable pour engager la MOMP.

### ***c. Protéines pro-apoptotiques à BH3-seul***

#### **1. Pro-apoptotiques à BH3-seul sensibilisateurs**

Les membres pro-apoptotiques à BH3-seul sont des régulateurs de l'activité des protéines anti-apoptotiques et de BAX et BAK. Les BH3-seuls sensibilisateurs (BAD, NOXA, BIK, BMF, HRK) induits sous un stress apoptotique régulent la formation des complexes entre les anti-apoptotiques et les effecteurs BAX ou BAK en entrant en compétition avec ces effecteurs pour l'interaction au niveau de la poche hydrophobe des anti-apoptotiques. De façon similaire, ils sont capables de déplacer des membres pro-apoptotiques BH3-seuls activateurs liés aux anti-apoptotiques au niveau de leur sillon hydrophobe.

L'induction du BH3-seul sensibilisateur NOXA par p53 suite à un stress peut entraîner le déplacement du BH3-seul activateur PUMA de MCL-1, concourant à l'activation de BAX et au déclenchement du processus apoptotique (Nakajima and Tanaka, 2011). NOXA a été le premier BH3-seul décrit comme cible transcriptionnelle de p53 (Oda et al., 2000). BAD est impliqué dans le déclenchement de l'apoptose sous privation de facteurs de croissance. Deux formes de BAD existent : elles sont obtenues par l'utilisation de deux sites d'initiation de la traduction et leur activité est régulée par des phosphorylations réalisées par des kinases (comme AKT (Datta et al., 1997) et RAF1 (Wang et al., 1996)) activées par des signaux de croissance. Sous un stress induit par la privation de facteurs de croissance, BAD se trouve déphosphorylé par des phosphatases telles que PP1 (Ayllón et al., 2000), ce qui entraîne sa translocation à la mitochondrie où il exerce alors son activité pro-apoptotique. BIK est induit par les facteurs de transcription p53 et E2F1. Lorsqu'il est induit, il est transloqué aux membranes des mitochondries et du réticulum endoplasmique. Son activité est régulée par des phosphorylations : une forme de BIK non phosphorylable voit son activité pro-apoptotique diminuée, bien



qu'elle soit encore capable de se lier aux anti-apoptotiques (Verma et al., 2001). Le BH3-seul sensibilisateur BMF interagit avec la protéine DYNEINE présente au niveau des microfilaments d'ACTINE. Une perte d'adhésion cellulaire constitue un signal s'activation des fonctions de BMF (Puthalakath et al., 2001). Enfin, l'expression du BH3-seul sensibilisateur HRK est induite par le facteur de transcription E2F1 suite à une privation des cellules en facteurs de croissance (Sanz et al., 2000).

Les BH3-seuls sensibilisateurs présentent des sélectivités dans leurs interactions avec les anti-apoptotiques (Chen et al., 2005) : BAD et BMF inhibent spécifiquement BCL-2, BCL-w et BCL-xL ; BIK interagit quant à lui avec BCL-xL, BCL-w, et dans une moindre affinité avec BCL-2A1 (= BFL-1) et MCL-1 ; NOXA est capable d'interagir avec MCL-1 (Deng et al., 2007) et HRK interagit uniquement avec BCL-xL. Plus récemment, il a été montré que NOXA est capable de lier également BCL-2A1. Contrairement aux autres BH3-seuls, NOXA possède une séquence d'adressage au protéasome indépendante de l'ubiquitination sur son domaine C-terminal (Pang et al., 2014). En interagissant avec MCL-1, NOXA l'inhibe et engage également son envoi au protéasome pour sa dégradation (Czabotar et al., 2007) : en plus de son rôle d'inhibiteur, NOXA régule la stabilité des anti-apoptotiques. Bien qu'une interaction préférentielle de NOXA avec MCL-1 et BCL-2A1 ait été montrée, celui-ci interagit aussi avec BCL-xL, mais avec une affinité moindre (Lopez et al., 2010).

## 2. Pro-apoptotiques à BH3-seuls activateurs

Les BH3-seuls dits activateurs (PUMA, BIM, BID) se lient aux pro-apoptotiques effecteurs afin de déclencher leur activation et sont séquestrés par les anti-apoptotiques : les membres anti-apoptotiques inhibant l'apoptose à la fois en inhibant les effecteurs BAX et BAK et en séquestrant les BH3-seuls activateurs dans leur poche hydrophobe (Llambi et al., 2011) (**figure 14**).

Le BH3-seul activateur BIM existe sous trois formes obtenues par épissage alternatif : BIM-EL (BIM Extra Large), BIM-L (BIM-Large) and BIM-S (BIM-Small). L'expression de BIM est induite par le facteur de transcription FOXO3A lors de privation en cytokines (Dijkers et al., 2000) et par la voie de signalisation

RAF1/MEK/ERK lors de perte d'adhésion cellulaire (Reginato et al., 2003). BIM se localise au niveau des microtubules ce qui suggère qu'il peut être activé suite à une perturbation du cytosquelette. Lors d'une irradiation par des UV, BIM est phosphorylé par la kinase JNK ce qui provoque son détachement des microtubules et son adressage à la mitochondrie lui permettant d'exercer ses fonctions pro-apoptotiques (Lei and Davis, 2003). La phosphorylation de BIM par ERK, suivie de son ubiquitination permet quant à elle son adressage au protéasome, régulant ainsi sa dégradation (Akiyama et al., 2003).

BID est un BH3-seul produit sous forme inactive suite à l'activation de p53. Il est activé suite à un clivage protéolytique par la CASPASE 8 afin de générer la forme tBID. La CASPASE-8, activée par la voie d'apoptose extrinsèque, permet d'amplifier le signal apoptotique en activant l'apoptose mitochondriale via le clivage de BID. De plus, BID peut être clivé par des cathepsines (protéases lysosomales) (Droga-Mazovec et al., 2008). BID est également régulé par phosphorylation par la kinase ATM lors de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. Ainsi, une forme de BID non phosphorylable augmente la résistance des cellules à la mort sous traitement génotoxique (Kamer et al., 2005).

Plusieurs isoformes du BH3-seul PUMA existent (**Figure 15**) : l'épissage alternatif du gène BBC3 permet de produire quatre isoformes de PUMA possédant ou non un domaine BH3. Ainsi, les protéines PUMA-alpha et PUMA-beta contiennent un domaine BH3 et sont impliquées dans la régulation de l'apoptose mitochondriale. Les deux autres isoformes décrites de PUMA (PUMA-gamma et PUMA-delta) ne possèdent pas de domaine BH3 et leur fonction reste à ce jour indéterminée (Nakano and Vousden, 2001).

<p><b>PUMA alpha (193 AA) = BBC3 isoform 4</b></p> <p>1 mararqegss pepveglard gprpflgrl vpsavscglc epglaaapaa ptllpaaylc  61 aptappavta alggswpgg prsrprgprp dggcpslsia eqhlespvps apgalaggpt  121 qaapgvrg ee <b>eqwarelgaqlrrmaddlna qyerrrqqeeq</b> qrhrrpswrv lynlimgllp  181 lprghrapem epn</p> <p><b>PUMA beta (131 AA) = BBC3 isoform 2</b></p> <p>1 mkfmgmsaqa cpcqvpraas ttwvpcqicg pqpslsiaeq hlespvpsap galaggptqa  61 apgvrg eeeq <b>warelgaqlr maddlnaqy</b> errrqqeeqr hrpswrvly niimglllp  121 rghrapemep n</p> <p><b>PUMA gamma (261 AA) = BBC3 isoform 1</b></p> <p>1 mkfmgmsaqa cpcqvpraas ttwvpcqicg prerhgprtp ggqlpgarrg pgrrpaplp  61 arppgalgsv lrlrarpgc rrrrphpar clplrphrpt rrrrpggfp lawgspqap  121 rpa pgrssal alaggaapgv araqrpggsg grshpggpgs prgggtvpgp drgpaaadgg  181 rpqrvraae trgaaaappl tlegpvqshh gtpaltqgpq sprdgaqlga ctrpvdvrds  241 ggrplppdt lasagdfict m</p> <p><b>PUMA delta (101 AA) = BBC3 isoform 3</b></p> <p>1 mkfmgmsaqa cpcqvpraas ttwvpcqice trgaaaappl tlegpvqshh gtpaltqgpq  61 sprdgaqlga ctrpvdvrds ggrplppdt lasagdfict m</p>	<p><b>BH3 domain</b></p>
--	--------------------------

### Figure 15 : Isoformes de PUMA

L'épissage alternatif du gène BBC3 permet la synthèse de quatre isoformes de PUMA. Les isoformes alpha (isoforme 4) et beta (isoforme 2) possèdent un domaine BH3 (surligné en jaune). L'isoforme 1 de PUMA (PUMA gamma) inclut un exon alternatif dans sa région 5' du fait d'un décalage du cadre de lecture de la séquence lors de la traduction, comparé à l'isoforme 2 (PUMA beta). Ainsi, l'isoforme 1 a la même séquence N-terminale mais est plus longue que l'isoforme 2.

Les deux isoformes possédant un domaine BH3 ont-elles des fonctions différentes ? Une étude a montré que l'exposition de cellules cancéreuses mammaires à un agent cancérigène, le Benzo(a)pyrène, active la synthèse de PUMA-alpha de façon p53-dépendante, corrélant avec le déclenchement de l'apoptose. Or, une diminution de l'expression de PUMA-beta est observée en parallèle dans ces cellules (Tampio et al., 2009). Ceci suggère des fonctions différentes, contexte-dépendantes de ces deux isoformes. Dans le cadre du travail présenté par la suite de ce manuscrit de thèse, nous nous sommes intéressés à l'isoforme PUMA-alpha, induite sous traitement génotoxique de nos lignées cellulaires et corrélée à l'induction de l'apoptose

PUMA a longtemps été considéré comme sensibilisateur mais s'avère en réalité un acteur clé de l'activation de BAX (Cartron et al., 2004), et de BAK (Dai et al., 2014). La mise sous silence de PUMA est suffisante pour diminuer fortement une apoptose dépendante de BAX. De plus, l'induction de PUMA par les facteurs de transcription suppresseurs de tumeur p53 et E2F1 contribue de façon majeure à la réponse apoptotique BAX-dépendante (Yu et al., 2003, Hershko and Ginsberg, 2004). Par ailleurs, PUMA est capable de moduler la conformation de BCL-xL. Le

domaine BH3 de PUMA, intrinsèquement désordonné, s'organise en hélice en s'enchantant dans la poche hydrophobe de ses partenaires. Le tryptophane 71 de PUMA, spécifique de ce BH3-seul, engage une interaction via un empilage ( $\pi$ -stacking) de cycles aromatiques avec l'histidine 113 de BCL-xL (Follis et al., 2013). Cette interaction provoque le dépliement de l'hélice  $\alpha$ 3 de BCL-xL, libérant p53 de BCL-xL et déclenchant l'apoptose. Cette action est spécifique du BH3-seul PUMA.

Si les BH3-seuls activateurs sont inhibés par tous les anti-apoptotiques, ils présentent des sélectivités de liaison avec les effecteurs BAX et BAK : BID active préférentiellement BAK alors que BIM se lie davantage à BAX (Sarosiek et al., 2013). Ainsi, les cellules n'exprimant pas BAK sont résistantes aux traitements requérant l'activation de BID pour l'induction de l'apoptose (inhibiteurs de topoisomérase et TRAIL). Les tumeurs de patients n'exprimant pas BAK répondent donc moins bien aux génotoxiques en clinique.

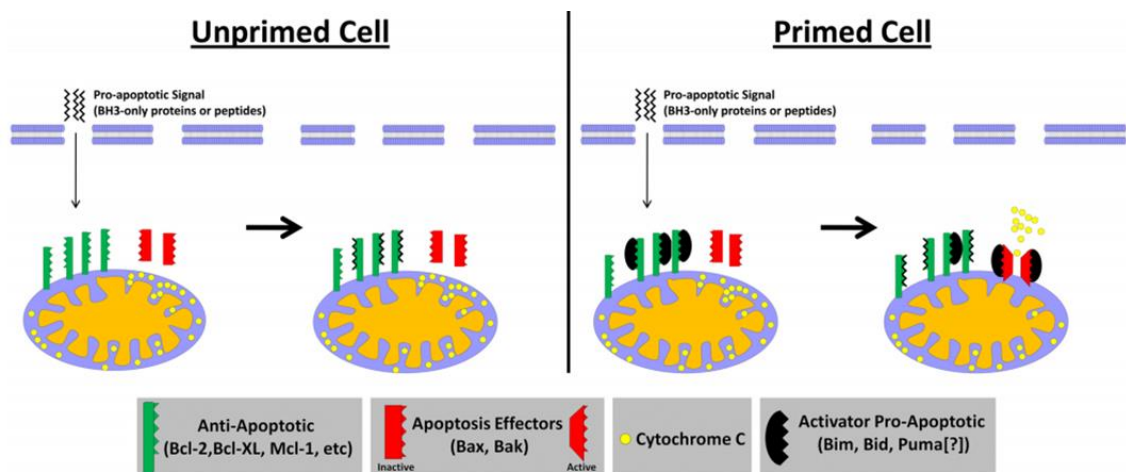
### **3. Le rôle exact de chaque pro-apoptotique à BH3-seul reste à déterminer**

La réalisation de nombreuses études des pro-apoptotiques à BH3-seul sensibilisateurs et activateurs a permis de mieux appréhender leurs mécanismes d'activation et leur activité de senseur de stress cellulaire. Les cellules cancéreuses disposent de nombreuses caractéristiques responsables de la synthèse et de l'activation de protéines à BH3-seul. Il faut cependant prendre en compte le fait que les BH3-seuls ne sont pas tous activés suite aux mêmes stress cellulaires. Ainsi, il a d'ores et déjà été mis en évidence que l'activation d'oncogènes tels que E2F1 et MYC active respectivement les BH3-seuls HRK et BIM. Dans des cellules cancéreuses métastatiques, la perte d'adhésion des cellules à leur microenvironnement entraîne l'activation préférentielle de BMF et BIM. Les cellules cancéreuses privées de nutriments induiront quant à elle l'expression de PUMA, BIM, HRK et BAD. Ces travaux restent à poursuivre afin de déterminer le rôle exact joué par chaque BH3-seul dans chaque contexte cellulaire tumoral.

#### ***d. Amorçage mitochondrial (ou priming)***

Les spécificités de liaisons ainsi que les différences d'affinités entre les membres de la famille de BCL-2 décrivent un réseau complexe d'interactions

contrôlant finement le déclenchement de l'apoptose. L'étude de ce réseau a permis de définir la notion de cellules amorcées (ou primées) ou non pour mourir (Certo et al., 2006). Le fait qu'une cellule soit ou non amorcée dépend du profil de son réseau de protéines de la famille de BCL-2. Ainsi, une cellule amorcée possède des protéines pro-apoptotiques activatrices disponibles mais séquestrées par les anti-apoptotiques à la membrane externe mitochondriale. Un signal apoptotique augmentant les BH3-seuls sensibilisateurs, libérant les BH3-seuls activateurs déclenchera rapidement la mort cellulaire. A l'opposé, une cellule non-amorcée nécessite un signal apoptotique plus fort et prolongé pour sa mort car les anti-apoptotiques ne séquestrent pas de BH3-seuls activateurs (**figure 16**). Une meilleure identification des modalités de ce priming mitochondrial en fonction du contexte cellulaire paraît particulièrement intéressante pour la compréhension de mécanismes de résistances aux traitements actuels. Une étude basée sur l'utilisation de la technique de profilage-BH3 a montré que l'amorçage des mitochondries dans les cellules tumorales primaires corrèle avec la sensibilité des tumeurs à des chimiothérapies (Montero et al., 2015). Le profilage BH3 des cellules tumorales issues de patients pourrait alors être utilisé comme marqueur prédictif de réponse aux chimiothérapies.



**Figure 16 : L'amorçage mitochondrial (priming) détermine la réponse cellulaire à un signal pro-apoptotique.**

Dans des cellules non amorcées (unprimed cells), les signaux pro-apoptotiques sont séquestrés par les protéines anti-apoptotiques présentes à la membrane mitochondriale externe. Dans des cellules amorcées (primed cells), les signaux pro-apoptotiques déplacent les protéines pro-apoptotiques à BH3-seul des protéines anti-apoptotiques. Ces BH3-seuls activateurs sont alors capables de se lier à BAX et BAK pour les activer et déclencher la MOMP (d'après Sarosiek et al., 2013)

#### **IV. Régulation de l'activité des effecteurs BAX et BAK indépendamment de la famille de BCL-2**

L'activation des effecteurs BAX et BAK peut être modulée par des protéines n'appartenant pas à la famille BCL-2. Plusieurs protéines mitochondriales ont été montrées comme modulatrices de l'insertion de BAX à la membrane externe mitochondriale. Ainsi, VDAC2 facilite l'ancrage mitochondrial de BAX de façon constitutive bien que n'étant pas nécessaire à la MOMP (Ma et al., 2014). Le complexe TOM (Translocase of the Outer Mitochondrial membrane), responsable du transport de protéines du cytosol vers l'espace inter-membranaire mitochondrial, et en particulier TOM22, promeut l'insertion de BAX à la mitochondrie (Bellot et al., 2007). Par ailleurs, la protéine DRP1, une GTPase impliquée dans la fission mitochondriale, facilite l'oligomérisation de BAX préalablement activé par tBID (Montessuit et al., 2010).

Les lipides régulent également l'activité des protéines pro-apoptotiques à multi-domaines (Mignard et al., 2014). Ainsi, PGE2 (Prostaglandine E2) est capable de s'associer avec BAX et de promouvoir son adressage à la mitochondrie (Lalier et al., 2007) et le métabolisme des sphingolipides est requis pour le déclenchement de l'apoptose (Chipuk et al., 2012). La composition phospholipidique des membranes semble également jouer un rôle primordial dans l'activation de BAX et BAK : dans des liposomes constitués de phosphatidylcholine, phosphatidylserine et phosphatidylethanolamine, tBID permet l'insertion de BAX à la membrane mais pas son oligomérisation. Ce dernier phénomène étant déclenché en présence de cardiolipines dans les liposomes (Roucou et al., 2002). De plus, il a été montré que BAX est capable de s'ancrer dans la membrane externe mitochondriale au niveau de macrodomaines riches en céramides (Lee et al., 2011). Le niveau de cholestérol dans les membranes de liposomes détermine également leur perméabilisation par BAX. En effet, l'accumulation de cholestérol diminue la fluidité membranaire et l'oligomérisation de BAX (Shamas-Din et al., 2015).

La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par les pro-apoptotiques effecteurs requiert donc une composition particulière de la membrane. Ceci est à mettre en relation avec le fait que BAX et BAK sont a priori capables de perméabiliser les membranes mitochondriales mais pas celles des autres organites

cellulaires. Cette fonction de perméabilisation tend malgré tout à être étendue à la membrane du réticulum endoplasmique. Bien que les interactions de la famille de BCL-2 au réticulum endoplasmique demeurent peu étudiées, il a été décrit que l'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique déclenche une réponse UPR (Unfolded Protein Response) médiée par IRE-1. BAX est capable d'interagir avec IRE-1 à la membrane du réticulum et maintient ainsi son activité de transporteur de protéines du réticulum vers le cytosol. De plus, BAX est capable de former des pores dans la membrane du réticulum, provoquant un transport de calcium vers le cytosol. BCL-2 interagit quant à lui avec IP3R (Rong et al., 2009) et les récepteurs à la ryanodine (RyRs) (Vervliet et al., 2014) à la membrane du réticulum afin de bloquer la libération de calcium provenant du réticulum vers le cytosol. De plus, BCL-2 (Liang et al., 1998) et BCL-xL (Maiuri et al., 2007) interagissent avec BECLIN-1, prévenant ainsi le déclenchement de l'autophagie.

#### **V. Régulation de l'activité des membres de la famille de BCL-2 par des modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles**

De nombreuses régulations transcriptionnelles des gènes codant pour les protéines de la famille de BCL-2 ont été mises en évidence. Parmi elles on peut citer des régulations des pro-apoptotiques mises en jeu dans des voies de signalisation oncogéniques induites par RAS et MYC. La voie RAS, via une inhibition du facteur de transcription FOXO3A (Forkhead box protein O3A) par AKT, peut inhiber la transcription de *BIM*. RAS peut également induire la transcription de *NOXA* suite à l'activation de la voie ERK (Elgendy et al., 2011). L'oncogène MYC régule directement la transcription de *BIM* (Campane et al., 2011) et de *NOXA* (Nikiforov et al., 2007). Cet oncogène influence aussi la transcription de *BAX*, *NOXA* et *PUMA* via son action sur la voie p53. BAK peut être induit par p53 et p73 (Graupner et al., 2011). La transcription des gènes codant pour les protéines anti-apoptotiques est également régulée par de nombreux facteurs. La transcription de *MCL-1* est par exemple régulée par HIF-1 (Hypoxia Induced Factor-1), STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5), qui sont des facteurs de transcription induit par des voies oncogéniques (Akgul, 2009). La translocation t(14;18) observée dans des cas de lymphomes et positionnant le gène codant pour BCL-2 sous le contrôle du promoteur des chaînes lourdes des immunoglobulines constitue une régulation

transcriptionnelle. De plus, les familles Rel/NFkB (Chen et al., 2000) et STAT ont été décrites comme régulant la transcription de BCL-xL.

La régulation de l'activité des protéines de la famille BCL-2 passe également par des modifications post-traductionnelles. Lors d'un arrêt mitotique, des phosphorylations des membres de la famille de BCL-2 participent à la détermination de la destinée cellulaire. Lors d'un arrêt mitotique induit par un traitement chimiothérapeutique (comme le taxol), l'activité de CDK1 augmente. Il en résulte une augmentation de la phosphorylation des anti-apoptotiques tels que BCL-xL et MCL-1, induisant la mort de la cellule via une perturbation de leurs interactions avec les pro-apoptotiques (Sakurikar et al., 2012). Le devenir de la cellule est dans ce cas dépendant de la phosphorylation des anti-apoptotiques. Ainsi, notre équipe a montré que la phosphorylation du résidu sérine 62 de la boucle non structurée de BCL-xL observée lors d'un arrêt mitotique favorise la libération du pro-apoptotique BAX suite à un traitement avec un BH3 mimétique (Bah et al., 2014). Certaines phosphorylations, à l'inverse, protègent la cellule de la mort mitotique. C'est le cas de la phosphorylation de BCL-2 sur la sérine 70, augmentant son affinité pour BAK et BIM et protégeant la cellule de la mort mitotique (Dai et al., 2013).

La phosphorylation de protéines à BH3-seul est un événement pouvant également induire la mort lors d'un arrêt mitotique (Wang et al., 2014). La phosphorylation du résidu S66 de BID favorise alors la mort cellulaire. De plus, BIM présente de multiples sites de phosphorylation, certains régulant sa liaison aux anti-apoptotiques, d'autres modulant sa dégradation par le protéasome (Hübner et al., 2008). L'effecteur BAX peut également être phosphorylé par diverses voies telles que PI3K/AKT, JNK, GSK-3 $\beta$  ou encore p38, mais les conditions et les conséquences de ces phosphorylations restent à élucider (Wang et al., 2010). Ainsi, la phosphorylation de la sérine 184 par la voie AKT participe au maintien de la localisation cytosolique de BAX (Gardai et al., 2004), inhibant sa fonction pro-apoptotique, alors que la phosphorylation de la sérine 163 favoriserait la mort cellulaire. De plus, la déphosphorylation des thréonines 172, 174 et 186 de BAX par la phosphatase Wip1 (Wild-type p53-Induced Phosphatase 1) induite par p53 inhiberait l'apoptose lors de l'irradiation (Song et al., 2013).



D'autres modifications post-traductionnelles modulent la voie intrinsèque de l'apoptose. PARKIN, l'ubiquitine-ligase impliquée dans la mitophagie, régule la fonction pro-apoptotique de BAX. Un travail a montré que l'extinction de PARKIN dans des neurones primaires murins sensibilise les cellules à un agent génotoxique (l'étoposide) de façon dépendante de BAX, alors que la surexpression de PARKIN bloque la mort en réponse à divers stimuli (Johnson et al., 2012). La poursuite de cette étude a mis en évidence l'ubiquitination de BAX par PARKIN sur deux résidus, en N-terminal et sur le BH3, ce qui prévient la localisation mitochondriale du pro-apoptotique, et favorise sa dégradation protéosomale (Charan et al., 2014). A l'inverse, PARKIN sensibiliserait à l'apoptose en adressant MCL-1 au protéasome (Carroll et al., 2014). PARKIN semble alors agir comme un senseur de stress cellulaire : favorisant la survie (mitophagie) ou la mort cellulaire (apoptose) en fonction du degré de dommages des mitochondries.

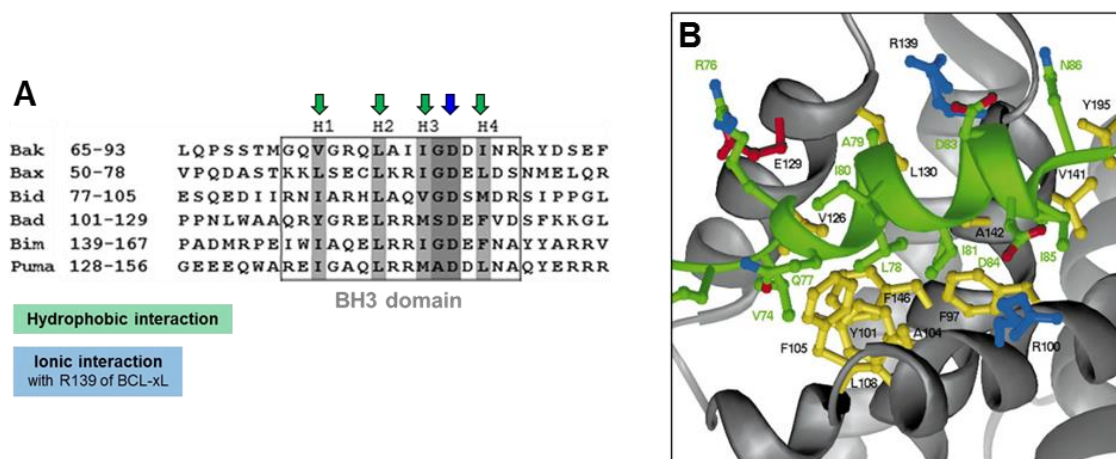
## **B. Ciblage thérapeutique du réseau dynamique impliquant les protéines de la famille de BCL-2**

### **I. Structure des interactions entre anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille de BCL-2**

L'interaction entre un domaine BH3 d'une protéine pro-apoptotique et une protéine anti-apoptotique implique quatre résidus hydrophobes hautement conservés à la surface du BH3 structuré en hélice  $\alpha$  (nommés H1 à H4 et représentés **figure 17**) (Sattler et al., 1997). Des études de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire et de cristallographie ont permis de montrer que ces quatre résidus interagissent avec quatre poches hydrophobes (nommées P1 à P4) contenues dans le sillon hydrophobe des anti-apoptotiques. Cette liaison est renforcée par une interaction électrostatique entre une arginine présente entre les poches P3 et P4 des anti-apoptotiques, et un aspartate sur le domaine BH3 des pro-apoptotiques. A noter que les poches P2 et P4 sont particulièrement importantes dans la liaison des peptides BH3 avec les anti-apoptotiques (Lessene et al., 2013).

Ces résidus et poches hydrophobes sont conservés d'une protéine à l'autre, mais différent en terme de nature et de position, participant à la sélectivité des liaisons entre les protéines (Lessene et al., 2008). Par exemple, l'existence d'un

résidu supplémentaire dans le domaine BH1 de MCL-1 provoque une diminution de l'exposition d'un résidu arginine conservé et impliqué dans la liaison avec un acide aspartique présent dans le domaine BH3 de pro-apoptotiques. De ce fait, ce résidu est moins exposé dans MCL-1 que dans BCL-xL. De plus, une étude a mis en évidence qu'au-delà de différences d'affinités, des différences de stabilité des protéines anti-apoptotiques dans les cellules affectent leur efficacité à protéger de la mort (Rooswinkel et al., 2014). En effet, il a été montré que BCL-xL, BCL-2, BCL-w, MCL-1 et BCL-2A1 protègent d'une mort induite par divers agents anti-tumoraux lorsqu'ils sont exprimés à niveaux équivalents dans la cellule. Cependant, MCL-1 et BCL-2A1 sont en réalité moins efficaces que leurs homologues du fait de l'induction de leur dégradation protéasomale induite par les traitements.



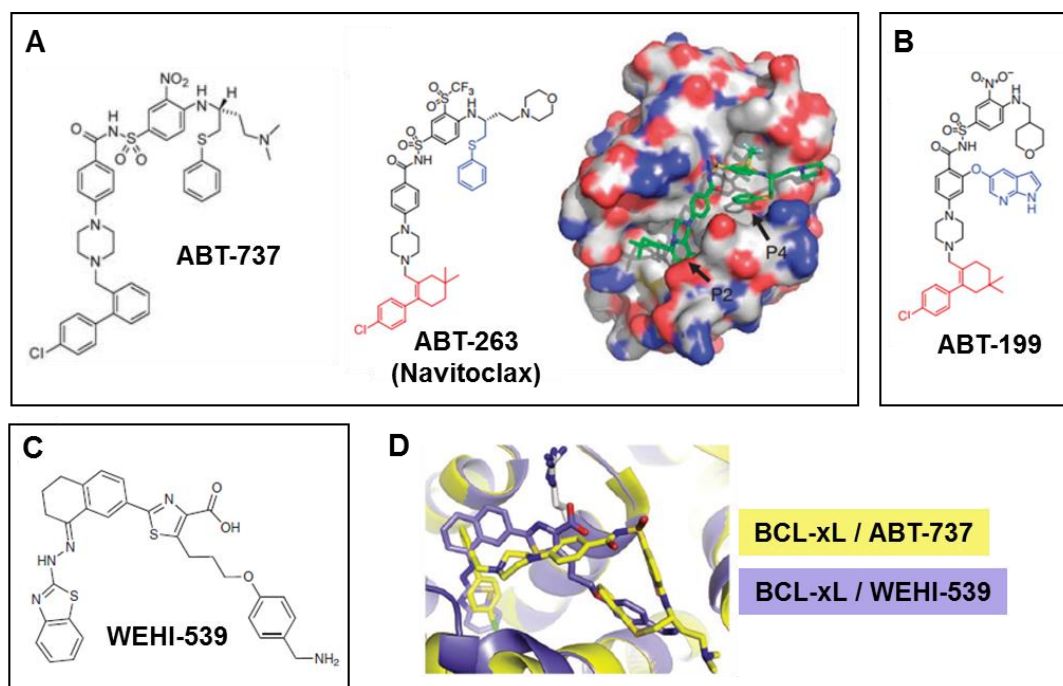
**Figure 17 : Structure des interactions anti-apoptotiques / pro-apoptotiques**

(A) Résidus du domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques impliqués dans l'interaction avec la poche hydrophobe des anti-apoptotiques (en vert et bleu). (B) Représentation en trois dimensions des résidus impliqués dans l'interaction entre BCL-xL (gris) et le peptide BH3 de BAK (vert). Les résidus de BCL-xL impliqués dans des interactions hydrophobes sont représentés en jaune. Les chaînes chargées positivement et négativement sont représentées en bleu et rouge respectivement (d'après Sattler et al., 1997).

## II. Développement et utilisation de BH3-mimétiques pour le ciblage des anti-apoptotiques

La surexpression des protéines anti-apoptotiques homologues de BCL-2 est souvent associée à l'initiation, la progression de nombreux cancers et est corrélée à la résistance aux thérapies anti-tumorales (Adams and Cory, 2007). Les anti-apoptotiques sont fréquemment surexprimés dans les tumeurs hématopoïétiques comme dans les tumeurs solides (Tsujiyama, 1989, O'Kane et al., 2006) et sont

impliqués dans la résistance aux chimiothérapies. En effet, une corrélation négative entre le niveau d'expression de BCL-xL et la sensibilité à des chimiothérapies a été établie sur lignées cellulaires (Amundson et al., 2000). Le même type de corrélation a été établie concernant l'expression protéique de BCL-2 et la chimiorésistance sur échantillons cliniques de leucémies aiguës myéloïdes (Mehta et al., 2013). Ces dernières années, des stratégies thérapeutiques ont été mises au point afin de bloquer les fonctions anti-apoptotiques de ces protéines. Ainsi, des molécules ont été synthétisées afin de rompre les interactions entre BCL-2 ou BCL-xL et leurs partenaires pro-apoptotiques. Ces molécules appelées « BH3-mimétiques » (**figure 18**) se fixent spécifiquement dans la poche hydrophobe des anti-apoptotiques, libérant BAX, BAK, BIM, BID et PUMA, qui peuvent alors exercer leurs fonctions pro-apoptotiques. Ces BH3-mimétiques ont différentes efficacités selon leurs spécificités et affinités pour les différents anti-apoptotiques (Ni Chonghaile and Letai, 2008). L'ABT-737 se fixe spécifiquement à BCL-2, BCL-xL et BCL-w (Oltersdorf et al., 2005) alors que le WEHI-539 est spécifique de BCL-xL (Lessene et al., 2013). Le potentiel apoptotique des BH3-mimétiques a été démontré sur des lignées cellulaires ainsi que sur des cellules cancéreuses primaires, notamment lors du développement de l'ABT-737 et de son analogue l'ABT-263/le navitoclax (Tse et al., 2008) utilisable par voie orale en essais cliniques. Les BH3-mimétiques agissent en synergie avec diverses chimiothérapies classiques dans plusieurs types de cancers (Trudel et al., 2007, Tagscherer et al., 2008, Kutuk and Letai, 2008). Ces molécules peuvent également induire une apoptose en agent simple dans certains cas de tumeurs hématopoïétiques (Kline et al., 2007). De plus, un travail récent montre que BCL-xL régule l'adressage mitochondrial de BAX, et que la rupture des interactions BAX/BCL-xL par l'ABT-737 induit l'apoptose en permettant la libération de molécules de BAX activées à la mitochondrie (Renault et al., 2015). L'inhibition des anti-apoptotiques de la famille BCL-2 apparaît donc comme une stratégie prometteuse pour le traitement du cancer.



**Figure 18 : BH3-mimétiques développés pour le ciblage de BCL-2 et BCL-xL**

(A) Structures de l'ABT-737 et de son analogue utilisé en clinique, l'ABT-263 (ou navitoclax). Ces molécules sont des inhibiteurs de BCL-2, BCL-xL et BCL-w. La structure du complexe ABT-263 / BCL-2 déterminée par cristallographie est également représentée. (B) Structure chimique de l'ABT-199, inhibiteur de BCL-2. (C) Structure chimique du WEHI-539, inhibiteur de BCL-xL. (D) Représentation superposant les liaisons de l'ABT-737 et du WEHI-539 à la poche hydrophobe de BCL-xL. Le complexe ABT-737/BCL-xL est représenté en jaune et le complexe WEHI-539/BCL-xL en violet (d'après Oltersdorf et al., 2005, Souers et al., 2013, Lessene et al., 2013)

### III. Limites à l'utilisation des BH3-mimétiques

L'utilisation de molécules spécifiques de BCL-2 et BCL-xL peut être limitée par certaines modifications post-traductionnelles et par l'expression de MCL-1 (Konopleva et al., 2006). D'autre part, des études cliniques ont révélé que la fixation du navitoclax (ABT-263) sur BCL-xL provoque une thrombopénie chez les patients du fait d'une apoptose massive des plaquettes sanguines qui sont dépendantes de BCL-xL pour leur survie (Schoenwaelder et al., 2011). Des stratégies plus ciblées sont actuellement développées pour pallier à la survenue de ces effets indésirables. On peut citer le ciblage unique de BCL-2 par l'ABT-199 (Souers et al., 2013), le ciblage unique de BCL-xL par le WEHI-539, qui permettrait de pouvoir diminuer les doses utilisées, limitant ainsi la toxicité sur les tissus sains (Lessene et al., 2013), ou encore le ciblage concomitant de BFL-1 permettant de lever les phénomènes de résistance à l'ABT-737 (par un composé "BDM\_53787" identifié par Mathieu et al., 2014). Les difficultés de développement de ces stratégies ciblant les anti-

apoptotiques de la famille de BCL-2 sont liées à l'homologie importante des structures de leurs poches hydrophobes.

#### **IV. Nouvelles stratégies de ciblage du réseau BCL-2**

Les BH3-mimétiques synthétisés jusqu'à présent n'inhibent pas efficacement l'ensemble des homologues anti-apoptotiques de BCL-2. En effet, l'ABT-199 et le WEHI-539 ont été synthétisés pour cibler efficacement BCL-2 et BCL-xL respectivement. Or, à ce jour, il n'existe pas de composé couramment utilisable afin de cibler MCL-1, protéine impliquée dans la résistance de certaines cellules aux traitements actuels (Glaser et al., 2012). Cependant, de récents travaux ont permis d'identifier une molécule, baptisée A-1210477 et capable d'inhiber la fonction anti-apoptotique de MCL-1 (Bruncko et al., 2015). Ce composé a été validé sur des lignées cancéreuses mammaires (Xiao et al., 2015). De plus, A-1210477 agit en synergie avec le navitoclax (ABT-263) afin d'induire la mort d'un panel de lignées cellulaires (Leverson et al., 2015). Un autre travail a identifié une oligopyridine (le pyridoclax) inhibant directement MCL-1 et capable d'induire une apoptose lors d'un ciblage concomitant de BCL-xL par des BH3-mimétiques ou des ARN interférence dans des lignées cancéreuses ovariennes, pulmonaires et mésothéliales (Gloaguen et al., 2015). Ces résultats semblent très encourageants pour le développement de thérapies permettant de lever la résistance à la mort dépendante de MCL-1 dans de nombreux cancers. La résistance à la mort due à MCL-1 pourrait également être levée grâce au ciblage de la machinerie d'ubiquitination des anti-apoptotiques. Une favorisation de la dégradation de MCL-1 par un meilleur adressage au protéasome viendrait se combiner à l'utilisation de BH3-mimétiques afin d'augmenter l'efficacité du ciblage des protéines anti-apoptotiques (Rooswinkel et al., 2014).

Outre le développement de BH3-mimétiques plus efficaces, d'autres stratégies ont émergé récemment. C'est le cas d'études s'intéressant au développement d'inhibiteurs ciblant le domaine BH4 de BCL-2 (Han et al., 2015). En effet, il a été montré que BCL-2 est capable d'interagir avec BAX via l'engagement de son domaine BH4 avec l'hélice 6 de BAX. Cette interaction, tout comme l'interaction canonique « poche hydrophobe/domaine BH3 » est impliquée dans l'inhibition de l'oligomérisation de BAX (Ding et al., 2010). Le ciblage de cette seconde interface de liaison paraît donc prometteur. Par ailleurs, des laboratoires développent de

nouveaux composés destinés non pas à inhiber les anti-apoptotiques, mais à activer directement BAX en se liant à son site non canonique (cf mécanismes d'activation de BAX décrits **figure 12**). Dans ce sens, la molécule BAM7 a été identifiée par Gavathiotis et al. en 2012 et optimisée par Stornaiuolo et al. en 2015. La combinaison d'approches thérapeutiques utilisant à la fois des BH3-mimétiques et de nouveaux composés ciblant d'autres interfaces de liaison présentes à la surface des protéines de la famille de BCL-2 pourrait permettre de contrecarrer des résistances aux traitements actuels dues à un ciblage incomplet de ces protéines. Une autre stratégie thérapeutique est basée sur l'utilisation de peptides de BAX capables de former des pores dans la membrane externe mitochondriale. Il a été montré que l'injection de ces peptides en péri-tumoral dans un modèle de xénogreffe chez la souris nude permet la régression tumorale (Valero et al., 2011). De plus, l'identification de marqueurs prédictifs de réponse aux BH3-mimétiques permettrait une sélection plus fine des groupes de patients à traiter par ces molécules. Dans ce sens, un travail mené ex-vivo sur des tranches de tumeurs ovariennes traitées par l'ABT-737 a mis en évidence que l'expression de BIM dans les tumeurs, associée à de faibles niveaux de MCL-1 et phospho-Erk1/2 est corrélée à une meilleure induction de l'apoptose (Lheureux et al., 2015). En outre, le ciblage efficace de la famille de BCL-2 nécessite une compréhension et une prise en compte des fonctions globales exercées par ces protéines, et ce au-delà de leurs fonctions de régulation de l'apoptose.

## **V. Vers une meilleure compréhension du réseau BCL-2 pour un meilleur ciblage en thérapie**

### ***a. Vers une meilleure définition du domaine d'interaction entre anti et pro-apoptotiques***

Les protéines anti-apoptotiques inhibent l'induction de la MOMP en agissant en partie comme des dominants négatifs de BAX et BAK. En effet, par leur similarité structurelle au niveau de leur sillon hydrophobe, les anti-apoptotiques entrent en compétition avec BAX et BAK pour la liaison aux BH3-seuls activateurs (Billen et al., 2008). Les BH3-activateurs se lient ainsi de façon plus stable avec les anti-apoptotiques qu'avec les effecteurs BAX et BAK. Les interactions des anti-

apoptotiques avec les protéines à BH3-seul et les effecteurs BAX et BAK permettent l'inhibition de la perméabilisation mitochondriale, engageant des motifs structuraux communs, mais selon différentes modalités : les niveaux de protéines anti-apoptotiques nécessaires au maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale varient en fonction de la nature et de la quantité de pro-apoptotiques présents. De plus, tous les anti-apoptotiques n'ont pas une sensibilité équivalente à la dérégulation par les BH3-seuls sensibilisateurs (capables d'interagir uniquement avec les anti-apoptotiques) ou des BH3-mimétiques. Ceci est dû au fait qu'il existe des différences dans la structure des sillons hydrophobes de BCL-2 et ses homologues, pouvant expliquer l'engagement préférentiel de certains BH3-seuls sensibilisateurs et de BAX et BAK dans ce sillon. Ces différences mettent en évidence la complémentarité des protéines anti-apoptotiques dans la régulation de la survie cellulaire. Un ciblage efficace passe également par une meilleure compréhension des modalités d'interactions entre pro et anti-apoptotiques. Aussi, une analyse de l'ensemble des structures de BCL-xL libre publiées et figurant dans la Protein Data Bank a montré que seules six structures sur vingt ont une conformation leur permettant de lier un domaine BH3 dans leur poche hydrophobe. De plus, neuf des structures sont capables de lier un domaine BH3 au niveau d'un second site présent sur BCL-xL, homologue à celui décrit sur BAX (Bohnuud et al., 2014). Il serait donc primordial de comprendre dans quelle condition chacun de ces modes d'interactions est présent afin de pouvoir cibler au mieux les anti-apoptotiques.

### ***b. Développement du ciblage de BCL-xL***

Les protéines anti-apoptotiques étant fréquemment surexprimées dans les cellules cancéreuses et contribuant à la résistance aux thérapies, il paraît essentiel de développer des composés inhibant spécifiquement leurs actions, et celle de BCL-xL en particulier. En effet, cette protéine est surexprimée dans de nombreux types de cancers : mammaire (Olopade et al., 1997), cutané (Foreman et al., 1996), colorectal (Jin-Song et al., 2011). De plus, BCL-xL est l'acteur anti-apoptotique interagissant avec le plus large panel de pro-apoptotiques de sa famille. Enfin, sa surexpression a été identifiée comme étant un marqueur de chimiorésistance (Villedieu et al., 2007). Bien que les effets secondaires de thrombopénie observés

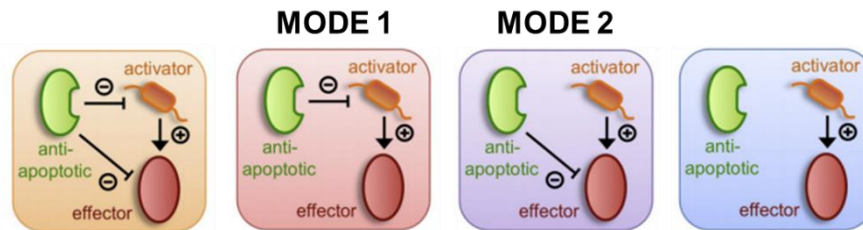
chez les patients sous traitement par l'ABT-263 aient été attribués au ciblage de BCL-xL dans les plaquettes, ce composé a également été décrit comme ciblant de façon peu efficace BCL-xL dans les cancers (Mérino et al., 2012, Rooswinkel et al., 2012). Par conséquent, des paramètres permettant de déterminer si l'activité anti-apoptotique de BCL-xL est contrecarrée efficacement par des BH3-mimétiques restent à déterminer afin d'utiliser ces composés de manière optimale. Cet aspect est d'une importance primordiale dans des contextes de traitements chimiothérapeutiques dans lesquels BCL-xL est un frein clairement avéré à la mort des cellules cancéreuses.

### ***c. Vers la compréhension des mécanismes de résistance induits par BCL-xL***

Certaines interactions mettant en jeu BCL-xL sont difficiles à contrecarrer et sont responsables de résistances. Ce phénomène a été mis en évidence par un travail sur des protéines chimériques composées de domaines BH3 de pro-apoptotiques insérés dans la séquence de tBID (forme tronquée, active de BID), capables d'activer BAX et BAK, et d'être séquestrées seulement par certains anti-apoptotiques (Llambi et al., 2011). Ceci a permis l'identification de deux modes d'action des anti-apoptotiques (**figure 19**) : dans le premier (qualifié de « mode 1 ») les protéines anti-apoptotiques bloquent la MOMP par séquestration des BH3-seuls activateurs alors que dans le second (« mode 2 ») les anti-apoptotiques inhibent directement BAX et BAK. Le « mode 1 » semble moins efficace et plus facile à cibler par les BH3-mimétiques. Ceci pourrait expliquer des différences de réponse aux BH3-mimétiques observées en fonction des contextes cellulaires. En condition basale, BAX et BAK se trouvent à la membrane de la mitochondrie, dans un état inactif. Lors d'une stimulation pro-apoptotique, les BH3-seuls activateurs produits dans la cellule sont séquestrés par les anti-apoptotiques (= « mode 1 »). Ces interactions sont décrites comme réversibles ce qui contribue à la présence d'une faible quantité de BH3-activateur disponible pour activer BAX et BAK. Lorsque le stress pro-apoptotique augmente, la production de BH3-seuls activateurs augmente également : il y a alors davantage de BH3-seuls activateurs capables d'activer BAX et BAK. Mais dans cette situation, il s'avère que BAX et BAK se trouvent inhibés par les anti-apoptotiques (= « mode 2 »). Puisque les complexes décrits dans le « mode



1 » sont moins stables que ceux décrits dans le « mode 2 », des cellules soumises à un faible stress répondront mieux à l'induction de la mort par un traitement aux BH3-mimétiques. Ce modèle apporte une possible explication au fait que, de façon paradoxale, des cellules soumises à un fort stress apoptotique sont plus résistantes à la mort induite par les BH3-mimétiques que celles exposées à un plus faible stress.



**Figure 19 : Possibles modes de régulation de la MOMP par les protéines anti-apoptotiques de la famille de BCL-2**

Quatre possibilités de modes d'interactions des anti-apoptotiques homologues de BCL-2 avec leurs contre-parties pro-apoptotiques sont présentées, dont MODE 1 et MODE 2 décrits par l'équipe de Douglas Green (d'après Llambi et al., 2011).

Une autre étude a porté sur la mesure des liaisons entre un BH3-activateur (BIM ou BID) ou un BH3-sensibilisateur (BAD) et BCL-xL ou BCL-2 sur cellules entières vivantes (Aranovich et al., 2012). Ce travail réalisé par des techniques de FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) et de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) a montré que la liaison de ces protéines à la mitochondrie se fait de façon similaire aux résultats obtenus par des expériences acellulaires. Cependant, la présence de mutations dans le BH3 de BIM, inhibant son interaction avec BCL-xL et BCL-2 in vitro, a un effet moindre en cellule entière. De plus, de façon notable, l'utilisation d'ABT-737 inhibe les interactions de BAD ou BID avec les anti-apoptotiques, mais pas les interactions BIM/BCL-2 et BIM/BCL-xL. Ainsi, l'efficacité des BH3-mimétiques est seulement partielle en cellule entière du fait du caractère réfractaire de certaines interactions. La détermination de la nature des complexes impliquant les protéines de la famille de BCL-2 en fonction du contexte cellulaire est donc déterminante pour une meilleure compréhension des mécanismes de résistances aux traitements ciblant cette famille de protéines.

## C. Objectifs du projet 1

Une meilleure compréhension du réseau d'interactions engagées par la famille de BCL-2 implique une prise en compte de l'ensemble des protéines impliquées. Peu d'études à ce jour ont été consacrées aux mécanismes régissant les interactions entre le BH3-seul activateur PUMA et les autres membres de la famille de BCL-2. PUMA est une cible transcriptionnelle de p53, induite sous traitement génotoxique (Yuan et al., 2011) et requise pour l'induction d'une apoptose BAX-dépendante de cellules cancéreuses humaines. Le travail de Yu *et al.* publié en 2003 montre que l'expression du facteur de transcription p53 dans la lignée HCT116 induit un arrêt de croissance dû à l'activation de l'inhibiteur de kinase cycline-dépendant p21. Une mise sous silence de p21 sensibilise à l'apoptose mais si le gène codant pour PUMA est également mis sous silence dans ces cellules, l'apoptose est prévenue. Ces résultats suggèrent que PUMA et p21 déterminent la réponse de la cellule suite à une activation de p53. Par la suite, les effets de PUMA sur l'apoptose ont été évalués après surexpression de p53 et dommage à l'ADN. Ainsi, PUMA interagit avec BCL-xL, promeut la translocation de BAX à la mitochondrie, et la mise sous silence de BAX rend les cellules résistantes à l'apoptose induite par PUMA. Au laboratoire, l'ABT-737 a été utilisé pour démontrer le rôle de PUMA comme BH3-seul activateur de BAX (Gallenne et al., 2009). Dans ce cadre, PUMA est requis pour l'activation de BAX aboutissant au déclenchement de la mort cellulaire sous un traitement BH3-mimétique.

La lignée HCT116 p21<sup>-/-</sup>, utilisée dans le cadre de ce travail, est très sensible à divers stimuli apoptotiques. Ceci est dû à l'absence de p21 dans le cas de la carence en nutriments (Braun et al., 2011) ou à la forte expression de p53 caractérisant ces cellules. La mise sous silence de p21 dans la lignée HCT116 ne permet pas de sensibiliser ces cellules à l'ABT-737 (Le Pen et al., article en soumission). Ainsi, la sensibilité des HCT116 p21<sup>-/-</sup> aux BH3-mimétiques est liée à leur forte expression du suppresseur de tumeur p53 (Ferrandiz et al., 2009) permettant l'induction de PUMA. Au cours de ce projet de thèse, j'ai étudié si et comment des composés BH3-mimétiques ciblant BCL-xL étaient capables de contrecarrer les effets anti-apoptotiques exercés par une forte expression de BCL-xL (impliquée dans la résistance aux thérapies actuelles) sur cette apoptose BAX-

dépendante induite par PUMA. Le but étant de déterminer comment fonctionne le réseau dynamique d'interactions entre BCL-xL, BAX et PUMA afin de mieux le cibler dans un contexte thérapeutique.

Mon premier objectif a été d'étudier l'influence des niveaux d'expression de BCL-xL sur la sensibilité des cellules cancéreuses à la mort induite par les BH3-mimétiques et dépendante de PUMA. Ainsi, par l'utilisation de tests de mort cellulaire couplés à des mesures d'interactions protéine/protéine en cellule entière vivante, nous avons montré que les niveaux de BCL-xL déterminent de façon critique la réponse à la mort cellulaire induite par les BH3-mimétiques et dépendante de PUMA. Mon second objectif a alors été de déterminer par quels mécanismes moléculaires les cellules cancéreuses surexprimant BCL-xL résistent aux BH3-mimétiques. Ainsi, nous avons mis en évidence que les BH3-mimétiques disponibles actuellement demeurent inefficaces à antagoniser certaines interactions impliquant BCL-xL et qui participent à la survie des cellules cancéreuses.

---

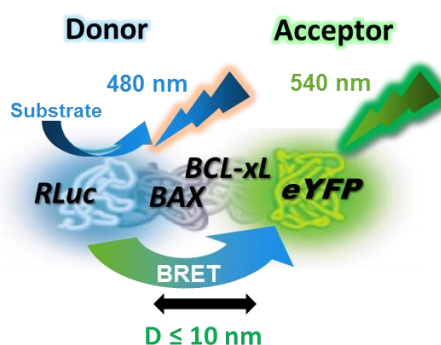
## Résultats

### ***Etude du réseau d'interactions BCL-xL / BAX / PUMA***

La protéine anti-apoptotique BCL-xL est fréquemment surexprimée dans les cellules cancéreuses et est impliquée dans des phénomènes de résistances aux chimiothérapies actuelles (Villedieu et al., 2007). Ceci souligne l'importance du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques capables d'outrepasser ses effets anti-apoptotiques. L'utilisation de molécules BH3-mimétiques telles que l'ABT-737 est limitée en clinique compte tenu de ses effets secondaires sur les plaquettes (Schoenwaelder et al., 2011). Outre cette limite inhérente à leur toxicité, nous avons montré au cours de ma thèse que ces molécules ne sont pas capables de cibler efficacement BCL-xL dans un contexte de chimiothérapie. En effet, nous avons mis en évidence qu'un traitement au WEHI-539 (ciblant spécifiquement BCL-xL) ne bloque pas la capacité d'une surexpression de BCL-xL à protéger les cellules d'une mort induite par PUMA (protéine à BH3-seul, acteur majeur de la chimiothérapie, en amont de BAX). Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'isoforme PUMA-alpha, induite sous traitement génotoxique de nos lignées cellulaires et corrélée à l'induction de l'apoptose.

Des mesures d'interactions protéine/protéine par BRET dans le réseau d'interactions entre PUMA, BAX et BCL-xL ont été réalisées afin de comprendre les phénomènes de résistance aux BH3-mimétiques induits par BCL-xL. Le BRET est une technique biophysique utilisée pour l'étude des interactions protéine/protéine en cellule entière vivante. Elle nécessite que l'une des protéines d'intérêt soit fusionnée avec un donneur et l'autre avec un accepteur. L'efficacité du transfert d'énergie par résonance dépend de plusieurs paramètres décrits dans l'équation de Förster, incluant la durée de vie du donneur, la distance entre le donneur et l'accepteur (qui doit être inférieure ou égale à 10 nm pour qu'il y ait transfert d'énergie), leur orientation relative ainsi que le degré de recouvrement de leurs spectres d'émission et d'excitation. Tous ces paramètres ont dû être pris en compte pour la construction de notre modèle. Nous avons travaillé avec le couple donneur/accepteur Renilla Luciférase (RLuc) et enhanced Yellow Fluorescent Protein (eYFP). Le principe du BRET est le suivant : les protéines de fusion d'intérêt sont exprimées dans des cellules (par exemple RLuc-BAX et eYFP-BCL-xL, **figure 20**). La Coelentérazine h

(substrat cell-perméant de la Luciférase) est ensuite mise au contact des cellules. En oxydant son substrat, la Luciférase émet une lumière à une longueur d'onde de 480 nm. Si les deux protéines d'intérêt interagissent, la RLuc et l'eYFP vont se trouver à une distance inférieure ou égale à 10 nm l'une de l'autre. Il se produit alors un phénomène de transfert d'énergie par résonance : l'énergie émise par la Luciférase permet d'exciter l'eYFP, qui émet alors une lumière à une longueur d'onde de 540 nm. Le BRET est calculé en faisant le rapport de la quantité de lumière émise à 540 nm sur la quantité de lumière émise à 480 nm.



**Figure 20 : Principe du BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)**

Exemple du couple BRET RLuc-BAX/eYFP-BCL-xL. Le transfert d'énergie par résonance s'opère lorsque les deux protéines de fusion exprimées de façon transitoire dans la cellule interagissent. Le donneur RLuc et l'accepteur eYFP sont alors à une distance inférieure ou égale à 10 nm l'un de l'autre. L'énergie émise par l'oxydation du substrat de la RLuc est alors transmise à l'eYFP, qui émet une lumière à 540 nm. Le ratio BRET est mesuré en divisant la quantité de lumière émise par l'eYFP par la quantité de lumière émise par RLuc (d'après Joly et al., 2001). *RLuc* : Renilla Luciferase / *eYFP* : enhanced Yellow Fluorescent Protein.

Une orientation optimale entre le donneur et l'accepteur pour l'obtention d'un signal BRET mesurable ne peut être déterminée qu'empiriquement : différents vecteurs codant les protéines BAX, PUMA et BCL-xL fusionnées à la RLuc ou à l'eYFP ont été construits, avec le donneur et l'accepteur fusionnés en N-terminal ou C-terminal des protéines d'intérêt. L'expression de ces différents couples de protéines de fusion a été testée. Le meilleur signal BRET a été obtenu en co-transfectant un vecteur codant pour une protéine avec la RLuc en N-terminal et un vecteur codant pour une seconde protéine fusionnée avec l'eYFP en N-terminal. Nous avons utilisé ce type de couples BRET pour l'ensemble des expériences présentées.

---

## **A. Article : “Refractory interactions between BCL-xL and PUMA in live cancer cells undermine BH3 mimetics efficiency”**

La surexpression de BCL-xL est associée à des phénomènes de résistances aux thérapies actuelles. Dans ce sens, nous avons montré qu’une surexpression de BCL-xL bloque la mort induite par le WEHI-539, un BH3-mimétique ciblant spécifiquement BCL-xL. L’augmentation du pourcentage de cellules résistantes à un traitement suite à une augmentation d’expression de sa protéine cible semble paradoxal. Nous avons donc cherché à comprendre les mécanismes impliqués dans cette résistance. Ainsi, nous avons montré au cours de ma thèse que les BH3-mimétiques ne sont pas capables de cibler efficacement BCL-xL et qu’un traitement au WEHI-539 ne bloque pas la capacité d’une surexpression de BCL-xL à protéger les cellules d’une mort induite par PUMA. L’étude des interactions engagées par BCL-xL avec BAX et PUMA en cellule entière a permis de montrer une réponse des interactions BAX/BCL-xL au WEHI-539, alors que les interactions PUMA/BCL-xL y sont insensibles et contribuent à la résistance des cellules à la mort induite par PUMA. Ces données soulignent l’importance de la compréhension du réseau d’interactions impliquant PUMA, BAX et BCL-xL dans l’emploi de stratégies thérapeutiques combinant l’utilisation de génotoxiques induisant l’expression de PUMA et de BH3-mimétiques actuellement disponibles. Le développement et l’utilisation en clinique d’une nouvelle classe de composés inhibant les interactions PUMA/BCL-xL pourrait s’avérer pleinement efficace pour le ciblage de BCL-xL dans un contexte de chimiothérapie.

Les résultats présentés dans l’article suivant sont en cours de finalisation et seront soumis à *Molecular Cell* d’ici la fin de l’année 2015.

## **Refractory Interactions between PUMA and BCL-xL in Live Cancer Cells Undermine BH3 mimetics efficiency**

J. Pécot<sup>1</sup>, L. Maillet<sup>1</sup>, J. Le Pen<sup>1</sup>, C. Vuillier<sup>1</sup>, S.de Carné Trécesson<sup>1#</sup>, A. Fétiveau<sup>1</sup>, K. Sarosiek<sup>3</sup>, F. Braun<sup>1 ∂</sup>, A. Letai<sup>3</sup>, F. Gautier<sup>2 1\*</sup>, P. Juin<sup>1 2\*</sup>

<sup>1</sup> UMR 892 INSERM /6299 CNRS/ Université de Nantes, Team 8 "Cell survival and tumor escape in breast cancer", Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, Nantes, France

<sup>2</sup> Institut de Cancérologie de l'Ouest, Centre de Lutte contre le Cancer René Gauducheau, Saint Herblain, France

<sup>3</sup> Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA 02215, USA

# current adress: *Signal Transduction Laboratory*, The Francis Crick Institute,, Lincoln's Inn Fields Laboratory, 44 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3LY

<sup>∂</sup> current adress : CNRS FRE3630 (affiliated with Univ.Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité), Institut de Biologie Physio-chimique, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

\*: corresponding authors

**SUMMARY**

BCL-xL plays a role in chemoresistance that needs to be overcome. We show here that currently available BH3 mimetics do not efficiently derepress BCL-xL inhibition of BAX-mediated cell death induced by PUMA, a major pro-apoptotic effector of chemotherapy. Live cell measurements of protein-protein interactions reveal that BH3 mimetics readily inhibit BAX interactions with BCL-xL and the effects of BCL-xL on BAX oligomerization but that PUMA interactions with BCL-xL are highly resistant. Thus, PUMA only favors BAX oligomerization/activation and induction of cell death in response to BH3 mimetics when BCL-xL expression is limiting. Mutagenesis studies show that the robustness of PUMA/BCL-xL interactions is due to the avidity of the PUMA BH3 domain for mitochondrial BCL-xL. This has important consequences for the design of strategies combining PUMA-inducing genotoxics and BCL-xL inhibitors, and argues that mitochondrial membranes *per se* influence treatment outcome.



## INTRODUCTION

The BCL-2 family are major regulators of mitochondrial outer membrane permeabilisation (MOMP) and subsequent apoptosis in response to, non-exhaustively, bacterial infection, immune responses, intrinsic tumor suppression and anti-cancer therapy. This family functions as a network of interacting proteins where anti-apoptotic proteins oppose multidomain and BH3-only pro-apoptotic proteins. Anti-apoptotic proteins (such as BCL-2, BCL-xL, MCL-1...) share four BCL-2 homology domains (BH1-4). They localize preferentially at intracellular membranes, including the outer mitochondrial membrane, due to their hydrophobic C-terminal anchor (Nguyen et al., 1993). Multi-domain proapoptotic proteins (BAX, BAK) only have three BH domains (BH1-3). They are produced as mainly inactive proteins that localize either in the cytosol or at the mitochondria and that, upon activation, translocate to and insert into mitochondrial membranes where they trigger MOMP. BH3-only proteins (such as BIM, BID, PUMA, BAD, HRK, NOXA...) trigger apoptosis upstream of BAX/BAK. Some of them (such as BIM or the alpha isoform of PUMA) interact with mitochondria by themselves as they harbor specific targeting domains in their sequence (Wilfling et al., 2012). The apoptotic activities of BH3-only proteins are regulated at transcriptional, translational and post-translational levels in response to numerous stimuli and therefore act as stress sensors.

Induction of MOMP by pro-apoptotic BCL-2 members occurs through an ordered series of molecular events in which BH3 domains play a critical role. BAX/BAK, essential effectors of MOMP in mammalian cells, permeabilize mitochondrial membranes as active oligomers. Oligomerization is initiated by a nucleating dimer formed by the binding of the BH3 domain of one molecule into a hydrophobic groove formed by the BH1, 2 and 3 domains of a second molecule (Dewson et al., 2009, 2012). The BH3 domain is buried in inactive BAX/BAK and its exposure is required for this dimerization (Czabotar et al., 2013, Moldoveanu et al., 2014). Such exposure is favored by the direct interaction of the BH3 domain of a subset of «activator» BH3-only proteins (namely these of BID, BIM or PUMA), with BAX (possibly at two sites: Gavathiotis et al., 2008, Czabotar et al., 2013) and BAK. Activation of

---

BAX/BAK is thus initiated by a ligand-induced process that mitochondrial membranes also contribute to (Leber et al., 2010).

Anti-apoptotic BCL-2 proteins inhibit MOMP essentially as dominant negative forms of BAX/BAK, that compete with them for binding to activator BH3-only proteins and to themselves (Billen et al., 2008). They do so in great part by engaging BH3 domains of the former and the latter, at the level of a hydrophobic groove that is structurally similar to that mentioned above in BAX/BAK, yet forms a more stable complex upon binding. This is negatively regulated by « sensitizer » BH3-only proteins that only interact with the BH3 binding sites of BCL-2 homologues, but not with BAX/BAK. There are notable differences in the BH3 binding sites of BCL-2, BCL-xL and MCL-1 which explain that they engage into preferential interactions with sensitizer BH3-only proteins (BAD exclusively interacts with BCL-2 and BCL-xL and NOXA with MCL-1) and with BAX/BAK (BCL-2 interacts preferentially with BAX, MCL-1 with BAK while BCL-xL appears to interact with both). Therefore they exert complementary, differentially regulated survival activities. These proteins are frequently overexpressed in cancer cells, so that intrinsic tumor suppressor pathways and conventional therapy fail to trigger BAX/BAK activation. Compounds that would overcome these effects are thus of major interest. « BH3 mimetics » inhibitors (ABT-737 or ABT-263 that target BCL-2, BCL-xL and BCL-w or WEHI-539 that selectively targets BCL-xL) have been designed based on their ability to selectively occupy the BH3 binding sites of specific subsets of BCL-2 homologs and some have entered clinical trials.

Inhibiting BCL-xL is of particular importance as it is widely overexpressed in cancers; it binds to a wider range of pro-apoptotic proteins than any other known BCL-2 homologs; its expression is a marker of chemoresistance (Amundson et al., 2000, Villedieu et al., 2007,). The dose-limiting effects of ABT-737 and ABT-263 on platelet survival indicate that these compounds can inhibit BCL-xL. However, ABT-737 was also reported to poorly counteract the antiapoptotic activity that BCL-xL exerts in cancer cells to maintain their survival, in the face of genotoxic chemotherapy in particular (Mérino et al., 2012, Rooswinkel et al., 2012). There is thus a need to identify parameters that critically determine when BCL-xL activity can be overridden by BH3 mimetics. To investigate how well currently available BH3 mimetics

antagonize BCL-xL in a chemotherapeutic setting, we herein took into account two aspects. Firstly, to understand how BCL-xL prevents chemotherapy-induced apoptosis, there is a need to investigate how its anti-apoptotic activity opposes the apoptotic activity of PUMA. Indeed, PUMA is a direct transcriptional target of p53, it is induced by genotoxic treatments and it is required for these to induce apoptosis, often by acting upstream of BAX in human cancer cells (Ren et al., 2010). PUMA is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways (Jeffers et al., 2003). Secondly, BH3 mimetics were characterized by structural studies of the soluble domains of anti-apoptotic proteins whereas their biological activity relies on their ability to target full length, mitochondria-located proteins interacting with pro-apoptotic proteins that, for some of them, also reside at mitochondria (as it is the case for the alpha isoform of PUMA: Nakano and Vousden, 2001). We therefore undertook a study where the sensitivities to BH3 mimetics of interactions engaged by BCL-xL were evaluated and compared in a whole cell context using full length proteins. We show here that BH3-mimetics poorly inhibit interactions between PUMA and BCL-xL, which limits their ability to efficiently target the effects of highly expressed BCL-xL in chemotherapy challenged cancer cells.

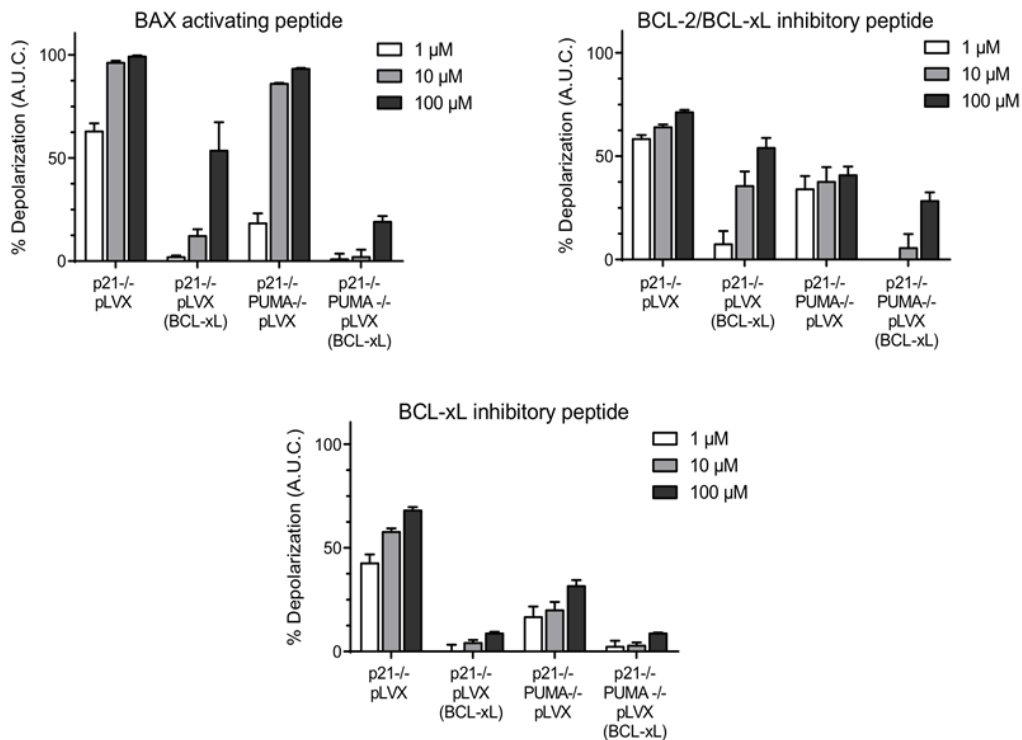
---

## RESULTS

### **BCL-xL counteracts the effects of PUMA on mitochondrial apoptotic priming**

To investigate the interplay between BCL-xL and PUMA at a cellular level, we used HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells as a model. We indeed showed that BCL-xL depletion by RNA interference induces apoptosis in these cells. Efficient apoptosis requires PUMA expression. This indicates that, in these cells, BCL-xL exerts a unique role in maintaining survival by counteracting death signals induced by constitutive PUMA, that we ascribed to its ability to directly activate BAX (Cartron et al., 2002, Gallenne et al., 2009, Edwards et al., 2013).

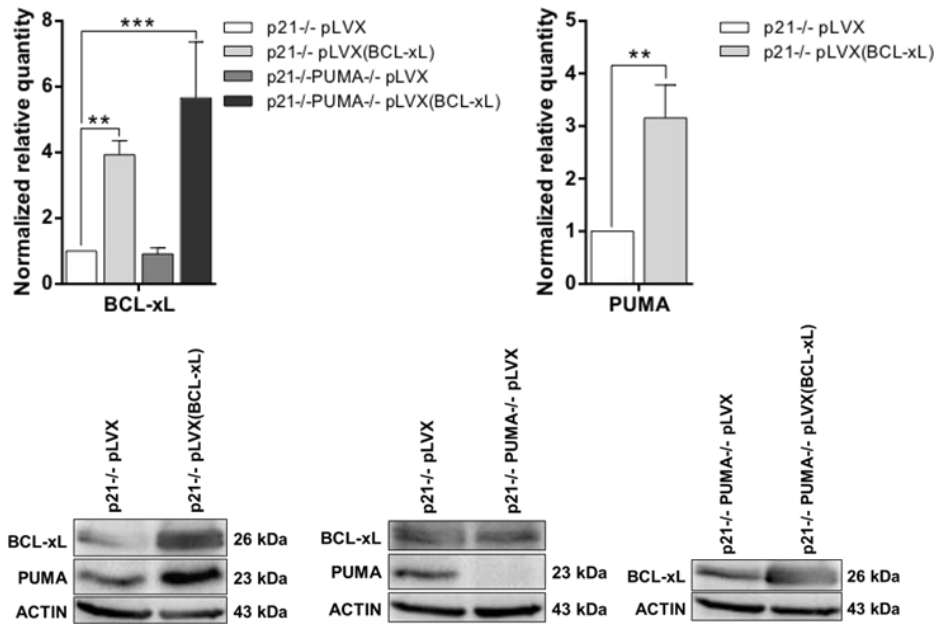
To further substantiate this, we performed BH3 profiling assays designed to identify dependence(s) on individual anti-apoptotic proteins, and mechanisms that install these dependences. We measured induction of MOMP (using mitochondrial potential dependent JC-1 red fluorescence staining as a readout, Ryan and Letai, 2013) upon incubation of permeabilized HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells, and derivatives thereof, with an array of BH3 peptides (1-100  $\mu$ M) capable of directly activating BAX/BAK and/or of selectively targeting anti-apoptotic proteins. As shown in Figure 1, control HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells (HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX, infected with an empty lentivector) were highly sensitive to BIM-BH3 (which directly activates BAX and to a lesser extent BAK, and binds to all known anti-apoptotic proteins), but also to BAD-BH3 (that potently targets BCL-2 and BCL-xL) and, most importantly, to HRK-BH3 (that more weakly but also more selectively targets BCL-xL), providing evidence of BCL-xL dependence. In comparison, PUMA knock out equivalents showed resistance to BAD-BH3 and HRK-BH3, regardless of the peptide concentration used, and to low, but not high, concentrations of BIM-BH3. This profile is consistent with the notion that endogenous PUMA provides an « activating » death signal that is overlooked when cells are treated with high concentrations of the activator BIM-BH3 peptide but that significantly contributes to the response to BCL-xL inhibitory peptides, and thus to the BCL-xL dependence. Of note, other signals might intervene as judged by the significant remaining response of PUMA knock out cells to BAD-BH3 and HRK-BH3 (Figure 1).



**Figure 1. BCL-xL counteracts the effects of PUMA on mitochondrial apoptotic priming**

Loss of mitochondrial membrane potential was monitored using the fluorescent probe JC-1 upon treatment of the indicated permeabilized cells with increasing concentrations of BAX activating peptide (BIM-BH3), BCL-2:BCL-xL inhibitory peptide (BAD-BH3), and BCL-xL inhibitory peptide (HRK-BH3). Percent depolarization is shown as the area under the curve (AUC) normalized to positive control fully depolarized mitochondria (with FCCP). All data are presented as mean ± S.E.M. of three independent experiments.

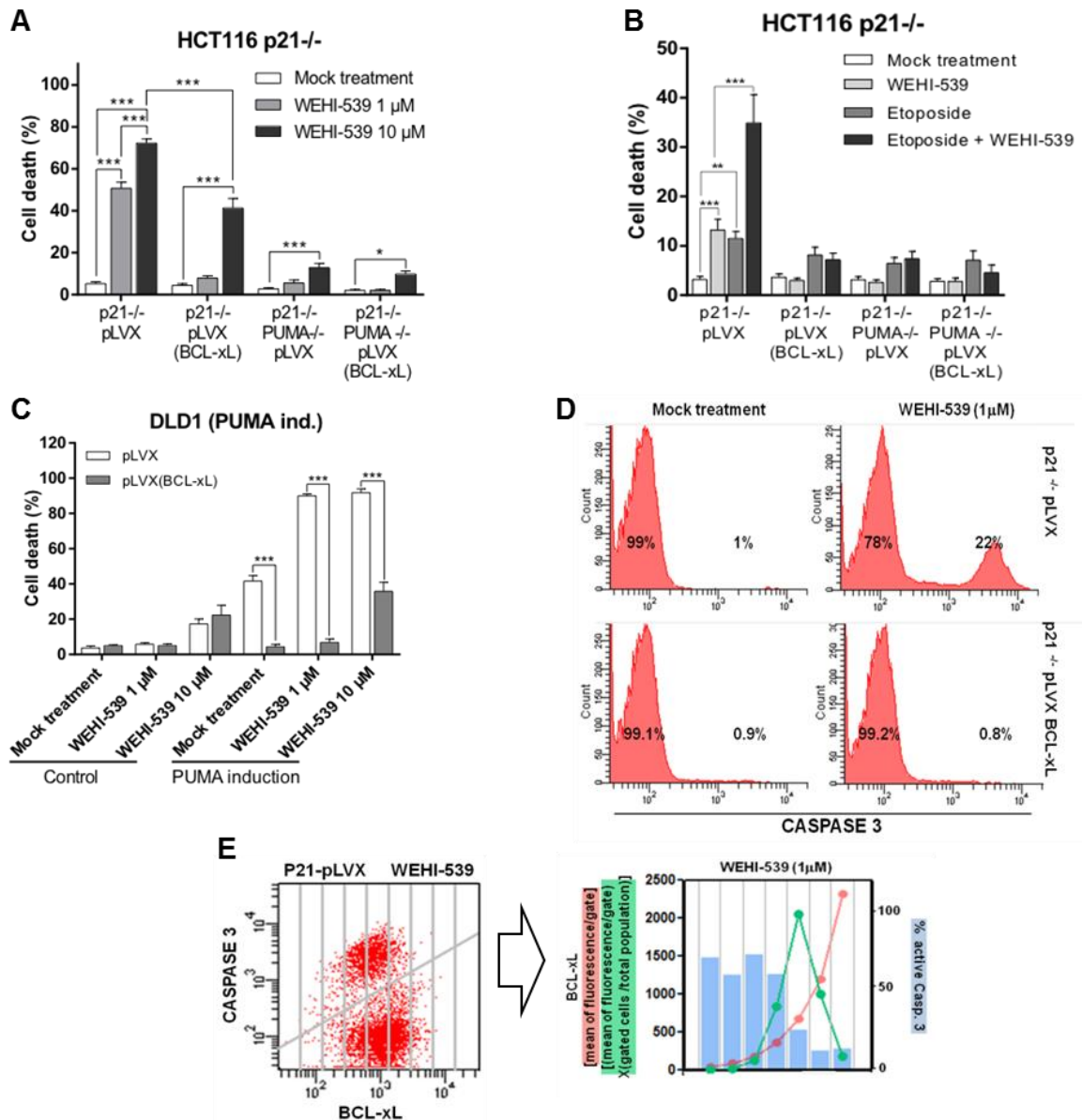
Overexpression of BCL-xL (achieved using a recombinant lentivector, Figure S1) had a distinct effect than PUMA genetic ablation. The mitochondrial potential of HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX(BCL-xL) cells indeed proved to resist to high concentrations of all three BIM, BAD and HRK BH3 peptides. Responses to BIM-BH3 (100 μM) and to BAD-BH3 (10 and 100 μM), but not to the weaker BCL-xL inhibitor HRK-BH3, remained nevertheless significant and detectable in PUMA expressing cells. These responses were further decreased in HCT116 p21<sup>-/-</sup> PUMA<sup>-/-</sup> pLVX(BCL-xL) cells, PUMA deficient cells expressing amounts of ectopic BCL-xL similar to these expressed in PUMA proficient cells (Figures 1 and S1). These results indicate that BCL-xL molecules synthesized in excess do not totally abrogate PUMA-dependent death signals but that they increase the amount (and/or potency) of inhibitors required to derepress these. Notably, the 4 cell lines used in Figure 1 responded neither to a control negative peptide nor to NOXA-BH3 (that inhibits MCL-1), indicating that MCL-1 does not play, by itself, a role in survival maintenance under these conditions (data not shown).



**Figure S1. Expression levels of BCL-xL and PUMA in cells from Figure 1**  
 Protein quantities were normalized to quantities measured in HCTp21<sup>-/-</sup>-pLVX. All data are presented as mean ± S.E.M. of three independent experiments. Western blot data shown represent results from one of three separate experiments.

### BH3 mimetics weakly derepress the control BCL-xL exerts over PUMA in cancer cells

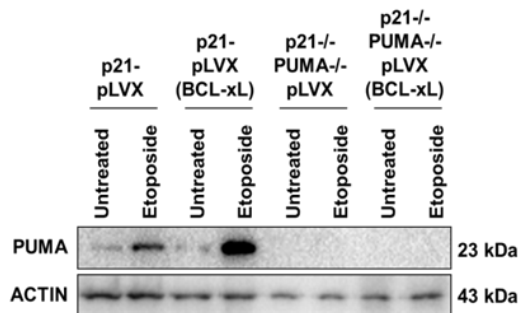
To investigate whether BH3 mimetics efficiently derepress the inhibitory effect BCL-xL exerts against constitutive PUMA, we studied the biological effects of WEHI-539, a selective inhibitor of BCL-xL. As shown in Figure 2A, WEHI-539 used as a single agent triggered cell death in PUMA proficient, but not PUMA deficient cells. Thus, this compound can target endogenous BCL-xL and derepress the negative control it exerts over PUMA. In contrast, however, HCT116 p21<sup>-/-</sup>-pLVX(BCL-xL) cells (and a fortiori HCT116 p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup>-pLVX(BCL-xL) cells) were significantly more resistant to WEHI-539, even if concentrations as high as 10 μM were used (Figure 2A).



**Figure 2. BCL-xL levels critically determine induction of PUMA dependent cell death by BH3 mimetics**

(A) The indicated HCT116 cell lines were treated with WEHI-539 (48 h) and cell death was assessed. (B) HCT116 were treated by etoposide (50 μM, 16 h) +/- WEHI-539 (1 μM, 3 h), before cell death analysis. (C) PUMA-inducible DLD1 (doxycycline controlled repression system) overexpressing BCL-xL or not, as indicated, were induced for PUMA and treated by WEHI-539 (48 h) before cell death analysis. Data presented are mean ± S.E.M. of three independent experiments. (D) Flow cytometry analysis of HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX cells treated with WEHI-539 (24 h) and stained using BCL-xL-Alexa-488 and CASPASE-3-Alexa-647 antibodies. (E) Relation ship between BCL-xL expression and active CASPASE 3 was determined by dividing resulting dot plots from (D) (HCT116p21<sup>-/-</sup>pLVX treated cells) into vertical gates to grade BCL-xL expression ([Mean of fluorescence per gate] (red line), [Mean of fluorescence per gate x (gated cells/total population)] (green line). % active CASPASE 3 was defined for each vertical gate by collecting the number of cells above the skew line, then dividing it with the gated cell number. Data presented are representative of three independent experiments.

Pretreatment with etoposide, that induced endogenous PUMA expression (Figure S2), dramatically enhanced the sensitivity of PUMA expressing cells to short term treatment with WEHI-539, but not that of PUMA knock out cells (Figure 2B). This indicates that PUMA expression levels favor sensitivity to BCL-xL inhibition. However, even in this paradigm, overexpression of BCL-xL prevented cell death.

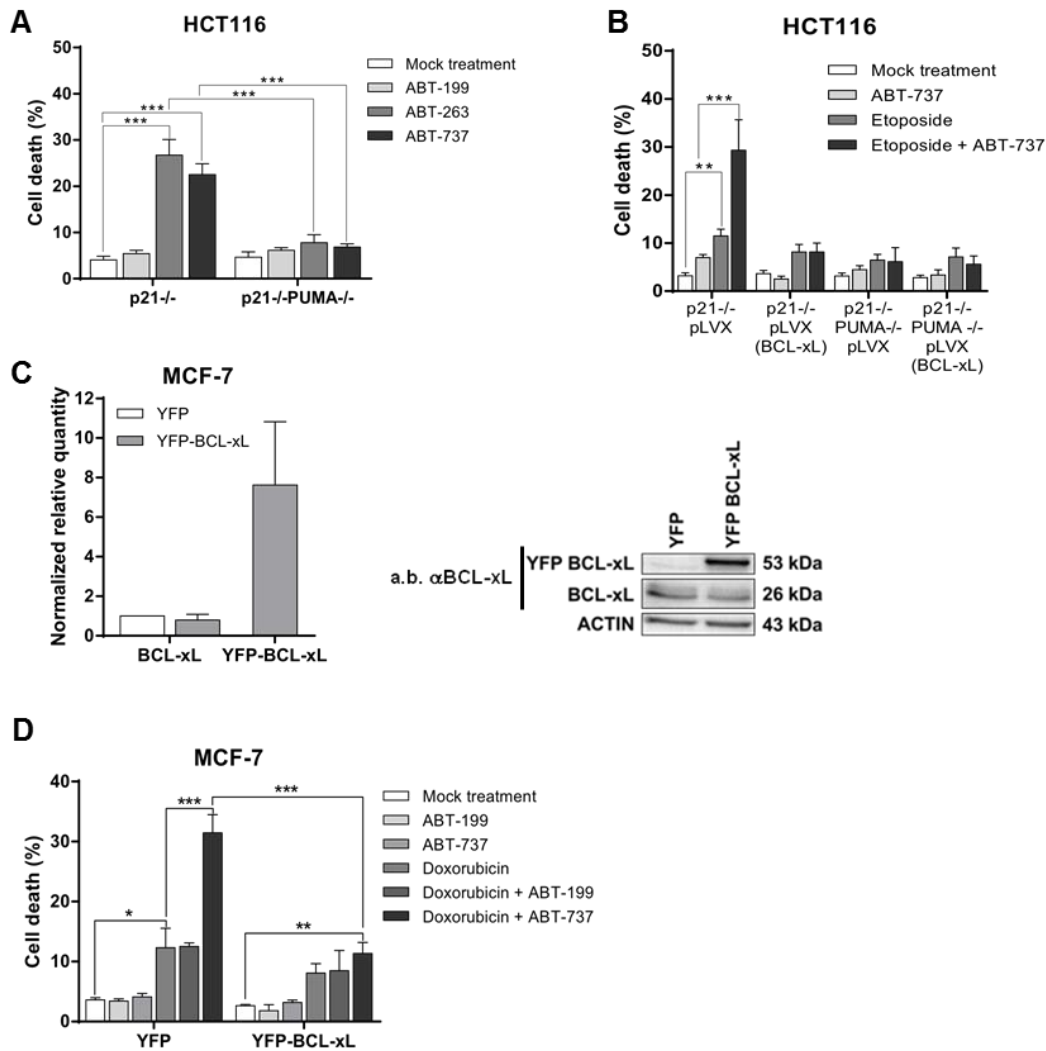


**Figure S2. Etoposide induces PUMA expression**

Western blot analysis of the indicated HCT116 cells lines treated or not by etoposide (50  $\mu$ M, 16 h). Data shown represent results from one of three separate experiments.

Consistent with preceding results, and with those reported above, BCL-xL overexpressing HCT116 p21-/- cells were also resistant to induction of PUMA dependent cell death by ABT-737 and ABT-263 (that inhibit BCL-xL together with BCL-2 and BCL-w), by ABT-199 (that inhibits BCL-2) (Figure S3A) or by a combination of etoposide followed by a short term treatment with ABT-737 (Figure S3B). Likewise, pretreatment with doxorubicin enhanced the sensitivity of control, YFP expressing, MCF-7 breast cancer cells to ABT-737 but not to ABT-199. Cell death was blocked by overexpression of YFP-fused BCL-xL (Figure S3C-D).





**Figure S3. BCL-xL levels critically determine induction of PUMA dependent cell death by BH3 mimetics inhibitors of BCL-xL**

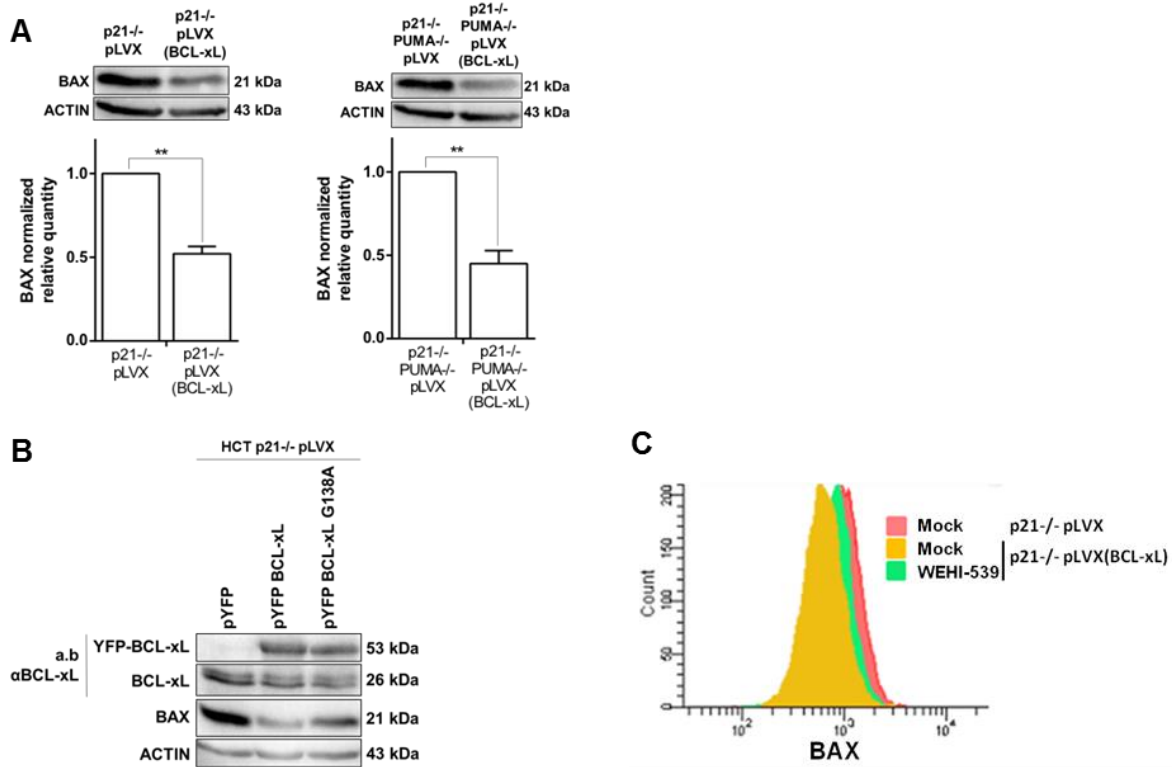
(A) HCT116 cells were treated by ABT-737, ABT-263 or ABT-199 (1 μM, 24 h) before cell death analysis. (B) HCT116 were treated by etoposide (50 μM, 16h) +/- ABT-737 (1 μM, 3 h), before cell death analysis. (C) Western blot analysis of MCF-7 YFP and MCF-7 YFP-BCL-xL cells was performed to measure expression of BCL-xL in these cells (D) MCF-7 were treated by doxorubicin (500 ng/ml, 48 h) +/- ABT-737, ABT-199 or WEHI-539 (1 μM, 16 h), before cell death analysis. All data are presented as mean ± S.E.M. of three independent experiments. Western blot data shown represent results from one of three separate experiments.

Taken together, these results indicate that BH3 mimetic inhibitors of BCL-xL can counteract the ability of endogenously expressed proteins to quell death induced by constitutively expressed, or chemotherapy-induced, PUMA. Yet, they fail to override protection afforded by enhanced levels of BCL-xL against PUMA mediated cell death. To further substantiate this point, we used DLD-1 cells expressing doxycycline inducible PUMA. As shown in Figure 2C, overexpression of BCL-xL inhibited cell death induced upon PUMA expression, and this was only slightly derepressed by BH3 mimetics.

We estimated by densitometric analysis that there is an average 4-fold increase in BCL-xL protein expression in HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX(BCL-xL) cells compared to controls (Figure S1), and that the expression of YFP-fused BCL-xL is in average 8-times higher than endogenous BCL-xL expression in the corresponding MCF-7 cells (Figure S3C). To investigate further how finely BCL-xL levels determine the response to BH3 mimetics, we analyzed whether cell-to-cell variations in its expression might contribute, at least in part, to the fractional killing of HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX cells by WEHI-539. We thus treated these cells with WEHI-539 or not and performed intracellular immunostaining to concomitantly measure BCL-xL expression and cleavage of CASPASE 3 (as a marker of apoptosis induction) on a single cell basis in the corresponding populations. As shown in Figure 2D, we measured log-normal distribution of BCL-xL expression levels and no detectable cleaved CASPASE 3 in untreated HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX cells. Treatment with WEHI-539 did not change the distribution of BCL-xL expression levels but it leads to the emergence of a subpopulation that stained positive for cleaved CASPASE 3. This was not observed upon treatment of HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX(BCL-xL) and of PUMA knock out cells, confirming that this generation of cleaved CASPASE 3 positive cells coincides with induction of cell death and indicating that overexpressed BCL-xL, expectedly, prevents caspase activation (Figure 2D and data not shown). Thorough single-cell examination in WEHI-539 treated HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX populations, of the percentage of cleaved CASPASE 3 positive cells as a function of the range of BCL-xL expression showed that activation of CASPASE 3 occurred preferentially in cells expressing BCL-xL levels below the mean level (Figure 2E). Thus, cell to cell differences in the expression of BCL-xL levels, even in an apparently « homogenous » cell population, may be determinant, with higher expression of BCL-xL preventing onset of cell death in response to a given treatment for a defined period of time.

### **BH3 mimetics antagonize down regulation of BAX induced by enhanced BCL-xL expression**

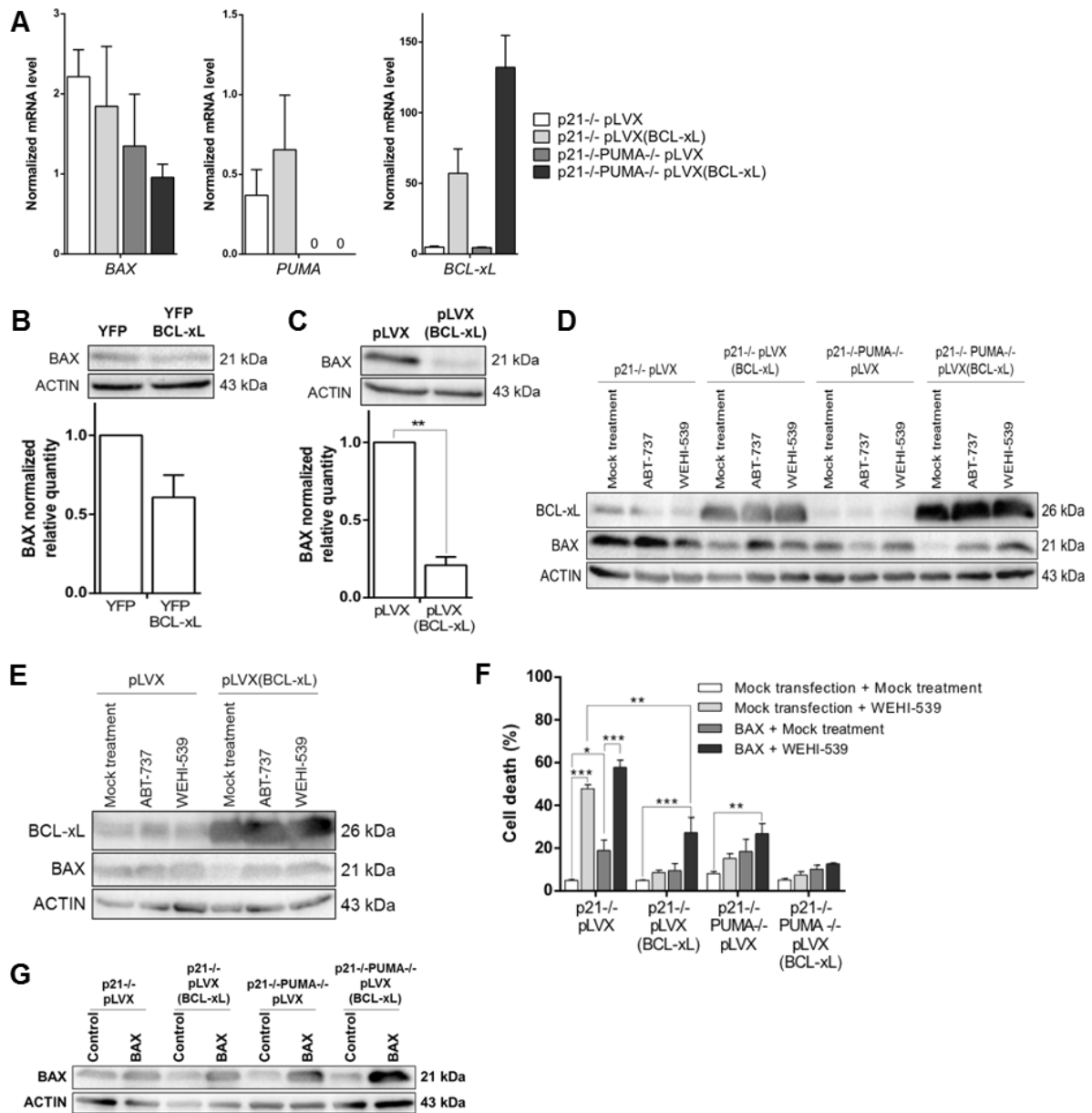
We sought for biochemical effects BCL-xL might exert in cells that would render them paradoxically resistant to cell death induction by its BH3 mimetic inhibitors. Careful examination of the four HCT116 p21<sup>-/-</sup> derived cell lines revealed a slight but significant decrease in steady levels of BAX in BCL-xL overexpressing cells (Figure 3A). This appears to occur at the protein level as we detected no change in BAX mRNA expression levels under these conditions (Figure S4A). We also observed this tendency in YFP-BCL-xL overexpressing MCF-7 cells and in BCL-xL overexpressing DLD-1 cells (Figure S4B-C). A decrease in BAX expression was detected early following transient transfection of HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells with a plasmid encoding for wild type BCL-xL. Short-term ectopic expression of a mutant of BCL-xL that carries a mutation (G138A) in its BH3 binding site disabling its interaction with BAX (see below) had a weaker effect than wild type BCL-xL on BAX expression (Figure 3B). This argues that the decrease in BAX expression observed in cells stably overexpressing BCL-xL results from a direct effect of BCL-xL, and that it relies on its BH3 binding activity.



**Figure 3. BH3-mimetics antagonize down regulation of BAX induced by enhanced BCL-xL expression**  
 (A) Protein quantities were evaluated by western blot analysis and normalized to quantities measured in HCTp21<sup>-/-</sup>pLVX. (B) Western blot analysis of HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX cells transfected with control (YFP) or vector encoding YFP-BCL-xL or YFP-BCL-xLG138A. Western blot data shown represent results from one of three separate experiments. (C) Flow cytometry analysis of the indicated HCT116 cells treated or not with WEHI-539 (24 h) and stained with BAX-Alexa-647. All data are presented as mean ± S.E.M. of three independent experiments.

Decreased BAX expression may affect the apoptotic response to BH3 mimetics, as BAX plays a major role in cell death induction by BCL-xL depletion in HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells (Yu et al., 2003). In support to this, HCT116 p21<sup>-/-</sup>BAX<sup>-/-</sup> were resistant to induction of cell death by WEHI-539 and ABT-737 (data not shown and Gallenne et al., 2009). Additional experiments established, however, that a decrease in steady state levels of BAX in BCL-xL overexpressing cells cannot solely account for their resistance to BH3 mimetics. Firstly, we found that BH3 mimetic treatment restored BAX expression in BCL-xL overexpressing cells (Figure S4D). Analysis of BAX expression in HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX(BCL-xL) treated or not with WEHI-539 by intracellular staining followed by FACS analysis showed log-normal distribution of expression levels in either case, and that mean expression was enhanced, and almost restored to levels found in the control untreated cells by WEHI-539 treatment (Figure 3C). Restoration of BAX expression, which was also found in BCL-xL overexpressing DLD-1 cells and also upon treatment with ABT-737 (Figure S4E),

indicates that BH3 mimetics interfere sufficiently well with the BH3 binding activity of BCL-xL to prevent its effects on BAX expression. Secondly, we found that enforced expression of BAX in HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX(BCL-xL) cells was insufficient to restore sensitivity to WEHI-539 induction to cell death (Figure S4F-G). Thirdly, the response of HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX(BCL-xL) to BAD-BH3 in BH3 profiling assays reported above (Figure 1) indicate that these cells have a decreased, but intact ability to undergo MOMP upon appropriate inhibition of BCL-xL. This argues that the resistant phenotype of BCL-xL overexpressing cells is more likely to ensue from increased anti-apoptotic traits than from a decrease in apoptotic competence (relying on BAX). Of note, we also detected enhanced expression of PUMA protein, but not mRNA, levels in BCL-xL overexpressing cells (Figure S1, S4A). The reason for this effect is unclear, and it is beyond the scope of this study as it is unlikely to account for the observed resistance of BCL-xL cells to BH3 mimetic treatment. It evokes the reported effect of BCL-2 on the stabilization of BIM (Jorgensen et al., 2007), whose expression was also enhanced in BCL-xL overexpressing cells (data not shown).



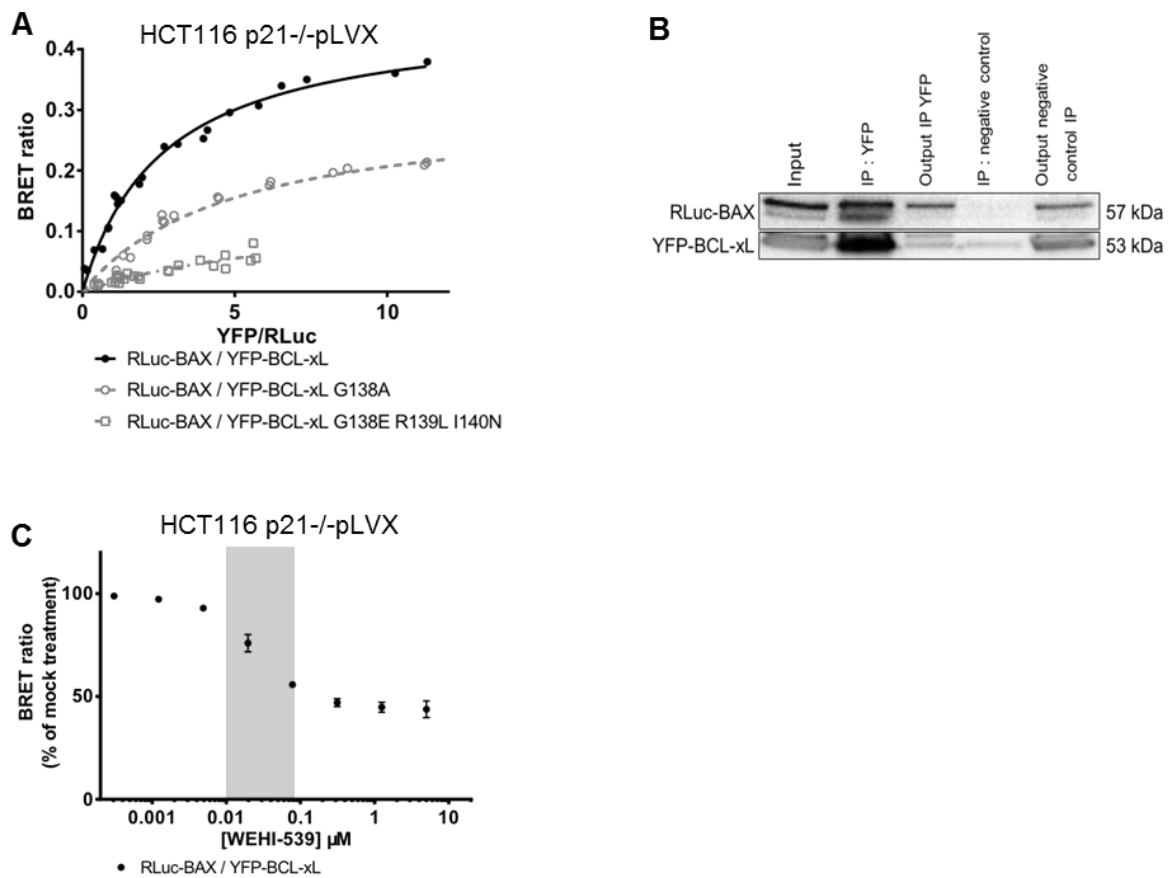
**Figure S4. BH3-mimetics antagonize down regulation of BAX induced by enhanced BCL-xL expression**  
 (A) Quantitative PCR analysis of the indicated HCT116 cell lines. (B, C) Western blot analysis of MCF-7 (B) and DLD1 inducible for PUMA (C) cells. Protein quantities were normalized by quantities measured in MCF-7 YFP and DLD1 pLVX inducible for PUMA respectively. (D) Western blot analysis of HCT116 cell lines treated by ABT-737 or WEHI-539 (1  $\mu$ M, 24 h). (E) Western blot analysis of DLD1 inducible for PUMA treated by ABT-737 or WEHI-539 (1  $\mu$ M, 24 h). (F) HCT116 were transfected with control (mock) or vector encoding BAX then treated by WEHI-539 (1  $\mu$ M, 24 h), before cell death analysis. (G) Western blot analysis of HCT116 transfected with control (mock) or vector encoding BAX. All data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments. Western blot data shown represent results from one of three separate experiments.

### **BH3 mimetics inhibit interactions of BCL-xL with BAX and the effects of BCL-xL on BAX oligomerization in whole cells**

We followed by investigating whether BH3 mimetics might fail to inhibit some molecular interactions engaged by BCL-xL to prevent cell death using a Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) approach. BRET assays allow to evaluate the close proximity between two proteins by measuring energy transfer (upon addition of a Luciferase substrate) between R-Luciferase (R-Luc, as a donor, fused to one protein) and Yellow Fluorescent Protein (YFP, as an acceptor, fused to the other). To confirm that BRET signals testify specific interactions and do not result from random collisions, we systematically evaluated the saturable nature of signals observed between a given level of donor and increasing levels of acceptor (obtained by transient transfection with increasing amounts of the corresponding plasmid, and controlled by measure of YFP intensity).

We first evaluated BCL-xL/BAX interactions in whole cells, and how BH3 mimetics interfere with these. As shown in Figure 4A, and consistent with preceding results (Bah et al., 2014), saturable BRET signals were observed in HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX cells between R-Luc fused to the N-terminal end of BAX and increasing levels of YFP-fused to the N-terminal end of wild type BCL-xL. Interactions were confirmed in co-immunoprecipitation assays (Figure 4B). BRET signals were much weaker between R-Luc-BAX and YFP-fused mutants of BCL-xL carrying a single mutation (G138A) in its BH1 domain that plays a critical role in its BH3 binding interface (Ottillie et al., 1997). BRET signals were further diminished when a YFP-fused mutant of BCL-xL carrying three mutations in the BH1 domain (GRI: G138E, R139L, I140N) was used (Figure 4A). This underscores the necessity for BCL-xL to have a fully intact BH3 binding site to engage in live cell interactions with BAX. Consistently, BRET signals were inhibited in a dose dependent manner by treatment with WEHI-539. To quantitate these effects in live cells, we evaluated the effect of a range of WEHI-539 concentrations on BAX/BCL-xL BRET signals obtained using an amount of acceptor YFP-BCL-xL below saturation (that is, in the dynamic range of the curve). As shown in Figure 4C, under such conditions, WEHI-539 exerted half of its maximal effect roughly at concentrations in the 20 nM - 29 nM range (grey rectangle) evaluated from EC<sub>50</sub> determination with Graph Pad Prism using untreated signal as

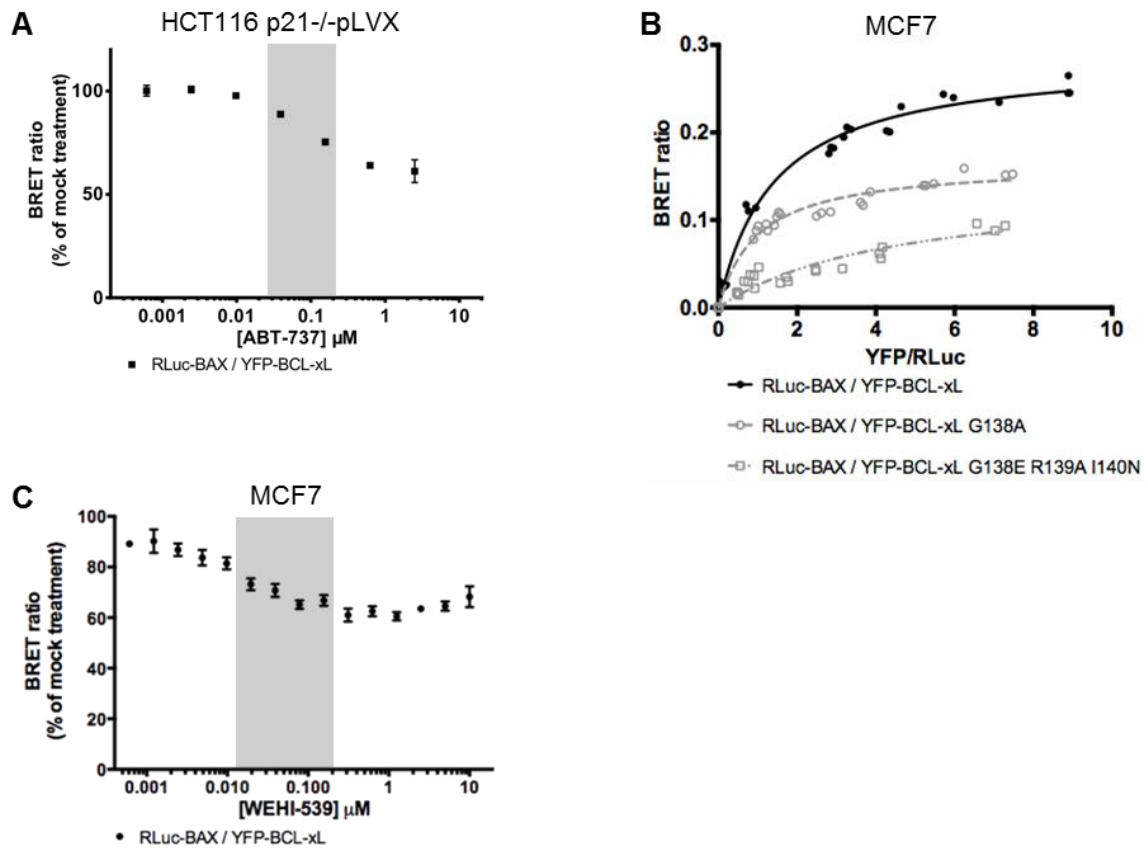
the 0% response and the maximal concentration of inhibitor as the 100% response. Experiments using ABT-737 and equivalent amounts of YFP-BCL-xL gave qualitatively comparable results and were consistent with the notion that this compound is less efficient at targeting BCL-xL than WEHI-539 (68 nM < EC<sub>50</sub> < 120 nM, Figure S5A) (Lessene et al., 2013). ABT-199 (a selective BCL-2 inhibitor) had no detectable effect on BAX/BCL-xL BRET signals (data not shown). Essentially similar results were obtained using MCF-7 cells instead of HCT116 cells (Figure S5B-C).



**Figure 4. BH3-mimetics inhibit interaction of BCL-xL with BAX in whole cells**

(A) BRET saturation assay analysis: saturation curves were performed on HCT116 p21<sup>-/-</sup>pLVX cells using increasing amount of vectors encoding YFP-BCL-xL, YFP-BCL-xLG138A or YFP-BCL-xLG138E, R139L, I140N in the presence of a fixed amount of the vector-encoding RLuc-BAX. BRET ratios are measured for every YFP-BCL-xL plasmid concentrations and are plotted as a function of the ratio of total acceptor fluorescence to donor luminescence. The data were fitted using a nonlinear regression equation assuming a single binding site. (B) HCT116 p21<sup>-/-</sup>pLVX were transfected with vectors encoding RLuc-BAX and YFP-BCL-xL, before immunoprecipitation with a negative control or an anti-GFP antibody and western-blot analysis with RLuc and YFP antibodies (C) WEHI-539 response of the BRET couple RLuc-BAX / YFP-BCL-xL was assessed by concentration curve experiments in the HCTp21<sup>-/-</sup> pLVX cell line. Effective concentration range (grey rectangle) was established as stated in Materials and Methods. Data presented are representative of three independent experiments.



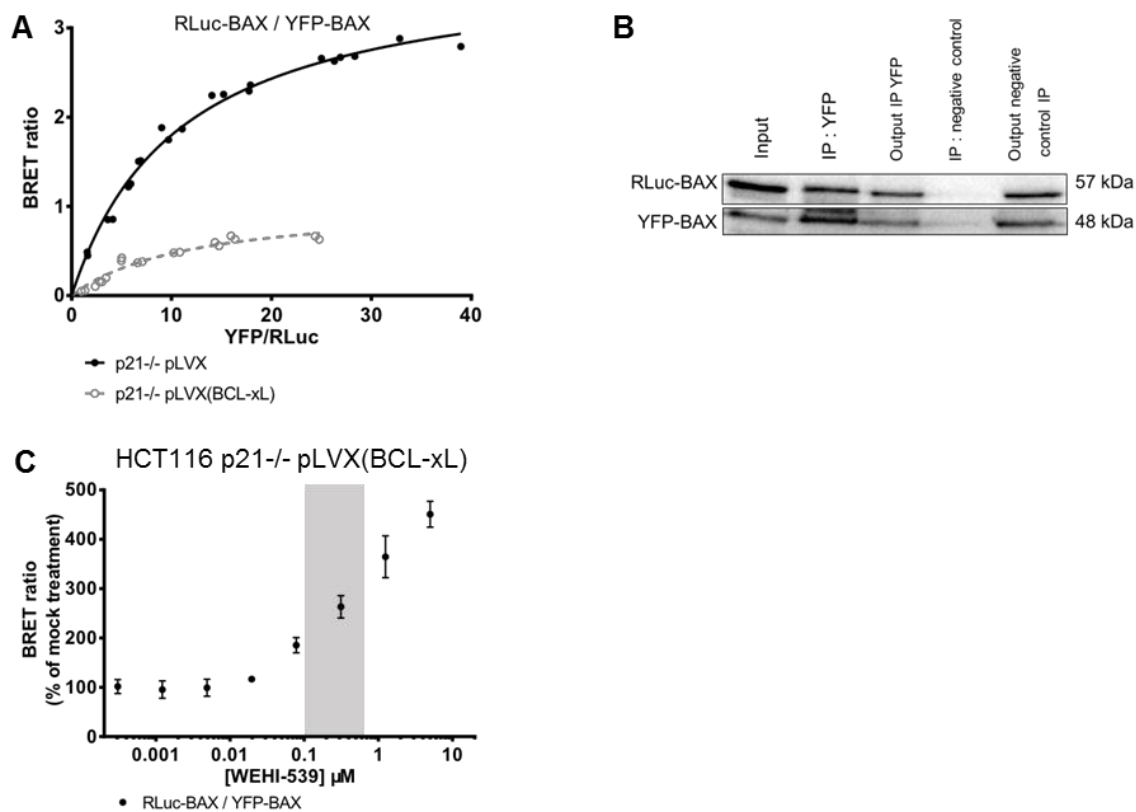


**Figure S5. BH3-mimetics inhibit interaction of BCL-xL with BAX in whole cells**

(A) ABT-737 response of the BRET couple RLuc-BAX / YFP-BCL-xL was assessed by concentration curve experiments in HCT116 p21<sup>-/-</sup>-pLVX (Grey rectangle: effective concentration range as described in Materials and Methods). (B) BRET saturation assay analysis: saturation curves were performed on MCF-7 cells using increasing amount of vectors encoding YFP-BCL-xL, YFP-BCL-xLG138A or YFP-BCL-xLGRI in the presence of a fixed amount of the vector-encoding RLuc-BAX. BRET ratios were measured for every YFP-BCL-xL plasmid concentrations and are plotted as a function of the ratio of total acceptor to donor fluorescence. The data were fitted using a nonlinear regression equation assuming a single binding site. (C) WEHI-539 response of the BRET couple RLuc-BAX / YFP-BCL-xL was assessed by concentration curve experiments in MCF-7 cell line (Grey rectangle: effective concentration range (see Materials and Methods)). Data presented are representative of three independent experiments

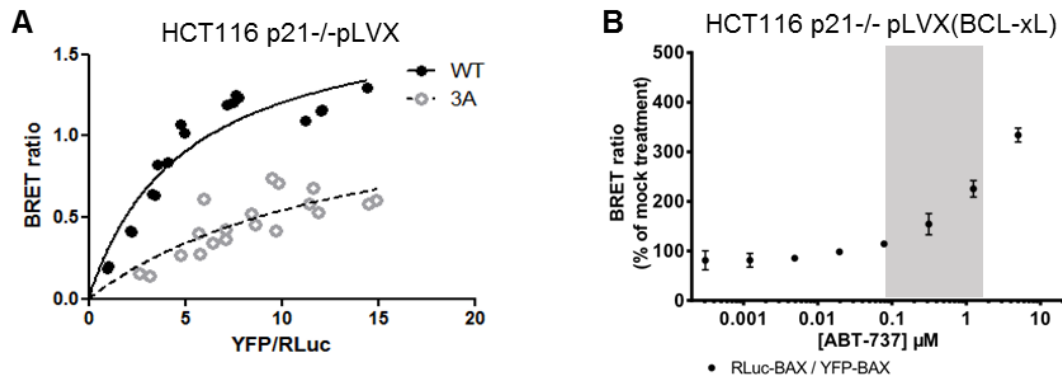
A key mechanism by which BCL-xL prevents BAX activity is by interfering with its oligomerization. To directly investigate how BCL-xL interferes with this process in a whole cell context, we designed a BRET based assay for BAX oligomerization. As shown in Figure 5A, enforced expression of R-Luc-BAX with increasing amounts of YFP-BAX generated strong and saturable BRET signals in HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX cells, indicative of BAX oligomerization. As a negative control, we confirmed that BRET signals were much weaker between YFP-BAX and R-Luc-BAX molecules carrying a triple mutation in their BH3 domain (Figure S6A). Interactions between wild type BAX molecules were confirmed by co-immunoprecipitation experiments (Figure 5B). Importantly, BAX/BAX BRET signals were much weaker when the same experiments were performed in HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX(BCL-xL), indicating that ectopic

BCL-xL prevents oligomerization induced by an excess of BAX molecules (Figure 5A). Importantly, when we evaluated the effect of a range of WEHI-539 concentrations on BAX/BAX BRET signals (obtained using an amount of acceptor YFP-BAX below saturation) we found that this compound could derepress the effects of BCL-xL on BAX oligomerization in a dose dependent manner at effective concentrations ranging from 172 nM to 443 nM (Figure 5C). Similar observations were made using ABT-737 (Figure S6B).



**Figure 5. BH3-mimetics inhibit the effects of BCL-xL on BAX oligomerization in whole cells**

(A) BRET saturation assay analysis: saturation curves were performed in the indicated HCT116 cell lines using increasing amount of vectors encoding YFP-BAX in the presence of a fixed amount of the vector-encoding RLuc-BAX (with Q-VD-OPh 5μM). BRET ratios are measured for every YFP-BAX plasmid concentrations and are plotted as a function of the ratio of total acceptor to donor fluorescence. The data were fitted using a nonlinear regression equation assuming a single binding site. (B) HCT116 p21<sup>-/-</sup>pLVX were transfected with or vectors encoding RLuc-BAX and YFP-BAX, before immunoprecipitation with a control or an anti-GFP antibody and western-blot analysis with RLuc and YFP antibodies. (C) WEHI-539 response of the BRET couple RLuc-BAX / YFP-BAX was assessed by concentration curve experiments in HCT116 p21<sup>-/-</sup>pLVX(BCL-xL) in presence of Q-VD-OPh 5μM (Grey rectangle: effective concentration range (see Materials and Methods)). Data presented are representative of three independent experiments

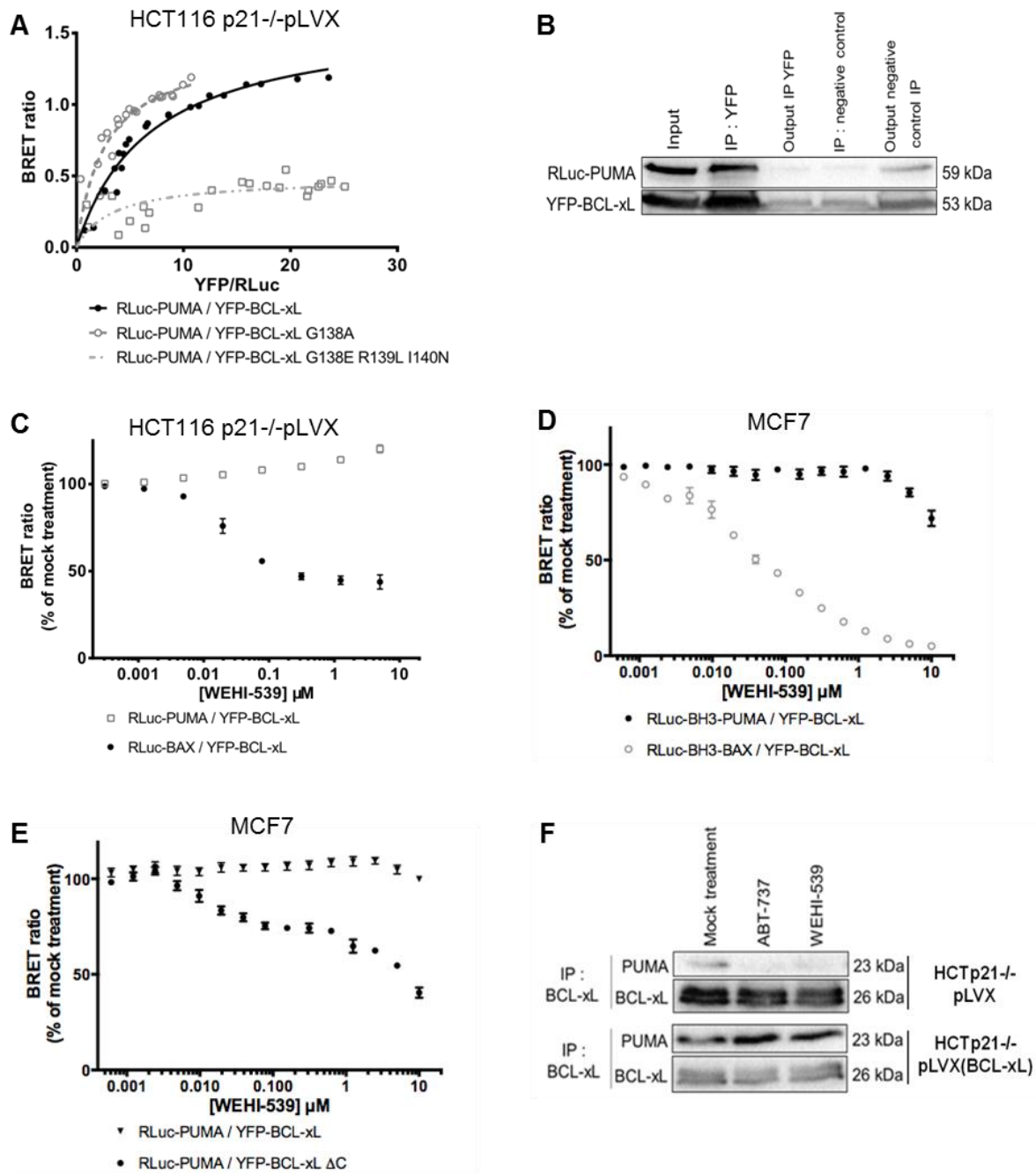


**Figure S6. BH3-mimetics inhibit the effects of BCL-xL on BAX oligomerization in whole cells**

(A) BRET saturation assay analysis: saturation curves were performed in HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX cells using increasing amount of vectors encoding YFP-BAX in the presence of a fixed amount of the vector-encoding RLuc-BAX 3A mutant (with Q-VD-OPh 5μM). (B) ABT-737 response of the BRET couple RLuc-BAX / YFP-BAX was assessed by concentration curve experiments in HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX(BCL-xL) in presence of Q-VD-OPh 5μM. (Grey rectangle: effective concentration range (see Materials and Methods)). Data presented are representative of three independent experiments.

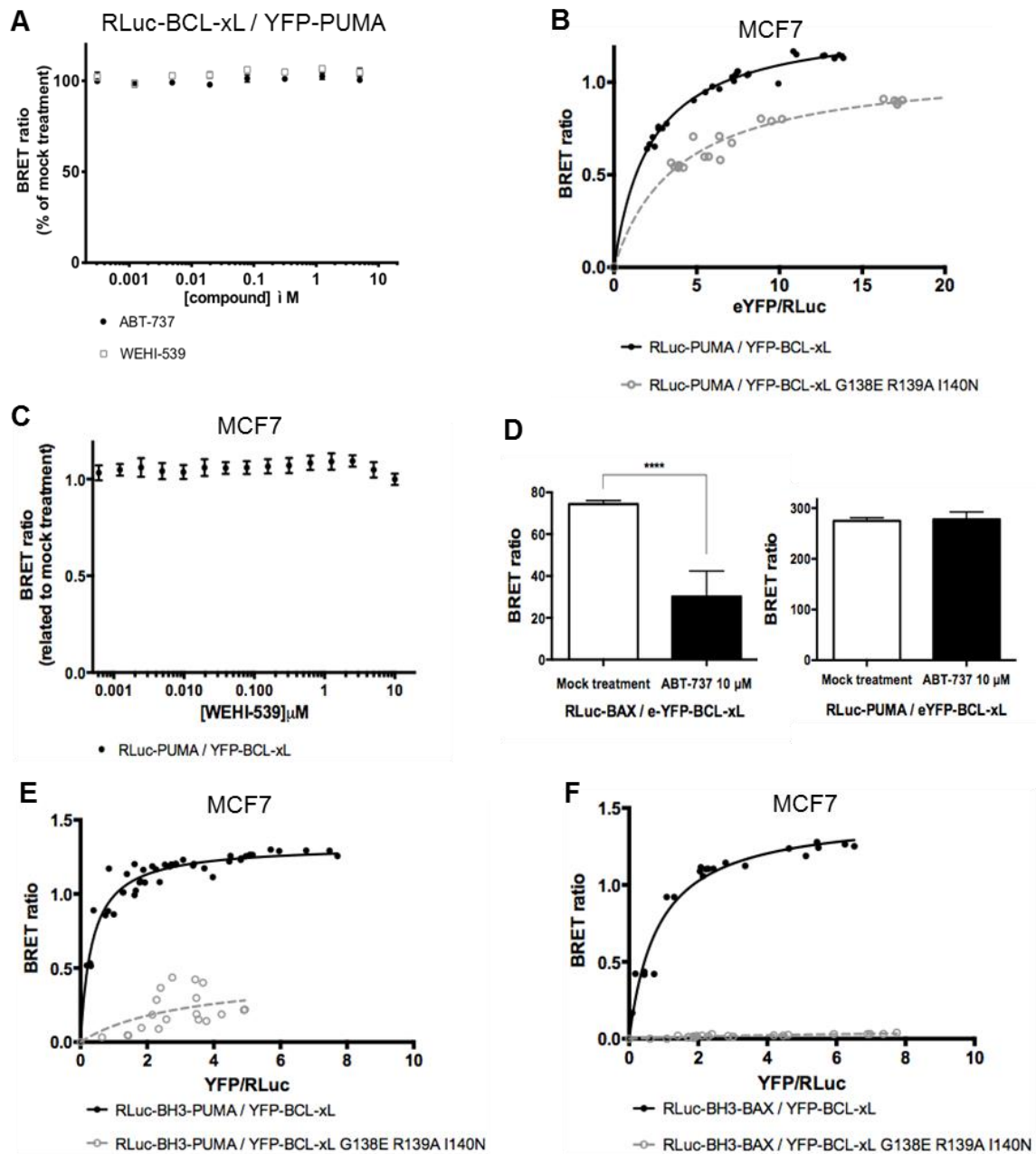
### BH3 mimetics do not inhibit interactions of mitochondrial BCL-xL with PUMA

We then evaluated the effects of BCL-xL on PUMA, using BRET assays to measure interactions between these two full length proteins in whole cells. As shown in Figure 6A, saturable and strong BRET signals were observed in HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX cells between R-Luc fused to the N-terminal end of PUMA and YFP-fused to wild type BCL-xL. Interactions between corresponding proteins were confirmed in co-immunoprecipitation assays (Figure 6B). Interestingly, BRET signals were not weakened by the single G138A substitution in BCL-xL, and three mutations in the BH1 domain of BCL-xL (GRI: G138E, R139L, I140N) were required to abrogate specific BRET signals between PUMA and BCL-xL (Figure 6A). This indicates that the BH3 binding activity of BCL-xL is necessary for PUMA/BCL-xL interactions to occur in whole cells but that these interactions resist to mild perturbations of the BH3 binding interface. Experiments using BH3 mimetics were consistent with this and provided evidence of the robustness of PUMA interactions with BCL-xL: we detected no inhibitory effect of up to 10 μM of WEHI-539 on PUMA/BCL-xL interactions (Figure 6C). Likewise, ABT-737 treatment had also no detectable effect (Figure S7A). Similar observations were made using MCF-7 cells (Figure S7B-C). To further confirm the resistance of PUMA/BCL-xL interactions in a cellular context that lacks any other member of the BCL-2 family, we used yeast ectopically expressing these proteins fused to R-Luc and YFP. PUMA/BCL-xL BRET signals measured in yeast were also refractory to BH3 mimetic treatment. In contrast, BAX/BCL-xL BRET signals proved to be sensitive also in this system (Figure S7D).



**Figure 6. BH3-mimetics do not inhibit interactions of mitochondrial BCL-xL with PUMA**

(A) BRET saturation assay analysis: saturation curves were performed in HCT116 p21<sup>-/-</sup>-pLVX cells using increasing amount of vectors encoding YFP-BCL-xL, YFP-BCL-xLG138A or YFP-BCL-xL GRI in the presence of a fixed amount of the vector-encoding RLuc-PUMA. The data were fitted using a nonlinear regression equation assuming a single binding site. (B) HCT116 p21<sup>-/-</sup>-pLVX were transfected with vectors encoding RLuc-PUMA and YFP-BCL-xL, before immunoprecipitation with a negative control or an anti-YFP antibody and western-blot analysis with RLuc and YFP antibodies (C) Response of the BRET couple RLuc-PUMA / YFP-BCL-xL to WEHI-539 treatment was assessed using concentration curve experiments in HCTp21<sup>-/-</sup> pLVX. Note that BAX / BCL-xL curve is reproduced from Figure 4C for illustrative purposes. (D) WEHI-539 responses of the BRET couples RLuc-BH3-PUMA / YFP-BCL-xL and RLuc-BH3-BAX / YFP-BCL-xL were assessed by concentration curve experiments in MCF-7. (E) WEHI-539 response on the BRET couple RLuc-PUMA / YFP-BCL-xL $\Delta$ C was assessed by concentration curve experiment in MCF-7. RLuc-PUMA / YFP-BCL-xL response is reproduced from figure S7C for illustrative purposes. (F) HCT116 cell lines were treated by ABT-737 or WEHI-539 (1  $\mu$ M, 16 h) before immunoprecipitation with an anti-BCL-xL antibody and western-blot analysis. Data presented are representative of three independent experiments.



**Figure S7. BH3-mimetics do not inhibit interactions of BCL-xL with PUMA in whole cells**

(A) ABT-737 and WEHI-539 responses of the BRET couple RLuc-BCL-xL / YFP-PUMA were assessed by dose response experiment in HCT116 p21<sup>-/-</sup>-pLVX (with Q-VD-Oph 5 $\mu$ M). (B) BRET saturation curves between RLuc-PUMA and YFP-BCL-xL or YFP-BCL-xLGRI in MCF-7 cells. (C) Response of the BRET couple RLuc-PUMA / YFP-BCL-xL to WEHI-539 treatment was assessed by performing concentration curve experiments in MCF-7 cells. (D) Effect of ABT-737 treatment on RLuc-BAX / YFP-BCL-xL using BRET assays in yeast. (E) BRET saturation assays analysis between RLuc-BH3-PUMA and YFP-BCL-xL or YFP-BCL-xLGRI in MCF-7 (F) BRET saturation assays analysis between RLuc-BH3-BAX and YFP-BCL-xL or YFP-BCL-xLGRI in MCF-7 cells. Data presented are representative of three independent experiments.

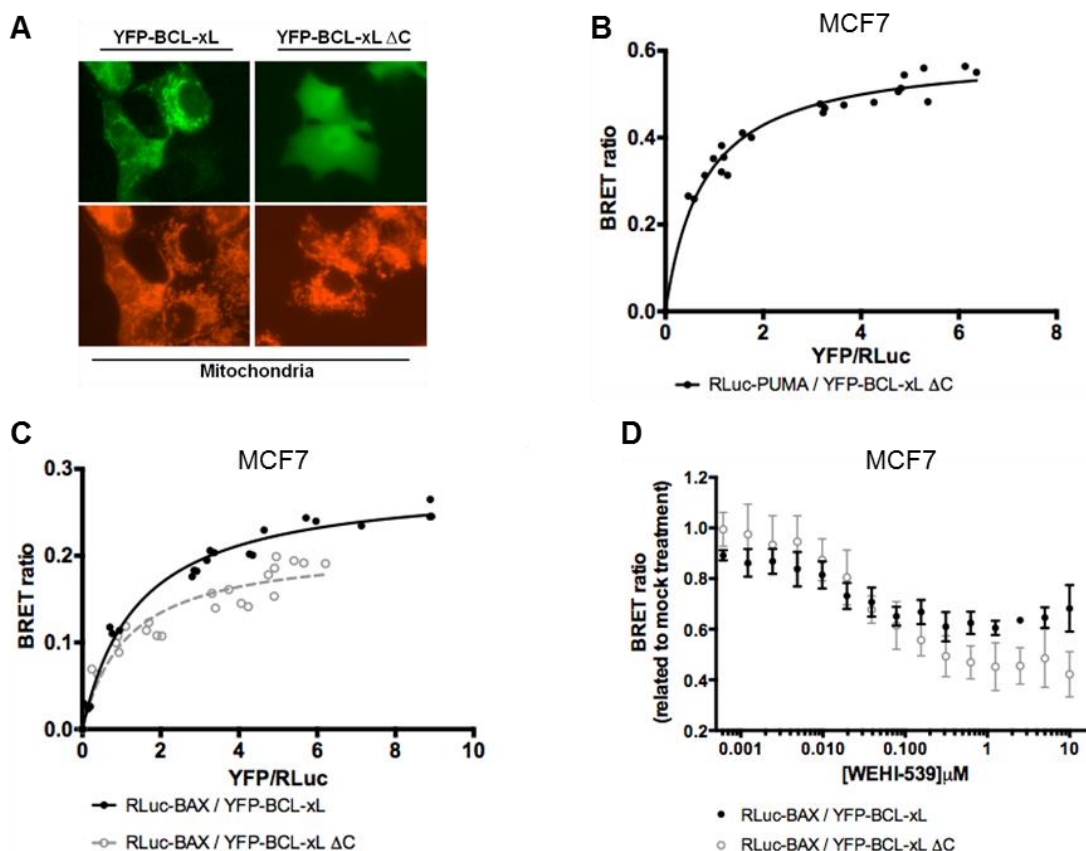
To investigate whether the strength of PUMA/BCL-xL interactions ensues from the strength of the interaction between the BH3 domain of PUMA and BCL-xL, we measured interactions between R-Luc fused to a short domain encompassing only the BH3 domain of PUMA (residues 127-162) and YFP-BCL-xL. Experiments were performed in MCF-7 cells as the toxicity of the R-Luc-PUMA(BH3) construct in



HCT116 cells precluded analysis in this background. As shown in Figure S7E, saturable and strong BRET signals were observed between R-Luc-PUMA(BH3) and YFP-BCL-xL. BRET signals were much weaker when BH3-binding deficient BCL-xL GRI mutant was used, validating the interactions observed in this paradigm. We evaluated the effect of a range of WEHI-539 concentrations on PUMA(BH3)/BCL-xL BRET signals obtained using an amount of acceptor YFP-BCL-xL below saturation. These interactions were only (and poorly) inhibited at concentrations higher than 5  $\mu$ M of WEHI-539 (Figure 6D), illustrating the robustness of PUMA-BH3 binding to cellular full length BCL-xL. In contrast, BRET signals between R-Luc-BAX(BH3) (encompassing residues 49-84) and YFP-BCL-xL were highly sensitive to WEHI-539 treatment (Figure 6D). The latter BRET signals were validated by saturation curve assays using the BH3-binding defective BCL-xL GRI as a negative control (Figure S7F).

When studied in solution, the interaction between PUMA and BCL-xL appears to be sensitive to BH3 mimetics (Gautier et al., 2011 and references therein). We thus reasoned that the resistance of cellular interactions revealed in the above assays might ensue from the fact that the full length BCL-xL protein we used is localized at intracellular membranes. To test this hypothesis, we reiterated BRET assays to monitor PUMA/BCL-xL interactions using a variant of YFP-fused BCL-xL deleted in its C-terminal end. The resulting protein (BCL-xL  $\Delta$ C) had a cytosolic localization, as opposed to that of full length BCL-xL (Figure S8A). Saturable BRET signals were observed between R-Luc-fused PUMA and YFP-fused BCL-xL  $\Delta$ C (Figure S8B). Most strikingly, when we evaluated the effect of a range of WEHI-539 concentrations on PUMA/BCL-xL- $\Delta$ C BRET signals with an amount of acceptor below saturation, we found that these interactions were significantly sensitive to WEHI-539 treatment, with concentrations as low as 10 nM having an effect, and an apparent median effective concentration in the 100 nM order (Figure 6E). Importantly, YFP-fused BCL-xL  $\Delta$ C also gave specific BRET signals with R-Luc-BAX (Figure S8C). However, the sensitivity of these signals to WEHI-539 was comparable to that of signals obtained between full length BCL-xL and BAX (Figure S8D). This argues that the membrane localization of BCL-xL is critical for the robustness of the interaction engaged with PUMA, and that it is comparatively much less essential for its interactions with BAX.

The fact that PUMA/BCL-xL interactions may only be sensitive to BH3 mimetics in solution suggests that cell solubilization used in classical co-immunoprecipitation assays can artificially weaken these interactions, leading to an overestimation of the effects of BH3 mimetics. In agreement with this, and consistent with preceding data (Gautier et al., 2011), an effect of BH3 mimetic treatment on endogenous PUMA/BCL-xL interactions in HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells was seen upon co-immunoprecipitation from cell lysates (Figure 6F). However, when more abundant complexes were investigated using lysates from HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX(BCL-xL) cells, this effect was not detected (Figure 6F), further underscoring the strength of PUMA/BCL-xL interactions.



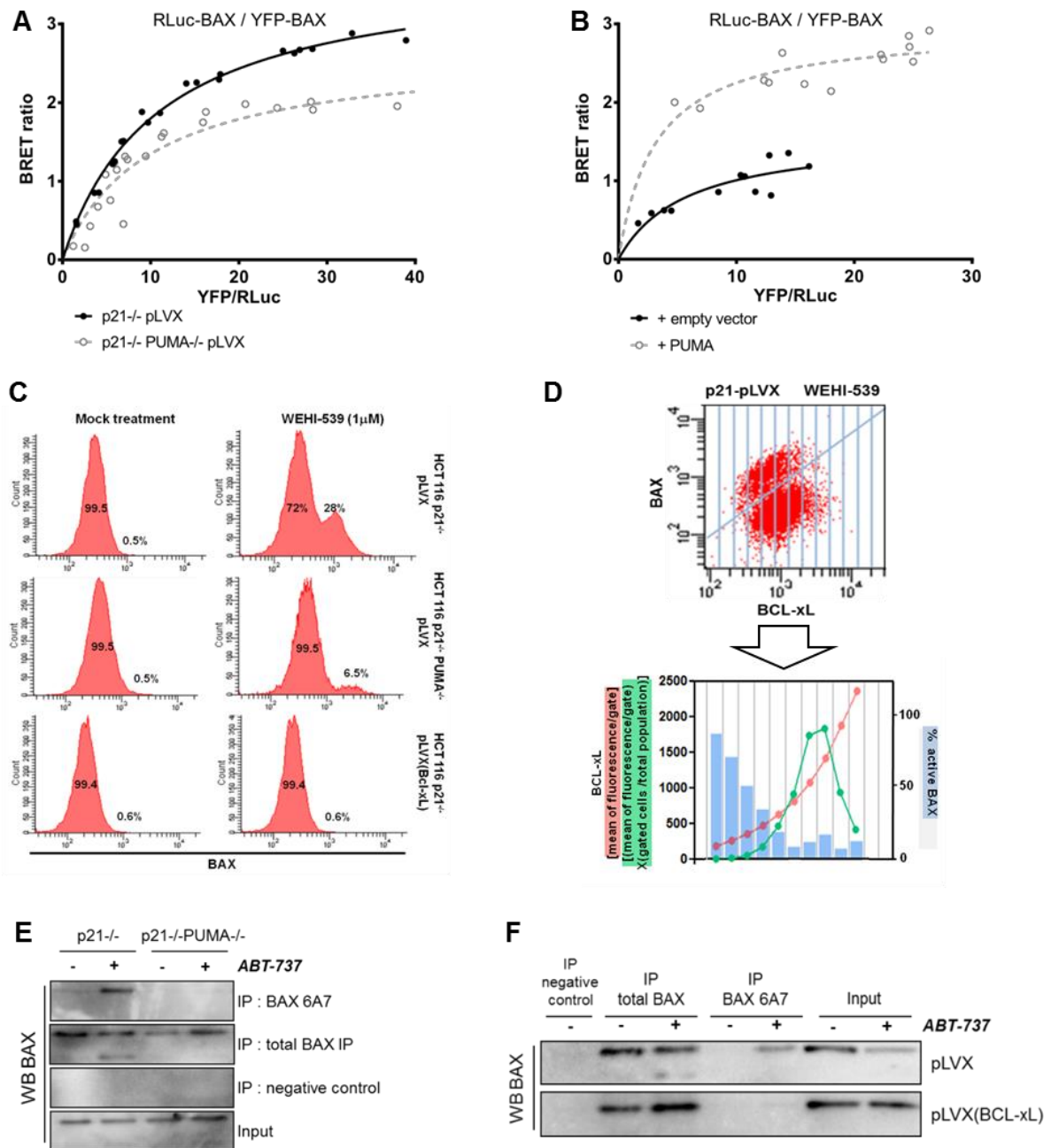
**Figure S8: BH3-mimetics do not inhibit interactions of mitochondrial BCL-xL with PUMA**

(A) Fluorescence microscopy image of MCF-7 cells transfected with YFP-BCL-xL or YFP-BCL-xL ΔC (green). Mitochondria (red) were visualized using MitoTracker Red CMXRos probe. (B, C) BRET saturation curve assays using RLuc-PUMA/YFP-BCL-xL ΔC (B), and RLuc-BAX/YFP-BCL-xL or RLuc-BAX/YFP-BCL-xL ΔC (C) were performed in MCF-7 cells. The data were fitted using a nonlinear regression equation assuming a single binding site. (D) Responses of the BRET couples RLuc-BAX/YFP-BCL-xL and RLuc-BAX/YFP-BCL-xL ΔC to WEHI-539 treatment was assessed by concentration curve experiments in MCF-7. Data presented are representative of three independent experiments.

**BH3 mimetics weakly inhibit the effects of BCL-xL on PUMA-induced BAX activation in whole cells**

We finally performed a series of experiments designed to further ascertain that PUMA favors BAX activation in response to BH3 mimetics and that enhanced BCL-xL expression prevents this. We started by investigating whether PUMA impacts on the ability of BAX to form oligomers as measured in BRET assays. We showed above in Figure 5A that this feature is inhibited by enhanced BCL-xL expression. In Figure 7A, we investigated the ability of endogenous PUMA to influence BAX oligomerization by comparing BRET saturation curves (measured between R-Luc-BAX and increasing amounts of YFP-BAX) in PUMA proficient (BH3 mimetic sensitive) and PUMA deficient (BH3 mimetic resistant) cells. We observed a better propensity for BAX to form oligomers when PUMA was expressed. In support to the notion that the diminished predisposition to oligomerize of ectopic BAX in PUMA deficient cells is a true consequence from their lack of PUMA expression, re-introduction of PUMA in these cells robustly enhanced BAX-BAX BRET signals (Figure 7B).





**Figure 7. BH3-mimetics weakly inhibit the effects of BCL-xL on PUMA-induced BAX activation in whole cells**

(A) BRET saturation curves were performed in the indicated HCT-116 cell lines using increasing amounts of vectors encoding YFP-BAX in the presence of a fixed amount of the vector-encoding RLuc-BAX (with Q-VD-OPh 5µM). The data were fitted using a nonlinear regression equation assuming a single binding site. (B) PUMA-dependent response of the BRET couple RLuc-BAX / YFP-BAX was assessed by saturation experiments in HCT p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup>-pLVX, transfected with control (mock) or vector encoding PUMA. (C) Flow cytometry analysis of HCT116 p21<sup>-/-</sup>-pLVX or HCT116 p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup>-pLVX treated with WEHI-539 (1 µM, 24 h) stained with BCL-xL-Alexa-488 and BAX-Alexa-647. (D) Relationship between BCL-xL expression and subset of active BAX was determined by dividing resulting dot plots (HCT116 p21<sup>-/-</sup>-pLVX treated cells) into vertical gates to grade BCL-xL expression ([Mean of fluorescence per gate] (red line), [Mean of fluorescence per gate x (gated cells/total population)] (green line)). % active BAX was defined for each vertical gate by collecting the number of cells above the skew line, then dividing it with the gated cells number. Data presented are representative of three independent experiments. (E) HCT116 p21<sup>-/-</sup> cell lines were treated with ABT-737 (1 µM, 16 h) before immunoprecipitation with a control, an anti-BAX or an anti-BAX6A7 antibody and western-blot analysis. (F) Cells were treated with ABT-737 (1 µM, 16 h) before immunoprecipitation with a control, an anti-BAX or an anti-BAX6A7 antibody and western-blot analysis

Finally, we investigated whether, in a BH3 mimetic sensitive cell population, individual variations in BCL-xL expression would determine whether PUMA-dependent BAX changes occur or not upon treatment. When we performed BAX intracellular staining assays described in Figure 7C, we found that, whereas treatment with WEHI-539 of HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX(BCL-xL) enhanced the mean expression of BCL-xL while keeping intact the log-normal distribution of expression levels, treatment of control HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX cells lead to the generation of a new population of cells that were strongly stained with the anti-BAX antibody (Figure 7D). We assume that the qualitative change in BAX immunostaining illustrates a change in its interaction with mitochondrial membranes and thus in its activation status. In support to this, the occurrence of this subpopulation largely depended on PUMA expression as it was not observed in treated PUMA knock out cells (Figure 7C). This change of BAX immunostaining in a fraction of treated cells is independent from caspases activation as it was not inhibited by treatment with the caspase inhibitor QVD-Oph (data not shown). We thus used the change in BAX immunostaining as a surrogate for BAX activation and performed intracellular immunostaining to concomitantly measure this feature and BCL-xL expression on a single cell basis in WEHI-treated HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells. Single-cell examination, in WEHI-539 treated HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX populations, of the percentage of cells highly positive for BAX as a function of the range of BCL-xL expression showed that qualitative changes in BAX immunostaining occurred preferentially in cells of the population that expressed the lowest levels of BCL-xL (Figure 7D).

Altogether, these data put forth a model of BCL-xL dependency where fractional BH3 mimetic sensitivity is promoted by induction of BAX activation by BCL-xL-free PUMA and mitigated by refractory sequestration of PUMA by BCL-xL. To further document the influence of PUMA and BCL-xL on conformational changes in BAX upon BH3 mimetic treatment, we monitored changes in the amino-terminus domain of BAX (changes that accompany BAX activation, Hsu and Youle, 1997) by immunoprecipitation assays with the 6A7 antibody. As shown in Figure 7E, we found detectable (albeit low) levels of 6A7 immunoreactive BAX molecules in untreated PUMA expressing cells but not in PUMA deficient ones. BH3 mimetic treatment robustly enhanced the amount of 6A7 positive BAX molecules in PUMA expressing

cells but not in PUMA knock out cells. The same experiments in BCL-xL overexpressing cells showed that enhanced BCL-xL prevented BH3 mimetic induction of PUMA dependent BAX conformational changes (Figure 7F).

---

## DISCUSSION

BCL-xL is frequently overexpressed in cancer cells where it appears to contribute to resistance to treatments. This results comes, in great part, from its potent anti-apoptotic activity, which relies on its binding to the BH3 domains of a wide array of pro-apoptotic BCL-2 family members. Currently available small molecules that occupy the BH3 binding site of BCL-xL are thus promising tools to overcome BCL-xL mediated chemoresistance. When it comes to targeting BCL-xL with these compounds, there is however an apparent paradox: BCL-xL is not well inhibited in some cell types, and efficiently so in others. High BCL-xL expression was shown to confer resistance to ABT-737 and/or ABT-263 (combined or not with chemotherapeutic drugs) in mouse embryonic fibroblasts (van Delft et al., 2006), leukemia cell lines (Tahir et al., 2010), T-acute lymphoblastic leukemia cell lines (Rooswinkel et al., 2012), non-Hodgkin lymphoma cells (Mérino et al., 2012) and chronic lymphocytic leukemia cells (Vogler et al., 2009). Our study shows that this is also the case in the colorectal cancer cell lines HCT116 and DLD-1 and in the breast cancer cell line MCF-7, and, importantly, that this resistance extends to treatment with the more selective and potent inhibitor WEHI-539 (as previously described in colon cancer stem cells (Colak et al., 2014)). In contrast, ABT-737 and/or WEHI-539 affect the viability of platelets (Mason et al., 2007, Lessene et al., 2013) and that of colon cancer stem cells and of HCT116, DLD-1 and MCF-7 cells that were not manipulated to enhance BCL-xL expression (Colak et al., 2014, and this study respectively).

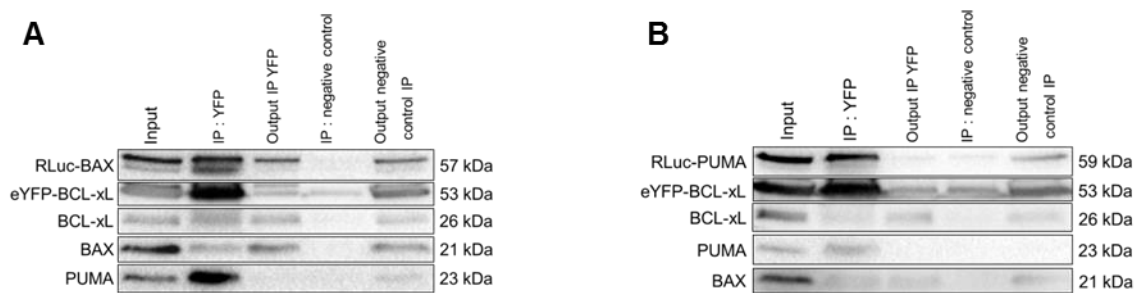
Our findings provide an explanation to this conundrum by showing that there are qualitative differences in the distinct proteins complexes BCL-xL engages to promote survival. Preceding work (Mérino et al., 2012, Rooswinkel et al., 2012), to compare inhibition of BCL-xL to that of BCL-2 or BCL-w by non-selective BH3 mimetics, analyzed the sensitivities of their interactions with one given pro-apoptotic counterpart. Albeit similar, our approach distinguishes from these studies in that we sought for molecular events that determine whether or not BCL-xL activity in itself can be overridden by a selective inhibitor. We thus compared interactions between BCL-xL and functionally distinct pro-apoptotic proteins and to do this without

generating too much bias using truncated proteins in solution, we used a technique allowing to quantitate interactions between full length proteins in a live cell, with intact subcellular compartments. We provide clear evidence of differing sensitivities between distinct BCL-xL complexes, putting forth the notion that BH3 mimetics are efficient when the balance between pro-apoptotic members and BCL-xL favors « fragile » complexes and that they are not when this balance favors « refractory » ones. Another, major, contribution of our study is that it describes the interaction BCL-xL engages with PUMA as a highly refractory one. Given the role played by PUMA in the apoptotic response to genotoxic treatments (Ren et al., 2010), this study is particularly relevant to cells undergoing genotoxic damage. We propose that the inability of BH3 mimetics to overcome the effects of BCL-xL in chemotherapy challenged cancer cells (Rooswinkel et al., 2012, this study) is due to the fact that BCL-xL counteracts PUMA in a BH3-mimetic resistant manner under these conditions.

We showed that PUMA can directly (id est, when free from anti-apoptotic proteins) promote activation of BAX (Cartron et al., 2004). This initial discovery was later refined by other groups from a functional (Du et al., 2011, Hockings et al., 2015) and structural (Edwards et al., 2013) standpoint and it is further substantiated by our findings that PUMA favors BAX conformational changes and oligomerization in whole cells. Altogether, these data imply that ligand-induced activation of BAX by PUMA constitutes a death signal that BCL-xL has to counteract to maintain survival (Gallenne et al., 2009). BH3 profiling assays show differential and additive effects of BCL-xL overexpression and PUMA knock-out. This is not consistent with a model wherein PUMA would only function as an inhibitor of BCL-xL. It further confirms, instead, that BCL-xL counteracts PUMA activity to maintain survival, and that it does so as a BH3-binding protein (since BH3 peptides de-repress this). Therefore, the fact that PUMA remains bound to BCL-xL upon treatment with a BH3 mimetic is arguably a mechanism that restrains its efficiency.

Our data are mostly consistent with the dual engagement model initially proposed by Llambi et al (Llambi et al., 2011), wherein anti-apoptotic proteins interact either with activator BH3-only proteins or with effector multi-domain pro-apoptotic proteins by

distinct modes differing in their anti-apoptotic efficiency and sensitivity to derepression. We refine this model on numerous aspects, and adapt it to BCL-xL mediated resistance to chemotherapy induced MOMP. Under these conditions (and in the model cell line used), BCL-xL critically engages PUMA (thereby preventing stress sensing by what Llambi et al. termed MODE 1), and BAX (thereby preventing stress response by MODE 2). Interactions are mutually exclusive as they rely on the BH3 binding interface of BCL-xL (disrupted in the GRI mutant) and are of distinct strengths due, at least in part, to differences in the BH3 domains involved. In agreement with this, and supporting the notion that PUMA binds to BCL-xL with more avidity than BAX, we found, in co-immunoprecipitation assays, that R-Luc-PUMA inhibited interactions between YFP-BCL-xL and endogenous BAX or PUMA better than R-Luc BAX (Figure S9).



**Figure S9. PUMA binds to BCL-xL with more avidity than BAX**

(A, B) HCT116 p21<sup>-/-</sup>pLVX were transfected with or vectors encoding RLuc-BAX and eYFP-BCL-xL (A) or RLuc-PUMA and YFP-BCL-xL (B), before immunoprecipitation with a control or an anti-GFP antibody and western-blot analysis. Signals corresponding to RLuc-BAX and YFP-BCL-xL (A) and to RLuc-PUMA and YFP-BCL-xL (B) are reproduced from figure 4B and figure 6B for illustrative purposes.

Moreover, interactions are not equally well targeted by BH3 mimetics: interactions with BAX are sensitive and these with PUMA are in comparison not sensitive at all when studied in whole live cells. These differences may explain why treatment with a weak peptidomimetic inhibitor of BCL-xL prevents interactions with BAX, but fail to prevent these with PUMA (Gautier et al., 2011). Upon induction of PUMA by stress, BH3 mimetics might thus be more efficient at favoring stress response (as they desquester BAX) than at amplifying stress sensing (as PUMA remains sequestered). In support to this, we found that PUMA induced BAX oligomerization and activation are counteracted by enhanced expression of BCL-xL: by binding to PUMA despite BH3 mimetic treatment, BCL-xL prevents these compounds from fully exploiting its ability to fully activate BAX. As a whole, our study seems at odds with that by Llambi et al who suggested that MODE 1 is more easily derepressed than

MODE 2 to promote cell death (Llambi et al., 2011). It should be noted, however, that these studies were essentially based on functional investigations and that they did not quantitate the effects of BH3 mimetics on protein-protein interactions. Moreover, they used truncated BID as the activator BH3-only protein. In cell-based assays using resonance energy transfer techniques similar to ours, the interaction of full length BCL-xL with this protein was shown to be sensitive to BH3 mimetic treatment (Aranovich et al., 2012). MODE 1 may be more or less sensitive to BH3 mimetic treatment than MODE 2 depending on the activator BH3-only protein on which MODE 1 relies.

BIM appears to be another BH3-only active that robustly interacts with BCL-xL: a resistance of BIM/BCL-xL interactions to BH3 mimetic treatment, evoking that reported here for PUMA/BCL-xL interactions has been reported (Aranovich et al., 2012, Mérimo et al., 2012). In the former case, additional non-BH3 mediated interactions were proposed to intervene. While this cannot be ruled out in the case of PUMA, we found that the interaction of the sole BH3 domain of PUMA with full length BCL-xL is in itself refractory to BH3 mimetic treatment. Binding of PUMA-BH3 to BCL-xL in solution is peculiar, in that it induces partial unfolding of BCL-xL (Follis et al., 2013). Mutation in Trp71 in PUMA-BH3, which contributes to this unfolding by being involved in  $\pi$ -stacking with His113 in BCL-xL, seems insufficient to sensitize the interaction of PUMA with full length BCL-xL to BH3 mimetics (data not shown). Thus, this structural motif does not seem to be, in itself, involved in the robustness of the PUMA/BCL-xL interactions. One reason for this robustness might be, instead, that the interaction between BCL-xL and PUMA-BH3 is of high affinity. The mitochondrial localization of BCL-xL, as evidenced by the sensitivity of interactions engaged with PUMA by cytosolic BCL-xL, is one more critical mechanism. Our observations are mostly consistent with the enhanced sensitivity of cytosolic (compared to mitochondrial) pools of complexes between BIM and full length BCL-xL to BH3 mimetic treatment (Aranovich et al., 2012). This provides strong support to the notion that membrane binding modifies the activity of BCL-xL by altering its functional interactions with pro-apoptotic proteins, and with PUMA in particular (reviewed in Leber et al., 2007, 2010). Membrane localization may alter association and dissociation rates of protein complexes, unmask additional domains in BCL-xL

contributing to BH3 binding, and/or permit post-translational modifications that are overlooked using cell free assays and recombinant proteins.

Despite the resistant mechanisms discussed above, BH3 mimetics can nevertheless trigger cell death because the PUMA/BAX/BCL-xL has one fragility: the interaction of BAX-BH3 and full length BAX with BCL-xL, and the effects of overexpressed BCL-xL on BAX oligomerization are sensitive to BH3 mimetics. Of note, this sensitivity implies that the resistance of PUMA/BCL-xL interactions to BH3 mimetics, and the resistance to cell death induction of BCL-xL overexpressing cells, do not simply result from the fact that cancer cells can express levels of this anti-apoptotic protein beyond the reach of the maximal achievable intracellular concentrations of compounds, but that they are a true consequence from built-in flaws in the mode of action of these molecules. By physical interaction with BAX, BCL-xL interferes with numerous process. Firstly, in the absence of overt activation, BAX shuttles back and forth from the cytosol to mitochondria and BCL-xL favors BAX cytosolic localization by a binding-dependent retro-translocation process (Edlich et al., 2011). Fusion of YFP, whose size is comparable to that of R-Luc, to the N-terminal end of BAX generates a protein that, when expressed in viable cells, partitions between the cytosol and the mitochondria. This suggests that R-Luc-BAX used in direct BRET assays is retro-translocation competent and it implies, consistent with previous studies (Edlich et al., 2011), that BH3 mimetics can interfere with the binding of BCL-xL to these forms of BAX. Secondly, BCL-xL prevents the oligomerization of membrane embedded activated forms of BAX (Subburaj et al., 2015). As BRET signals obtained between YFP-BCL-xL and R-Luc-BAX may not reflect interactions with embedded BAX, we measured the effects of enhanced BCL-xL expression on the oligomerization of BAX. To perform this in a whole cell configuration, we used a BRET based assay which showed strong energy transfer between ectopically expressed BAX molecules, a phenomenon we ascribe to the self-amplificatory nature of BAX oligomerization (Czabotar et al., 2013), even if it can be further enhanced by activators such as PUMA. BCL-xL prevented such oligomerization, and BH3 mimetic treatment derepressed these effects. It is interesting to note that the  $EC_{50}$  for BH3 mimetic to inhibit this effect is approximately 10 times higher than that observed to inhibit direct BAX/BCL-xL BRET signals. Quantitative comparisons between these two paradigms



are difficult but, since ectopic BCL-xL is expressed at lower levels in the oligomerization assays than in the interactions assays, this tends to suggest that the effects of BCL-xL on BAX oligomers are less readily derepressed by BH3 mimetics than direct interactions of BCL-xL with *bona fide* cytosolic BAX. This would conform to the fact that, under the former conditions, the binding interface between BCL-xL and BAX extends beyond the BH3 binding site *stricto sensu* and/or that membranes themselves contribute to enforce BCL-xL effects under these conditions (Ku et al., 2011, Ding et al., 2014), as they profoundly do for PUMA/BCL-xL interactions. In all cases, these data suggest that BH3 mimetic can more efficiently inhibit the effects of BCL-xL on activated BAX than these on PUMA. In further support to this, we found that direct BRET signals between BCL-xL and BAX S184V, a mutant of BAX that is constitutively bound to and inserted into mitochondrial membranes (Nechushtan et al., 1999) are sensitive to concentrations of BH3 mimetics that do not affect BCL-xL/PUMA BRET signals (data not shown).

Since BCL-xL sequesters PUMA in a BH3 mimetic resistant manner, and BAX in a BH3 mimetic sensitive one, PUMA might only contribute to BH3 mimetic induction of BAX dependent cell death when « in excess ». That is when the dynamic balance between PUMA, BAX and BCL-xL expressions and mutual interactions is such that PUMA can favor activation of BAX molecules, via a process fueled by BH3 mimetics-induced release of additional BAX molecules and blocked by enhanced BCL-xL expression. Which parameters are consistent with such a PUMA-induced, BCL-xL dependent state? To investigate this, we are currently building a mathematical model of MOMP control by the PUMA/BAX/BCL-xL adapted from Albeck et al., 2008, and trained with our estimation of protein concentrations present in relevant cells and with our measure of protein/protein interaction by BRET. We intend to use this model to reappraise the relative affinities between PUMA, BAX and BCL-xL and to unravel which parameters affect most acutely BH3 mimetic sensitivity. Along this line, our observation that cell to cell variations in BCL-xL expression levels may determine the fate of BH3 mimetic treated cells is of particular importance. In addition to illustrating how unstable the state of BH3 mimetic sensitivity is, it implies that BH3 mimetics treatment may quickly counterselect for cells with increased BCL-xL expression. This underscores the need to investigate how sustainable is the resistance of cells that

survive fractional killing by BH3 mimetics, and to understand the exact mechanism involved. This is all the more relevant as non-lethal treatment with these compounds leads to genomic instability (Ichim et al., 2015).

The view that arises from our data is that not only binding to protein partners but also to subcellular membranes might cause dynamic conformational and functional changes in BCL-xL, and influence its inhibition by BH3 mimetics. To understand how the BCL-2 network of functionally distinct interacting partners responds to BH3 mimetics, experimental systems that take into account membrane contribution in a whole cell configuration are required. The BRET approach we describe provides reliable and robust signals that allow real quantification of interactions that can only be inferred by colocalization assays. They exhibit a better signal to noise ratio than fluorescence based assays as energy transfer is initiated by a substrate rather than a light source. In addition, they are more reversible than signals measured in bimolecular complementation assays and are thus particularly adequate to measure the effects of inhibitors upon simple addition to the culture medium of appropriately transduced cells. This approach is thus particularly apposite to investigate the BCL-xL network and to define a model that incorporates the differences in binding affinities into the consequences for the cell response to BH3 mimetic. This is evidenced by the study presented here, which provides the rationale, conceptual framework and the tools to identify molecules that disrupt PUMA/BCL-xL interactions, and/or that permit BH3 mimetics to do so, thereby allowing to overcome efficiently BCL-xL mediated chemoresistance.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Reagents

The following compounds were used: ABT-737 (Selleck), ABT-199 (Selleck), WEHI-539 (ApexBio), Etoposide (Mylan), Doxorubicin (G GAM), Q-VD-OPh (R&D).

Antibodies used for western blotting were as follows: BCL-xL (Abcam), BAX (Dako), PUMA (D30C10, Cell signaling), BCL-2 (Dako), BIM (Abcam), BID (R&D), GFP (Abcam), RLuc (GeneTex), ACTIN (Millipore), Flag (Sigma-Aldrich), Horseradish peroxidase–conjugated antibodies (Jackson), Clean-Blot™ IP Detection Reagent (Thermo Scientific). Clarity western ECL substrate was obtained from Bio-Rad.

### Cell culture

The MCF-7 cell line was obtained from ATCC and cultured in RPMI1640 media (Life Technologies). Human colorectal cancer cells lines derived from HCT116 (p21<sup>-/-</sup>, p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup>, p21<sup>-/-</sup>-BAX<sup>-/-</sup>) were kindly provided by Dr. B. Vogelstein (The John Hopkins Kimmel Cancer Center, Baltimore, MD; REF) and cultured in Mc Coy's 5A media (Life Technologies). The DLD1-PUMA inducible cell line was provided by Dr. B. Vogelstein and cultured in Mc Coy's media, in the presence of 400 µg/ml G418, 250 µg/ml hygromycin B and 20 ng/ml doxycycline. The expression of HA-tagged PUMA was induced with doxycycline withdrawal. All cells were cultured in medium supplemented with 10 % fetal bovine serum, penicillin and streptomycin, at 37°C.

Cells over-expressing BCL-xL were obtained as follows. MCF-7 cells were transfected with pEYFP-C1 expression vector (Clontech) harboring the human BCL-xL coding sequence fused to the eYFP sequence, using Lipofectamine 2000 as transfecting agent. To generate a control cell line a second batch of cells was transfected instead with the empty pEYFP-C1 vector. After 48 h, stably transfected cells were selected in RPMI1640 medium containing 1 mg/ml of G418 for several weeks. HCT116 p21<sup>-/-</sup>, HCT116 p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup> and DLD1 inducible for PUMA cells were infected with lentiviral particles prepared using with pLVX-Puro expression vector (Clontech) harboring the human BCL-xL coding sequence (a kind gift from Dr O. Micheau). To generate a control cell line a second batch of cells was infected with lentiviral particles obtained using the empty pLVX-Puro vector. Forty eight hours following infection stably transfected cells were selected with a one week treatment with 1 µg/ml of puromycin.

Cell death rates were assessed by a trypan blue procedure.

### Flow cytometry intracellular staining

Cells were fixed in 1% paraformaldehyde (in PBS) for 10 min at RT and permeabilized in cold methanol for 30 min at 4°C. Next, cells were incubated with antibodies for 1 h at 4°C in dark : Rabbit IgG isotype control Alexa-488 (#4340S), BCL-xL-Alexa-488 (#2767S), Mouse IgG isotype control Alexa 647 (sc-24636), IgG Bax-647 (sc-20067), Rabbit IgG isotype control Alexa-647 (USBio I1903-93), Caspase 3 Alexa-647 (Cell Signaling 9602), Mouse IgG isotype control Alexa 488 (BioLegend 400129), IgG Bax Alexa 488 (NBP233092), Mouse IgG isotype control Alexa 647 (NBP2-24979), IgG

---

Mouse Bax6A7 Alexa 647 (NBP1-28566). Cells were washed twice in PBS containing 0,5% BSA. Flow cytometry analysis was performed just after the staining.

### **BRET assays**

RLuc expression plasmids were constructed by subcloning BAX, BCL-xL or PUMA (or derivatives thereof) coding sequences into the pRLuc-C2 vector (BioSignal Packard). eYFP expression plasmids were constructed by subcloning BCL-xL or BAX (or derivatives thereof) coding sequences into the pEYFP-C1 vector (BD Biosciences). All constructs were sequenced before use.

BRET saturation curves assays: at 24 h before transfection, cells were plated in 12-well plates. Cells were transfected with increasing amounts (50 to 1500 ng/well) of plasmids coding for a BRET acceptor (eYFP-BCL-xL, eYFP-BAX...), and constant amounts (50 ng/well) of plasmid expressing a BRET donor (RLuc-BAX, RLuc-PUMA fusion protein), using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. 24 h later, cells were collected and seeded in duplicates in 96-well white plates. Twenty four hours later, cells were treated during 16 h. Prior to BRET measurement, cells were washed once with PBS. Coelenterazine H substrate (Interchim) was injected in plates, in PBS at a final molarity of 5  $\mu$ M, and BRET was measured immediately and at 5 successive other times. BRET was monitored using the lumino/fluorometer Mithras LB 940 (Berthold Technologies, France), allowing for the sequential integration of luminescence with two filter settings. The emission signal values obtained at 530 nm were divided by the emission signal values obtained at 485 nm. The BRET ratio was calculated by subtracting the BRET signal value obtained with co-expressed donor and acceptor by that obtained with the donor protein expressed alone. Data shown are representative of at least three independent experiments.

BRET concentration/response curves assays: at 24 h before transfection, cells were plated in 6-well plates and transfected with 1,5  $\mu$ g of plasmids coding for a BRET acceptor (eYFP-BCL-xL, eYFP-BAX) and 150 ng of plasmid expressing a BRET donor (RLuc-BAX or RLuc-PUMA), using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). 24 h later, cells were collected and seeded in 96-well white plates. 24 h later, cells were treated 16 h with increasing concentrations of treatments (ABT-737, WEHI-539 or Etoposide). Prior to BRET measurement, cells were washed once with PBS. Coelenterazine H substrate (Interchim) was injected in plates, in PBS at a final molarity of 5  $\mu$ M and BRET was measured as described above. Data shown are representative of at least three independent experiments.

### **Immunoprecipitation assays**

Cells treated in 10 cm petri dishes were collected and washed with PBS. Cell lysis was performed using PBS-1%CHAPS buffer (plus a cocktail of protease and phosphatase inhibitors) and cellular suspensions were sonicated for 15 min thrice. Immunoprecipitations were performed as described in the PureProteome™ Protein G Magnetic Beads protocol (Millipore). Briefly, 10  $\mu$ l of anti-BCL-xL, 5  $\mu$ l of anti-BAX antibody (Dako), 10  $\mu$ l of anti-BAX 6A7 antibody (Abcam), 2  $\mu$ l of anti-GFP antibody (Abcam) or 5  $\mu$ l of anti-Flag (Sigma) antibody were used for 500  $\mu$ g of cell extract.

### $\Delta\Psi$ m BH3 Profile Using Whole Cells

Cell density was  $1 \times 10^4$  cells/well. 15  $\mu$ L of peptides in T-EB (300 mM Trehalose, 10 mM hepes-KOH pH 7.7, 80 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1% BSA, 5 mM succinate) were deposited per well in a black 384-well plate (BD Falcon no. 353285). Single cell suspensions were washed in T-EB before being resuspended at 4x their final density. One volume of the 4x cell suspension was added to one volume of a 4x dye solution containing 4  $\mu$ M JC-1, 40  $\mu$ g/mL oligomycin, 0.02% digitonin, 20 mM 2-mercaptoethanol in T-EB. This 2x cell/dye solution stood at RT for 5–10 min to allow permeabilization and dye equilibration. A total of 15  $\mu$ L of the 2x cell/dye mix was then added to each treatment well of the plate, shaken for 15 s inside the reader, and the fluorescence at 590 nm monitored every 5 min at RT.

### Quantitative PCR

Total RNA were extracted from cells using a kit Nucleospin® RNA (Macherey-Nagel) following the manufacturer instructions. Retro-transcription was performed from 500ng RNA using Maxima First strand cDNA Synthesis kit for RT-qPCR (Fisher Scientifique). Quantitative PCR was done by using the Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fisher Scientifique) and the MX4000 instrument (Strata-gene, Basel, Switzerland), according to the manufacturer. Data were analysed using Pfaffl method with 3 references genes. Following primers were used:

BCL2L1_for	TTCAGTGACCTGACATCCCA
BCL2L1_rev	TCCACAAAAGTATCCCAGCC
BCL2_for	CCTTCTTTGAGTTCGGTGGG
BCL2_rev	TCTTCAGAGACAGCCAGGAG
BAX_for	ACCGTGACCATCTTTGTG
BAX_rev	AAAACACAGTCCAAGGCA
MCL1_for	TCGGTACCTTCGGGAGCAGGC
MCL1_rev	CCCAGTTTGTTACGCCGTCGCT
BBC3_v123 For	ACCTCAACGCACAGTACGA
BBC3_v123 Rev	GCACCTAATTGGGCTCCATC
BAK1_for	GCCCACGGCAGAGAATGCCT
BAK1_rev	AGGGCCAGACGGTAGCCGAA
QSBIM2	GCCTTCAACCACTATCTCAG
QASBIM2	TAAGCGTTAAACTCGTCTCC

### Data analysis

Data were from at least three independent experiments. Statistical analysis of data was performed using one-way ANOVA, two-ways ANOVA or Mann-Whitney tests on GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA). Error bars represent S.E.Ms. The following symbols are used: \*, \*\* and \*\*\*. They correspond to a P value inferior to 0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

**BIBLIOGRAPHY**

- Albeck, J.G., Burke, J.M., Spencer, S.L., Lauffenburger, D.A., and Sorger, P.K. (2008). Modeling a Snap-Action, Variable-Delay Switch Controlling Extrinsic Cell Death. *PLoS Biol* 6, e299.
- Amundson, S.A., Myers, T.G., Scudiero, D., Kitada, S., Reed, J.C., and Fornace, A.J. (2000). An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 60, 6101–6110.
- Aranovich, A., Liu, Q., Collins, T., Geng, F., Dixit, S., Leber, B., and Andrews, D.W. (2012). Differences in the mechanisms of proapoptotic BH3 proteins binding to Bcl-XL and Bcl-2 quantified in live MCF-7 cells. *Mol. Cell* 45, 754–763.
- Bah, N., Maillet, L., Ryan, J., Dubreil, S., Gautier, F., Letai, A., Juin, P., and Barillé-Nion, S. (2014). Bcl-xL controls a switch between cell death modes during mitotic arrest. *Cell Death Dis.* 5, e1291.
- Billen, L.P., Kokoski, C.L., Lovell, J.F., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol.* 6, e147.
- Cartron, P.-F., Moreau, C., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K., and Vallette, F.M. (2002). Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function. *FEBS Lett.* 512, 95–100.
- Cartron, P.-F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M., and Juin, P. (2004). The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol. Cell* 16, 807–818.
- Colak, S., Zimmerlin, C.D., Fessler, E., Hogdal, L., Prasetyanti, P.R., Grandela, C.M., Letai, A., and Medema, J.P. (2014). Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. *Cell Death Differ.* 21, 1170–1177.
- Czabotar, P.E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Yao, S., Robin, A.Y., Smith, B.J., et al. (2013). Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* 152, 519–531.
- van Delft, M.F., Wei, A.H., Mason, K.D., Vandenberg, C.J., Chen, L., Czabotar, P.E., Willis, S.N., Scott, C.L., Day, C.L., Cory, S., et al. (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 10, 389–399.
- Dewson, G., Kratina, T., Czabotar, P., Day, C.L., Adams, J.M., and Kluck, R.M. (2009). Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their alpha6 helices. *Mol. Cell* 36, 696–703.
- Dewson, G., Ma, S., Frederick, P., Hockings, C., Tan, I., Kratina, T., and Kluck, R.M. (2012). Bax dimerizes via a symmetric BH3:groove interface during apoptosis. *Cell Death Differ.* 19, 661–670.
- Ding, J., Mooers, B.H.M., Zhang, Z., Kale, J., Falcone, D., McNichol, J., Huang, B., Zhang, X.C., Xing, C., Andrews, D.W., et al. (2014). After embedding in membranes antiapoptotic Bcl-XL protein binds both Bcl-2 homology region 3 and helix 1 of proapoptotic Bax protein to inhibit apoptotic mitochondrial permeabilization. *J. Biol. Chem.* 289, 11873–11896.
- Du, H., Wolf, J., Schafer, B., Moldoveanu, T., Chipuk, J.E., and Kuwana, T. (2011). BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *J. Biol. Chem.* 286, 491–501.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145, 104–116.
- Edwards, A.L., Gavathiotis, E., LaBelle, J.L., Braun, C.R., Opoku-Nsiah, K.A., Bird, G.H., and Walensky, L.D. (2013). Multimodal interaction with BCL-2 family proteins underlies the proapoptotic activity of PUMA BH3. *Chem. Biol.* 20, 888–902.
- Follis, A.V., Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Yun, M.-K., Grace, C.R., Nourse, A., Baran, K., Ou, L., Min, L., White, S.W., et al. (2013). PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis. *Nat. Chem. Biol.* 9, 163–168.

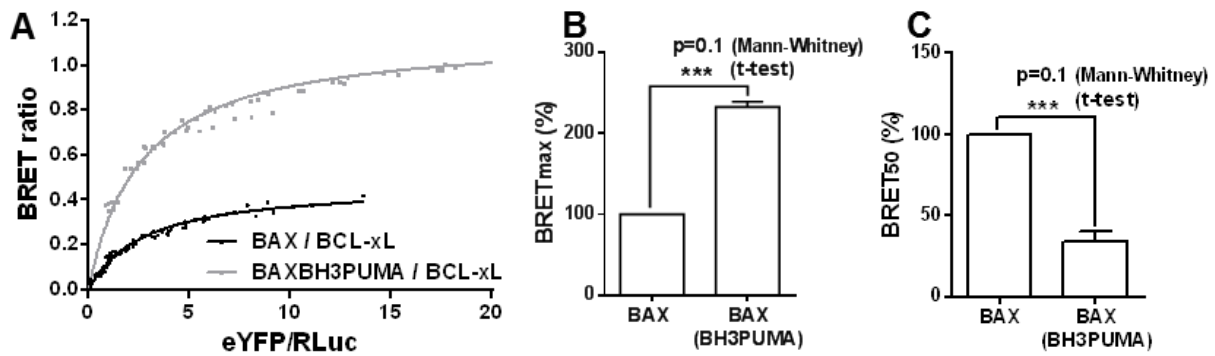
- Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., Noël, B., Hickman, J.A., Geneste, O., Cartron, P.-F., Vallette, F.M., Manon, S., et al. (2009a). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J. Cell Biol.* *185*, 279–290.
- Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., Noël, B., Hickman, J.A., Geneste, O., Cartron, P.-F., Vallette, F.M., Manon, S., et al. (2009b). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J. Cell Biol.* *185*, 279–290.
- Gautier, F., Guillemin, Y., Cartron, P.F., Gallenne, T., Cauquil, N., Le Diguarher, T., Casara, P., Vallette, F.M., Manon, S., Hickman, J.A., et al. (2011). Bax activation by engagement with, then release from, the BH3 binding site of Bcl-xL. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 832–844.
- Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M.L., Pitter, K., Bird, G.H., Katz, S.G., Tu, H.-C., Kim, H., Cheng, E.H.-Y., Tjandra, N., et al. (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* *455*, 1076–1081.
- Hockings, C., Anwari, K., Ninnis, R.L., Brouwer, J., O’Hely, M., Evangelista, M., Hinds, M.G., Czabotar, P.E., Lee, E.F., Fairlie, W.D., et al. (2015). Bid chimeras indicate that most BH3-only proteins can directly activate Bak and Bax, and show no preference for Bak versus Bax. *Cell Death Dis.* *6*, e1735.
- Hsu, Y.-T., and Youle, R.J. (1997). Nonionic Detergents Induce Dimerization among Members of the Bcl-2 Family. *J. Biol. Chem.* *272*, 13829–13834.
- Ichim, G., Lopez, J., Ahmed, S.U., Muthalagu, N., Giampazolias, E., Delgado, M.E., Haller, M., Riley, J.S., Mason, S.M., Athineos, D., et al. (2015). Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Mol. Cell* *57*, 860–872.
- Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K.H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J.N., et al. (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* *4*, 321–328.
- Jorgensen, T.N., McKee, A., Wang, M., Kushnir, E., White, J., Refaeli, Y., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2007). Bim and Bcl-2 mutually affect the expression of the other in T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 3417–3424.
- Ku, B., Liang, C., Jung, J.U., and Oh, B.-H. (2011). Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Res.* *21*, 627–641.
- Leber, B., Lin, J., and Andrews, D.W. (2007). Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *12*, 897–911.
- Leber, B., Lin, J., and Andrews, D.W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene* *29*, 5221–5230.
- Lessene, G., Czabotar, P.E., Sleebs, B.E., Zobel, K., Lowes, K.N., Adams, J.M., Baell, J.B., Colman, P.M., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., et al. (2013). Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 390–397.
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A Unified Model of Mammalian BCL-2 Protein Family Interactions at the Mitochondria. *Mol. Cell* *44*, 517–531.
- Mason, K.D., Carpinelli, M.R., Fletcher, J.I., Collinge, J.E., Hilton, A.A., Ellis, S., Kelly, P.N., Ekert, P.G., Metcalf, D., Roberts, A.W., et al. (2007). Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* *128*, 1173–1186.
- Mérino, D., Khaw, S.L., Glaser, S.P., Anderson, D.J., Belmont, L.D., Wong, C., Yue, P., Robati, M., Phipson, B., Fairlie, W.D., et al. (2012). Bcl-2, Bcl-x(L), and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells. *Blood* *119*, 5807–5816.
- Moldoveanu, T., Follis, A.V., Kriwacki, R.W., and Green, D.R. (2014). Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 101–111.
- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* *7*, 683–694.

- Nechushtan, A., Smith, C.L., Hsu, Y.-T., and Youle, R.J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J.* *18*, 2330–2341.
- Nguyen, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Korsmeyer, S.J., and Shore, G.C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.* *268*, 25265–25268.
- Ottillie, S., Diaz, J.L., Chang, J., Wilson, G., Tuffo, K.M., Weeks, S., McConnell, M., Wang, Y., Oltersdorf, T., and Fritz, L.C. (1997). Structural and functional complementation of an inactive Bcl-2 mutant by Bax truncation. *J. Biol. Chem.* *272*, 16955–16961.
- Ren, D., Tu, H.-C., Kim, H., Wang, G.X., Bean, G.R., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., and Cheng, E.H.-Y. (2010). BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science* *330*, 1390–1393.
- Rooswinkel, R.W., van de Kooij, B., Verheij, M., and Borst, J. (2012). Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B. *Cell Death Dis.* *3*, e366.
- Ryan, J., and Letai, A. (2013). BH3 profiling in whole cells by fluorimeter or FACS. *Methods San Diego Calif* *61*, 156–164.
- Subburaj, Y., Cosentino, K., Axmann, M., Pedrueza-Villalmanzo, E., Hermann, E., Bleicken, S., Spatz, J., and García-Sáez, A.J. (2015). Bax monomers form dimer units in the membrane that further self-assemble into multiple oligomeric species. *Nat. Commun.* *6*.
- Tahir, S.K., Wass, J., Joseph, M.K., Devanarayan, V., Hessler, P., Zhang, H., Elmore, S.W., Kroeger, P.E., Tse, C., Rosenberg, S.H., et al. (2010). Identification of expression signatures predictive of sensitivity to the Bcl-2 family member inhibitor ABT-263 in small cell lung carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines. *Mol. Cancer Ther.* *9*, 545–557.
- Villedieu, M., Louis, M.-H., Dutoit, S., Brotin, E., Lincet, H., Duigou, F., Staedel, C., Gauduchon, P., and Poulain, L. (2007). Absence of Bcl-xL down-regulation in response to cisplatin is associated with chemoresistance in ovarian carcinoma cells. *Gynecol. Oncol.* *105*, 31–44.
- Vogler, M., Butterworth, M., Majid, A., Walewska, R.J., Sun, X.-M., Dyer, M.J.S., and Cohen, G.M. (2009). Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *113*, 4403–4413.
- Wilfling, F., Weber, A., Potthoff, S., Vögtle, F.-N., Meisinger, C., Paschen, S.A., and Häcker, G. (2012). BH3-only proteins are tail-anchored in the outer mitochondrial membrane and can initiate the activation of Bax. *Cell Death Differ.* *19*, 1328–1336.
- Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Zhang, L. (2003). PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 1931–1936.



## B. PUMA interagit avec BCL-xL via son domaine BH3

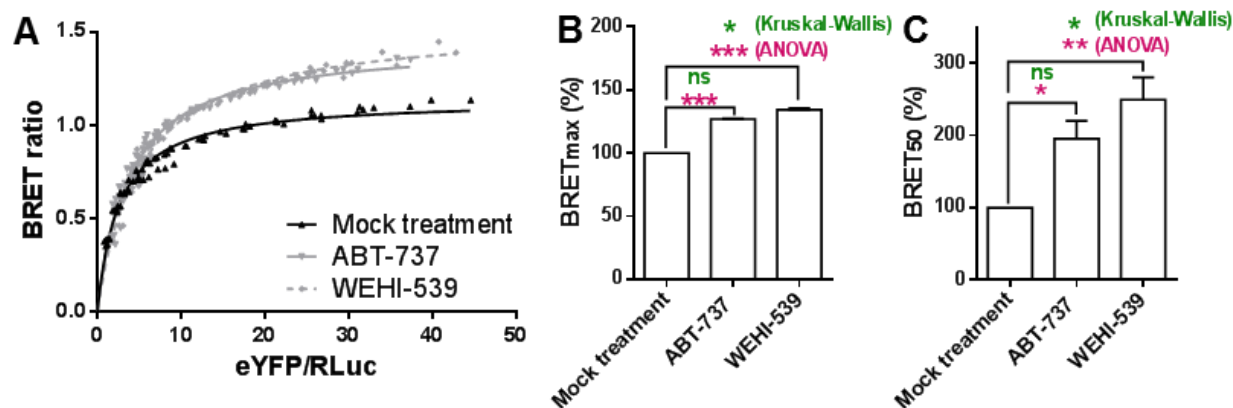
Des essais BRET avec la protéine BAX(BH3PUMA) (forme de BAX ayant son domaine BH3 remplacé par celui de PUMA) ont été réalisés afin de compléter les tests effectués avec des protéines entières ou des domaines BH3 seuls (figure 6 de l'article). Nous avons procédé à des essais de saturation BRET dans des cellules co-exprimant une quantité constante de donneur RLuc-BAX(BH3PUMA) et des quantités croissantes d'accepteur eYFP-BCL-xL. Un faible niveau de donneur permettant d'obtenir un signal de luminescence suffisant et stable est utilisé. Les interactions spécifiques résultent en un signal BRET qui tend à atteindre un plateau pour de fortes quantités d'accepteur exprimées tandis que les interactions non-spécifiques résultent en un signal BRET qui augmente parallèlement à l'augmentation de la quantité d'accepteur, de façon linéaire. La **figure 21** montre les courbes de saturation obtenues qui tendent à atteindre un plateau pour de fortes quantités d'eYFP-BCL-xL exprimées, ce qui correspond à un profil d'interaction spécifique et saturante entre ces deux protéines. Les signaux  $BRET_{max}$  (BRET maximal, correspondant au transfert d'énergie maximal mesuré au plateau de la courbe de saturation) sont augmentés suite au remplacement du domaine BH3 de BAX par celui de PUMA (versus le BRET mesuré pour le couple BAX/BCL-xL) (**figure 21-B**). Ceci est en accord avec le fait que le domaine BH3 de PUMA est impliqué dans l'interaction avec BCL-xL (données présentées dans la figure S7E de l'article avec l'étude du couple BH3PUMA/BCL-xL). Nous pouvons poser l'hypothèse que le BRET plus important observé avec BAX(BH3PUMA) est relié à une affinité plus forte du BH3 de PUMA pour BCL-xL que celle du BH3 de BAX. En effet, l'évaluation de l'affinité relative du couple BRET RLuc-BAX(BH3PUMA) / eYFP-BCL-xL, le  $BRET_{50}$  (**figure 21-C**), correspondant au rapport eYFP/RLuc pour lequel un BRET égal à 50 % du BRET maximal est obtenu, suggère que l'affinité de BAX(BH3PUMA) pour BCL-xL est meilleure que celle de BAX. Il faut moins de BCL-xL pour atteindre une même intensité de signal BRET BAX(BH3PUMA)/BCL-xL. Autrement dit, le signal BRET sature plus rapidement pour le couple BAX(BH3PUMA)/BCL-xL, d'où une valeur de  $BRET_{50}$  plus faible dans ces conditions. Ceci corrèle avec les données de l'article dans lesquelles les interactions PUMA/BCL-xL sont décrites comme réfractaires aux BH3-mimétiques, alors que les interactions BAX / BCL-xL y sont sensibles.



**Figure 21 : Le domaine BH3 de PUMA interagit avec BCL-xL**

(A) La lignée HCT116 p21<sup>-/-</sup> est transfectée par 50 ng de plasmide codant RLuc-BAX ou RLuc-BAX(BH3PUMA) et des quantités croissantes de plasmides codant eYFP-BCL-xL avant mesure du BRET et détermination des paramètres BRETmax (B) et BRET50 (C). Les données présentées sont représentatives de trois expériences indépendantes.

Nous avons ensuite évalué la réponse du couple BAX(BH3PUMA)/BCL-xL aux BH3-mimétiques. Pour cela nous avons effectué des expériences de saturation BRET avec le couple RLuc-BAX(BH3PUMA)/eYFP-BCL-xL en présence d'ABT-737 ou de WEHI-539 (figure 22). Les données obtenues montrent une modulation de l'interaction par les BH3-mimétiques qui se traduit par une augmentation du BRET<sub>max</sub> sous traitement (figure 22-B), ce qui corrèle avec une modification de transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur. De plus, le BRET<sub>50</sub> est augmenté (figure 22-C), reflétant une diminution de l'affinité relative du couple en présence de BH3-mimétiques. Les résultats présentés dans l'article montrent une sensibilité des interactions BAX/BCL-xL aux BH3-mimétiques (figure 4 de l'article), alors que les interactions PUMA/BCL-xL y sont résistantes (figure 6 de l'article). Au-delà de l'implication du domaine BH3 de BAX et de PUMA dans l'interaction avec BCL-xL, ces résultats montrent que le contexte protéique présent dans chacun de ces acteurs semble déterminer la sensibilité des interactions aux BH3-mimétiques.

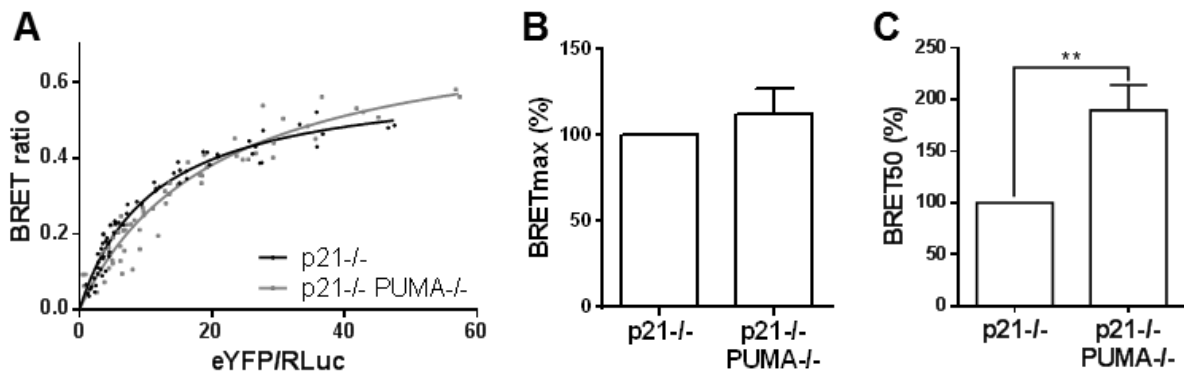


**Figure 22 : Le couple BAX(BH3PUMA) / BCL-xL est sensible aux BH3-mimétiques**

(A) La lignée HCT116 p21<sup>-/-</sup> est transfectée par 50 ng de plasmide codant RLuc-BAX ou RLuc-BAX(BH3PUMA) et des quantités croissantes de plasmides codant eYFP-BCL-xL, puis traitée à l'ABT-737 ou au WEHI-539 (1  $\mu$ M, 16 h) avant mesure du BRET. La réponse du complexe RLuc-BAX(BH3PUMA) / eYFP-BCL-xL aux BH3-mimétiques est évaluée après un traitement ABT-737 ou WEHI-539 (1  $\mu$ M, 16 h). Les BRETmax (B) et BRET50 (C) présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

### C. PUMA modifie les propriétés de l'interaction BAX / BCL-xL

Des travaux précédemment effectués au laboratoire (Gallenne et al., 2009) ont montré que PUMA et BAX sont requis pour le déclenchement de la mort cellulaire sous inhibition de BCL-xL. L'activation de BAX, via son interaction avec PUMA, est au cœur de ce phénomène. PUMA est un acteur avéré d'induction de la mort lors de traitements chimiothérapeutiques (Middelburg et al., 2005) et BCL-xL est un frein à la mort cellulaire BAX-dépendante induite par PUMA. PUMA étant capable d'interagir avec BAX (Cartron et al., 2004) et avec BCL-xL (Yu et al., 2003), nous avons cherché à déterminer dans quelles mesures cette protéine est capable de moduler les interactions entre BAX et BCL-xL en cellule entière vivante. La **figure 23** présente des courbes de saturation RLuc-BAX/eYFP-BCL-xL qui tendent à atteindre un plateau pour de fortes quantités d'eYFP-BCL-xL exprimées, ce qui correspond à un profil d'interaction spécifique et saturante entre ces deux protéines.



**Figure 23 : PUMA modifie les propriétés du complexe RLuc-BAX / eYFP-BCL-xL**

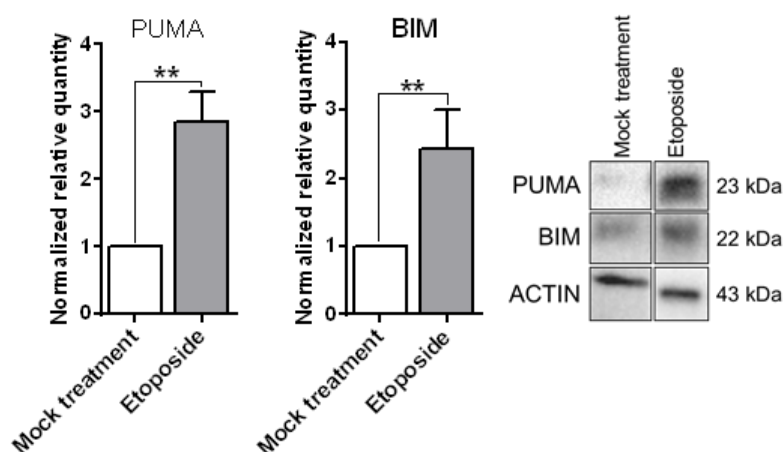
(A) Les lignées HCT116 p21<sup>-/-</sup> et p21<sup>-/-</sup>PUMA<sup>-/-</sup> sont transfectées par 50 ng de plasmide codant RLuc-BAX et des quantités croissantes de plasmides codant eYFP-BCL-xL avant mesure du BRET et déduction des paramètres BRET<sub>max</sub> (B) et BRET<sub>50</sub> (C). Les courbes présentées sont représentatives de quatre expériences indépendantes.

Afin d'étudier l'effet de PUMA endogène sur le BRET BAX/BCL-xL, nous avons réalisé des expériences de saturation BRET dans des cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> et p21<sup>-/-</sup>PUMA<sup>-/-</sup>. Les résultats présentés **figure 23** montrent une courbe de saturation dans la lignée p21<sup>-/-</sup>PUMA<sup>-/-</sup>, indiquant que PUMA n'est pas indispensable pour l'interaction entre RLuc-BAX et eYFP-BCL-xL. De plus, les courbes de saturation obtenues dans les deux lignées nous indiquent que les niveaux endogènes de PUMA exprimés dans les cellules p21<sup>-/-</sup> modifient de façon détectable les propriétés de l'interaction observée. En effet, l'évaluation de l'affinité relative du couple BRET étudié, le BRET<sub>50</sub> (**figure 23-C**), suggère que la présence de PUMA endogène augmente l'affinité du couple BRET BAX / BCL-xL. En effet, il faut moins de BCL-xL pour atteindre une même intensité de signal BRET BAX / BCL-xL en présence de PUMA (versus en absence de PUMA). Autrement dit, le signal BRET sature plus rapidement en présence de PUMA, d'où une valeur de BRET<sub>50</sub> plus faible dans ces conditions. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que PUMA active BAX, augmentant l'exposition de son domaine BH3 et ses capacités à interagir avec BCL-xL. Il faut noter que ce changement d'affinité relative ne s'accompagne pas d'une modification du BRET<sub>max</sub> (**figure 23-B**).

Dans le but de valider l'effet de PUMA sur l'interaction BAX/BCL-xL dans des conditions proches de celles utilisées en clinique, nous avons utilisé une approche d'induction de ce BH3-seul par un agent de chimiothérapie. L'expression de PUMA peut être induite sous traitement par un agent de chimiothérapie tel que l'étoposide, utilisé dans le traitement de nombreux cancers. Cette molécule se lie à l'ADN et

inhibe l'entrée en mitose des cellules tumorales par une action sur la topo-isomérase II (enzyme contrôlant la structure de l'ADN en y générant des coupures transitoires lors de la réplication). L'étoposide, en agissant sur les complexes ADN/topo-isomérase II, empêche la religation de la molécule d'ADN coupée par la topo-isomérase II : il en résulte une cassure définitive des deux brins. Ainsi, l'accumulation de cassures d'ADN double brins recrute et active p53. Ceci induit une augmentation de la transcription de ses gènes cibles (dont *PUMA*), ce qui aboutit à l'apoptose. Nous avons utilisé l'étoposide comme outil d'étude de l'influence de PUMA sur l'interaction BAX/BCL-xL. Bien que l'étoposide n'ait pas pour seul effet d'induire PUMA, il demeure un outil intéressant, permettant de se placer dans des conditions d'induction de PUMA proches de celles utilisées dans un contexte de chimiothérapie.

L'induction de l'expression de PUMA sous étoposide a été vérifiée dans notre modèle d'étude HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX (lignée transduite avec un virus contrôle) au moyen d'expériences de western blot sur lysats cellulaires (**figure 24**). Nous remarquons également une induction de la protéine à BH3-seul BIM sous traitement, soulignant les effets multiples de ce composé, également décrit par ailleurs comme activateur de l'expression de BAX (Karpinich et al., 2002).



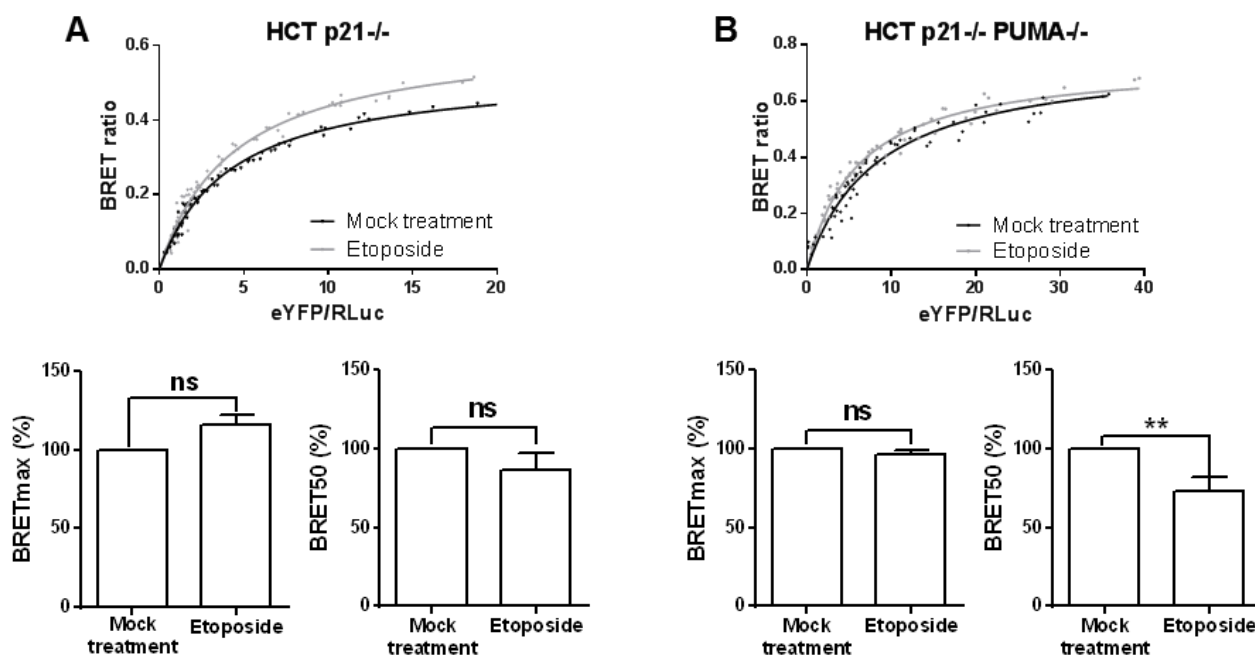
**Figure 24 : L'étoposide augmente l'expression des pro-apoptotiques à BH3-seul PUMA et BIM**

Des lysats protéiques de la lignée HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX ont été analysés par western blot. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

Afin de déterminer si l'étoposide affecte effectivement la capacité de BAX à interagir avec BCL-xL de façon dépendante de l'induction de PUMA, nous avons effectué des expériences de concentration/réponse à l'étoposide en BRET sur le

couple RLuc-BAX/eYFP-BCL-xL dans les lignées HCT116 p21<sup>-/-</sup> et p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup> (données non présentées). Pour cela nous avons transfecté ces lignées avec une quantité fixe de plasmides codant pour RLuc-BAX et eYFP-BCL-xL, puis procédé à un traitement par des concentrations croissantes d'étoposide durant 16 h avant lecture du BRET. Ces expériences ne nous ont pas permis de pouvoir tracer de courbes concentration/réponse, la réponse à l'étoposide du couple étudié ne semblant pas dépendante de la dose d'étoposide appliquée. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : d'une part, la structure de l'étoposide n'a pas été créée spécifiquement pour moduler l'interaction BAX/BCL-xL (à l'opposé des BH3-mimétiques), son effet est donc probablement moins marqué et difficilement quantifiable de façon fine sur l'interaction étudiée. D'autre part, il est possible que l'étoposide ait un effet de type « tout ou rien » sur l'interaction étudiée, ce qui expliquerait le manque de réponse dose-dépendante observée.

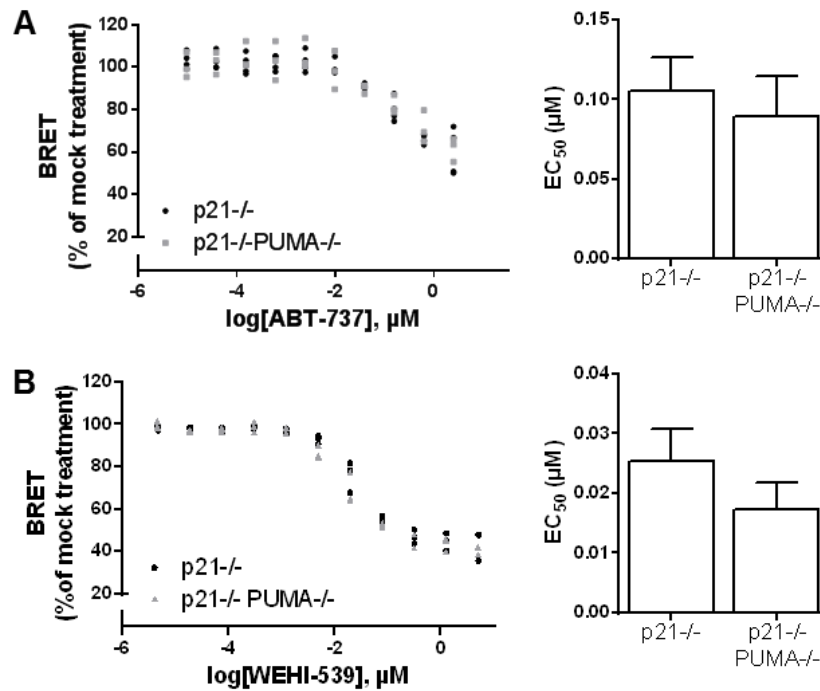
La réponse du couple RLuc-BAX/eYFP-BCL-xL à l'étoposide a par la suite été évaluée par des expériences de saturation BRET dans les lignées HCT116 p21<sup>-/-</sup> et p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup>. Nous avons observé que le traitement à l'étoposide ne dissocie pas totalement le couple BRET BAX/BCL-xL (car le signal BRET observé est saturable) mais tend à augmenter le BRET mesuré (**figure 25**). Cette augmentation du BRET<sub>max</sub> ne s'accompagne pas d'une diminution du BRET<sub>50</sub> du couple à laquelle nous aurions pu nous attendre au vu des résultats présentés **figure 23**. Nous pouvons malgré tout supposer que l'augmentation du BRET<sub>max</sub> observée corrèle avec une meilleure affinité de BAX pour BCL-xL. Cet effet ne dépend pas uniquement de PUMA puisque nous notons une diminution du BRET<sub>50</sub> associé à l'interaction sous traitement étoposide dans les HCT p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup>, probablement reliée à d'autres effecteurs tels que BIM. De plus, des expériences préliminaires similaires menées sur le couple BRET RLuc-BAX/eYFP-BAX ont montré un effet d'augmentation du BRET BAX/BAX sous traitement étoposide, de façon indépendante de PUMA (données non présentées), suggérant que l'étoposide n'est pas un outil suffisamment fin pour nous permettre une étude spécifique des effets de PUMA sur BAX et BCL-xL.



**Figure 25 : L'étoposide modifie les propriétés du complexe RLuc-BAX / eYFP-BCL-xL indépendamment de PUMA**

Les lignées HCT116 p21<sup>-/-</sup> (A) et p21<sup>-/-</sup>PUMA<sup>-/-</sup> (B) sont transfectées par 50 ng de plasmide codant RLuc-BAX et des quantités croissantes de plasmides codant eYFP-BCL-xL, puis traitées à l'étoposide (50  $\mu$ M, 16 h) avant mesure du BRET et détermination des paramètres BRET<sub>max</sub> et BRET<sub>50</sub>. Les courbes présentées sont représentatives de quatre expériences indépendantes.

Nous nous sommes ensuite demandé si PUMA endogène était capable d'influencer la capacité du couple BRET BAX/BCL-xL à répondre à un traitement par des BH3-mimétiques. Pour cela nous avons évalué la réponse de ce couple à une série de doses croissantes d'ABT-737 ou de WEHI-539 par des expériences de concentration/réponse en BRET, en comparant les EC<sub>50</sub> (Effective Concentration 50 = concentration permettant d'obtenir 50 % de la réponse maximale observée) obtenues dans les lignées HCT116 p21<sup>-/-</sup> et p21<sup>-/-</sup>PUMA<sup>-/-</sup>. Les résultats présentés **figure 26** illustrent une réponse similaire à l'ABT-737 (**figure 26-A**) et au WEHI-539 (**figure 26-B**) dans les deux lignées : bien que PUMA favorise l'interaction BAX/BCL-xL (**figure 23**), cela ne se traduit pas par un changement de sensibilité aux BH3-mimétiques.



**Figure 26 : PUMA ne modifie pas la capacité du complexe RLuc-BAX / eYFP-BCL-xL à répondre aux BH3-mimétiques**

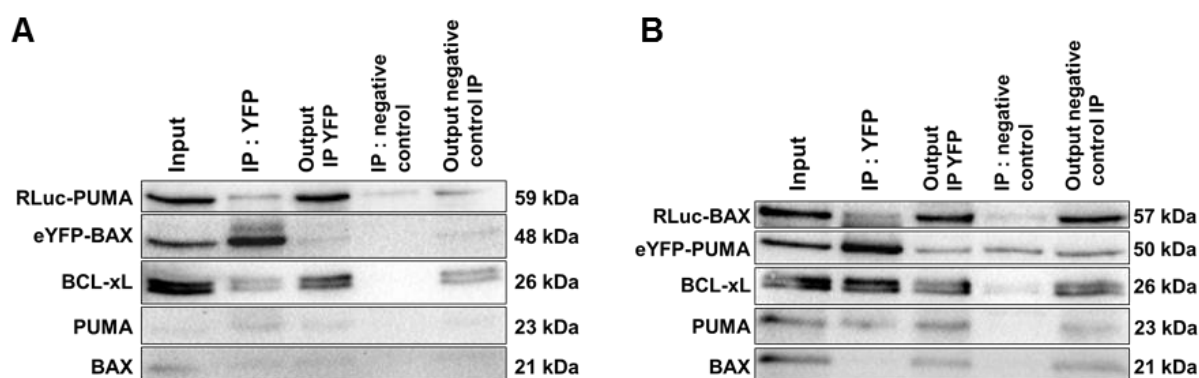
(A, B) Les lignées HCTp21<sup>-/-</sup> et HCTp21<sup>-/-</sup>PUMA<sup>-/-</sup> sont transfectées par 150 ng de plasmide codant RLuc-BAX et 3  $\mu\text{g}$  de plasmide codant eYFP-BCL-xL, puis traitées 16 h avec des concentrations croissantes de BH3-mimétiques avant mesure du BRET. Les EC<sub>50</sub> obtenus sous traitement ABT-737 (A) et WEHI-539 (B) sont présentés sous forme de la moyenne de cinq expériences indépendantes.

#### D. Etude de l'interaction BAX / PUMA

En accord avec de précédents travaux (Gallenne et al., 2009), nous avons montré que PUMA interagit avec BAX. En vue de poursuivre l'étude de cette interaction dans un contexte de cellule entière vivante, nous avons procédé à des expériences de validation des couples BRET RLuc-PUMA/eYFP-BAX et RLuc-BAX/eYFP-PUMA par co-immuno-précipitation. La **figure 27** montre les résultats obtenus suite à des immuno-précipitations réalisées sur des lysats de HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX transfectées avec des vecteurs d'expression codant pour les couples BRET RLuc-PUMA/eYFP-BAX et RLuc-BAX/eYFP-PUMA. L'expression exogène des protéines a été réalisée en présence d'un inhibiteur de CASPASES, le Q-VD-OPh, afin de limiter l'induction de la mort cellulaire due à une accumulation de protéines pro-apoptotiques dans les cellules transfectées. La fluorescence associée à l'eYFP exprimée dans les cellules est observée au microscope à fluorescence et permet d'estimer l'efficacité de nos transfections par eYFP-BAX ou eYFP-PUMA aux alentours de 80 %. L'efficacité de la transfection par les vecteurs RLuc-BAX et RLuc-



PUMA ne peut quant à elle pas être vérifiée, mais l'obtention d'un pourcentage de transfection par l'eYFP élevé suggère que la plupart des cellules transfectées par la luciférase auront également été transfectées par l'eYFP. Les western blot réalisés avec les extraits protéiques totaux ont permis de confirmer l'expression des protéines endogènes PUMA et BAX ainsi que celle des protéines exogènes RLuc-PUMA et eYFP-BAX (**figure 27-A**), RLuc-BAX et eYFP-PUMA (**figure 27-B**), dans les cellules transfectées. Des immuno-précipitations avec un anticorps anti-eYFP indiquent une interaction entre les protéines de fusion pour les deux couples transfectés. On observe également un signal associé à PUMA endogène dans l'immunoprécipitation d'eYFP-BAX. Ce signal est plus faible que celui détecté pour la protéine exogène co-immuno-précipitée. Ceci peut s'expliquer par le fait que les protéines de fusion sont surexprimées dans les cellules comparativement aux protéines endogènes.



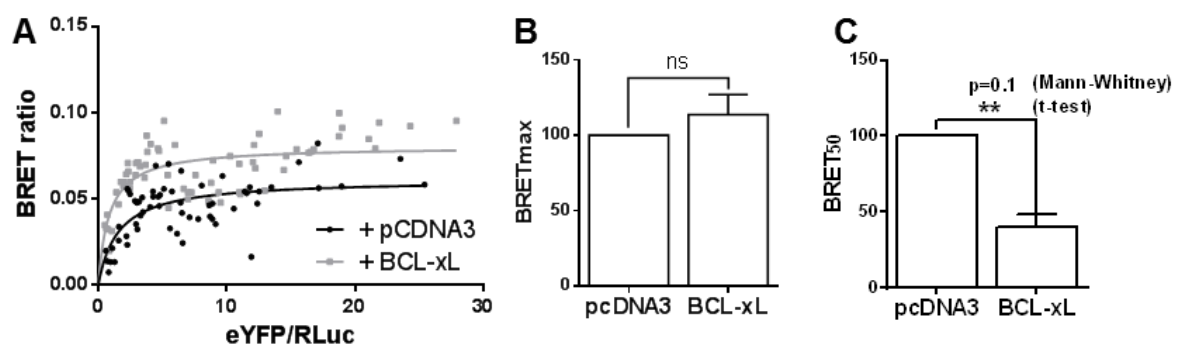
**Figure 27 : Les interactions RLuc-PUMA / eYFP-BAX et RLuc-BAX / eYFP-PUMA sont détectables par co-immunoprécipitation**

La lignée HCT116 p21<sup>-/-</sup>-pLVX est transfectée par deux plasmides codant pour RLuc-PUMA et eYFP-BAX (**A**) ou deux plasmides codant pour RLuc-BAX et eYFP-PUMA (**B**), en présence de Q-VD-OPh 5  $\mu$ M, avant analyse de son lysat protéique par immunoprécipitation avec un anticorps anti-YFP et western blot. Les western blot présentés sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

La seule détection de co-immuno-précipitations est insuffisante pour conclure à une spécificité de l'interaction étudiée. Il a été indispensable de la valider en cellule entière par BRET. Afin de visualiser les interactions entre BAX et PUMA en BRET et d'évaluer le rôle de BCL-xL dans ces interactions, nous avons effectué des expériences de saturation avec le couple RLuc-PUMA/eYFP-BAX, en absence ou en présence de Q-VD-OPh, dans les lignées HCT p21<sup>-/-</sup>-pLVX et pLVX(BCL-xL). Ces essais préliminaires ne nous ont pas permis d'obtenir des signaux BRET correspondant à des profils d'interactions saturables et spécifiques (données non

présentées). L'absence de signal BRET saturable ne permet pas de conclure directement à une absence d'interaction. En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse que nous n'observons pas de signal saturable du fait de l'incapacité des cellules à survivre à une co-expression RLuc-PUMA et eYFP-BAX, malgré l'utilisation d'un inhibiteur de CASPASES : en effet, nous n'observons pas de relation linéaire entre les quantités de plasmide codant eYFP-BAX transfectées et les intensités de fluorescence mesurées.

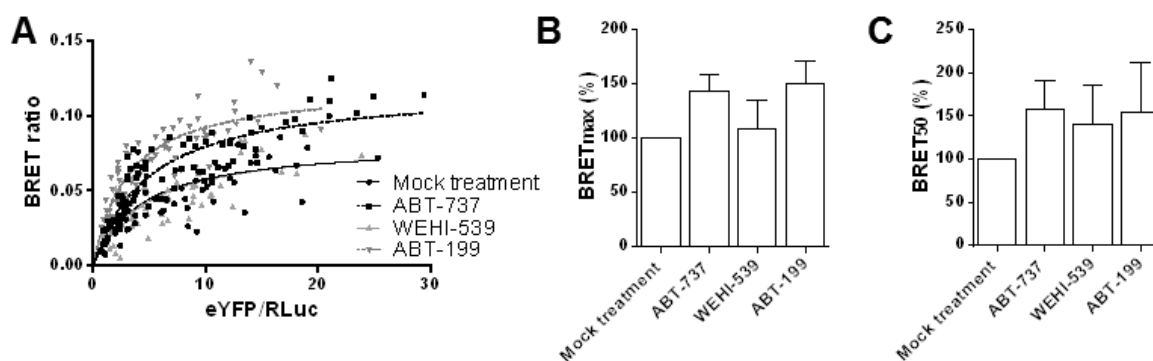
Nous avons par la suite utilisé un autre modèle cellulaire, la lignée de carcinome mammaire MCF-7, afin d'évaluer les interactions entre PUMA et BAX par BRET. La lignée MCF-7 est déficiente pour l'expression de la CASPASE 3, ce qui la rend moins sensible à l'apoptose. Des études de saturation menées sur les couples RLuc-PUMA/eYFP-BAX (en co-transfectant ou non un troisième plasmide codant BCL-xL) présentées **figure 28** nous ont permis de valider les couples BRET, par l'obtention de profils saturables. De plus, BCL-xL semble influencer les interactions entre BAX et PUMA. Sa surexpression induit une augmentation du  $BRET_{max}$  (**figure 28-B**), pouvant être corrélée à une meilleure interaction entre le donneur et l'accepteur ainsi qu'une diminution du  $BRET_{50}$  (**figure 28-C**), reflet d'une augmentation de l'affinité relative de BAX pour PUMA. Ces résultats ont également été observés pour le couple BRET « inverse » RLuc-BAX/eYFP-PUMA (données non présentées). BCL-xL aurait alors un rôle de protéine chaperonne, stabilisant BAX et/ou PUMA qui pourraient alors mieux interagir, d'où un transfert d'énergie plus important mesuré.



**Figure 28 : BCL-xL module les interactions BRET entre PUMA et BAX**

(A) La lignée MCF-7 est transfectée par deux plasmides codant pour le couple BRET RLuc-PUMA / eYFP-BAX et un plasmide vide contrôle (pcDNA3) ou un plasmide codant BCL-xL, avant lecture BRET et détermination des paramètres  $BRET_{max}$  (B) et  $BRET_{50}$  (C). Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

La réponse du couple BAX/PUMA aux BH3-mimétiques a été évaluée dans le modèle MCF-7 exprimant le couple BRET RLuc-BAX/eYFP-PUMA. Nous n'observons pas de variation du BRET significative sous traitement BH3-mimétiques (**figure 29**). Mais les résultats tendent en faveur d'une augmentation du BRET<sub>max</sub> (**figure 29-B**) et du BRET<sub>50</sub> (**figure 29-C**) sous traitement, ce qui peut être corrélé à une diminution de l'affinité relative des interactions. Cet effet n'est pas uniquement dépendant de BCL-xL puisque nous l'observons sous traitement à l'ABT-737 (ciblant BCL-xL, BCL-2 et BCL-w) et à l'ABT-199 (ciblant spécifiquement BCL-2). Une dissociation des interactions entre les anti-apoptotiques et BAX apporterait donc davantage de BAX déjà activé, prêt à s'insérer dans la membrane mitochondriale, n'interagissant alors pas avec PUMA, d'où une moins bonne affinité des interactions BAX / PUMA sous traitement BH3-mimétiques.



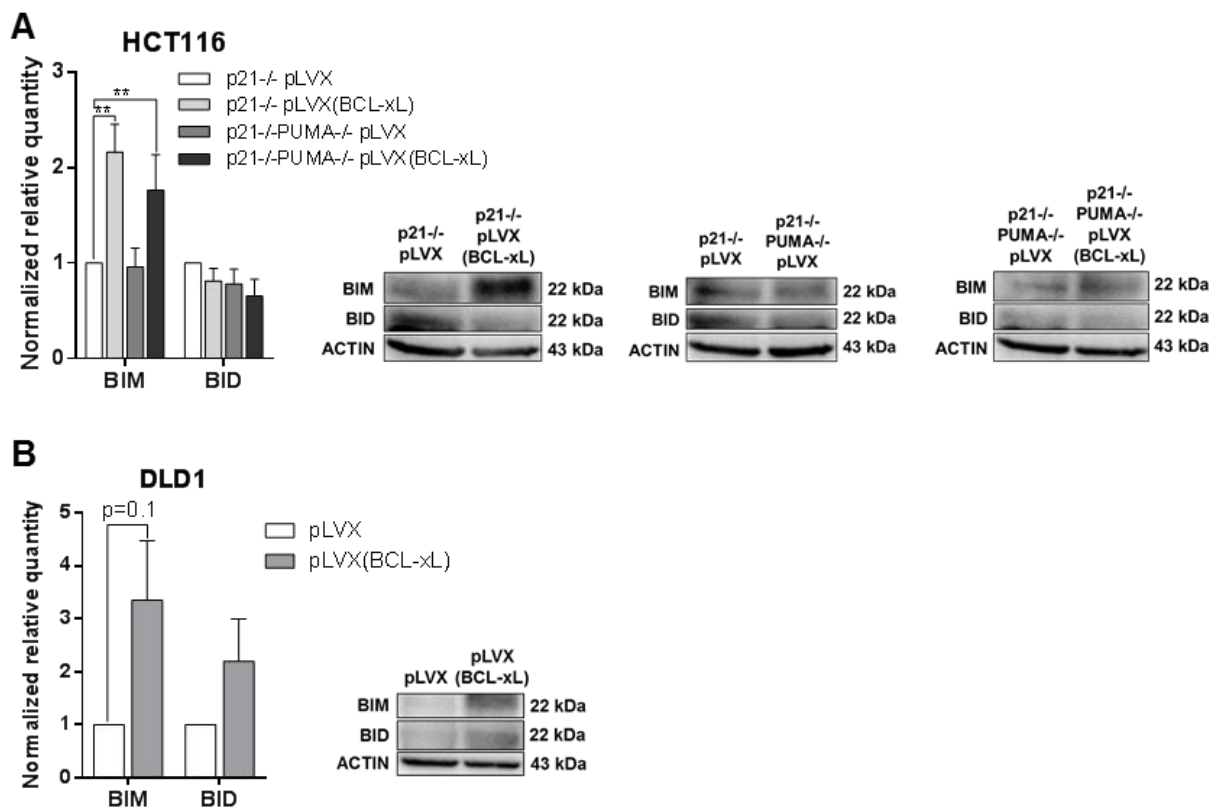
**Figure 29 : L'interaction PUMA / BAX détectée par BRET est sensible aux BH3-mimétiques**

(A) La lignée MCF-7 est transfectée par deux plasmides codant pour le couple BRET RLuc-BAX / eYFP-PUMA. La réponse des complexes aux BH3-mimétiques est évaluée par mesure du BRET après un traitement 1  $\mu$ M, 16h. Les BRET<sub>max</sub> (B) et BRET<sub>50</sub> (C) présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

### E. Comment prédire la réponse des cellules aux BH3-mimétiques ?

Les premiers résultats de la construction d'un modèle mathématique ont montré que nos données obtenues en cellule entière vivante corrélaient avec un modèle de réseau d'interactions acellulaires dans lequel l'affinité de BCL-xL pour BAX est inférieure à celle de BCL-xL pour PUMA, et dans lequel BAX est activé par PUMA. Ce modèle, dont la construction est en cours en collaboration avec le Dr. Gordon Tucker (Servier, Paris), est basé sur une approche de biologie des systèmes

(inspiré du travail d'Albeck et al., 2008). L'enrichissement de ce modèle mathématique par des quantifications de l'expression de l'ensemble des protéines de la famille de BCL-2 et par l'étude complète du réseau d'interactions impliquant les protéines de la famille de BCL-2 pourrait permettre à terme une prédiction de l'efficacité des BH3-mimétiques dans chaque contexte cellulaire. Ainsi, une étude des profils d'expression de protéines de la famille de BCL-2 dans des lignées surexprimant ou non BCL-xL nous a d'ores et déjà permis de mettre en évidence un rôle de cette protéine dans l'expression des protéines à BH3-seul. Les résultats de western blot exposés **figure 30** montrent une augmentation de l'expression de PUMA et BIM dans les lignées HCT116 p21<sup>-/-</sup>, p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup> (**figure 30-A**) et DLD1 (**figure 30-B**) surexprimant BCL-xL.

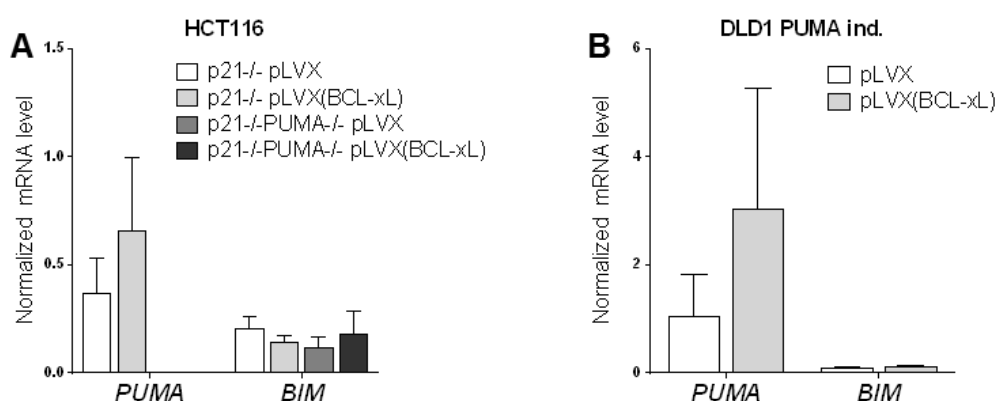


**Figure 30 : Une surexpression de BCL-xL augmente l'expression de BIM**

Les lysats protéiques de lignées HCT116 (**A**) et DLD1 inductibles pour PUMA (**B**) ont été analysés par western blot. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

Afin de déterminer la cause de cette augmentation, nous avons procédé à des expériences de qPCR dans les lignées HCT et DLD1, illustrées **figure 31**. Ces résultats montrent une absence de variation des niveaux d'ARNm codant PUMA et BIM dans les lignées surexprimant BCL-xL par rapport aux lignées contrôles pLVX.

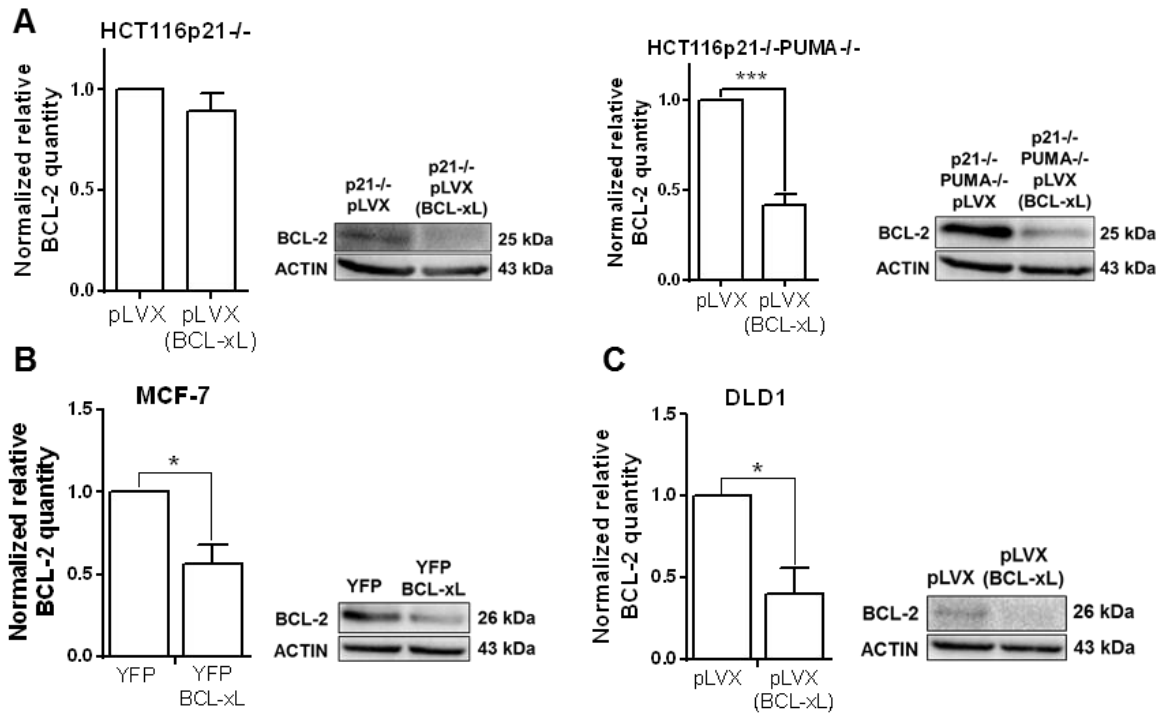
L'augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques à BH3-seul dans les cellules surexprimant BCL-xL pourrait donc être due à une stabilisation de ces protéines par BCL-xL qui jouerait alors un rôle de chaperonne, prévenant la dégradation de BIM et de PUMA. Les protéines à BH3-seul activatrices sont normalement induites uniquement sous un stress et contribuent au déclenchement de l'apoptose. L'augmentation de BCL-xL permettrait alors de maintenir ces protéines à de forts niveaux dans les cellules tout en prévenant l'activation de BAX aboutissant à la mort.



**Figure 31 : BCL-xL n'influence pas l'expression de BIM et de PUMA**

Les ARN messagers des lignées HCT116 (A) et DLD1 (B) ont été extraits et analysés par PCR quantitative pour l'expression des ARNm de BIM et PUMA. Les graphiques présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes réalisées par Céline Vuillier (doctorante).

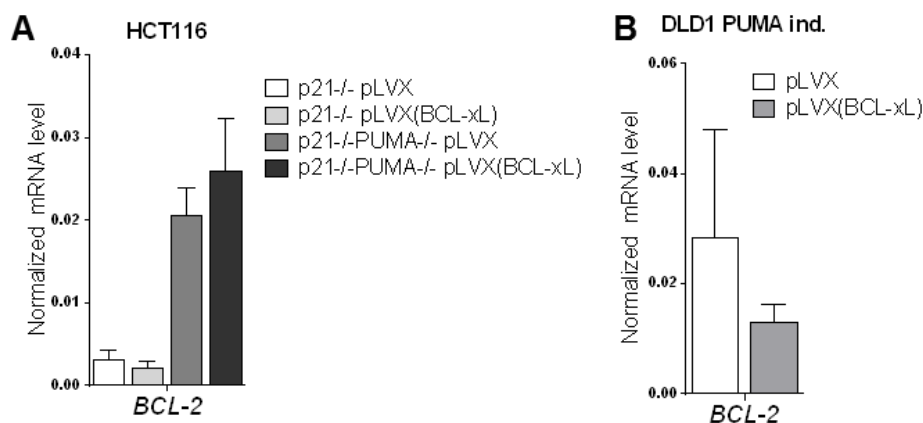
Nous avons également étudié le profil d'expression de BCL-2 dans les cellules surexprimant BCL-xL et mis en évidence qu'une surexpression de BCL-xL entraîne une diminution d'expression de BCL-2 (figure 32).



**Figure 32 : Les cellules surexprimant BCL-xL expriment moins de BCL-2**

Les lysats protéiques de lignées HCT116 (A), MCF-7 (B) et DLD1 inducibles pour PUMA (C) ont été analysés par western blot. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

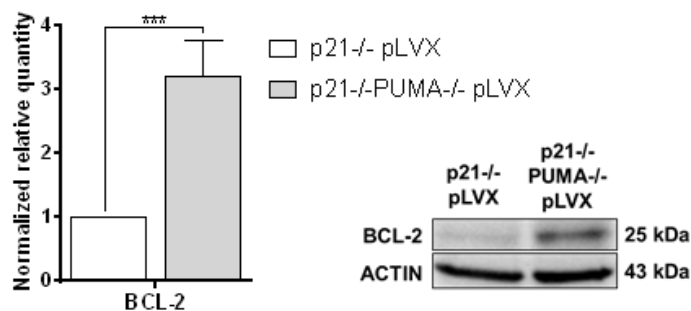
Des analyses complémentaires de qPCR (figure 33) ont permis de montrer que cet effet ne passe pas par une diminution de l'expression des ARNm codant BCL-2 dans les cellules surexprimant BCL-xL. Une explication possible à ce phénomène serait que la protéine BCL-xL surexprimée entrerait en compétition avec les anti-apoptotiques (et notamment BCL-2) pour la liaison aux protéines pro-apoptotiques. BCL-xL tamponnerait alors les pro-apoptotiques, laissant BCL-2 sous une forme libre moins stable. BCL-2 pourrait dans ce cas être adressé au protéasome pour sa dégradation. Le fait que BCL-xL entraîne une diminution d'expression de BCL-2 souligne une éventuelle redondance dans les fonctions des protéines anti-apoptotiques (Eichhorn et al., 2014). Ainsi, ces protéines seraient capables de réguler mutuellement leur expression via des mécanismes inconnus.



**Figure 33 : BCL-xL et PUMA régulent l'expression du gène BCL-2**

Les ARN messagers des lignées HCT116 (A) et DLD1 (B) ont été extraits et analysés par PCR quantitative pour l'expression du gène BCL-2. Les graphiques présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes réalisées par Céline Vuillier (doctorante).

Une étude des profils d'expression de BCL-2, dans des lignées exprimant ou non PUMA nous a permis de mettre en évidence un rôle de cette protéine dans l'expression de BCL-2. Le western blot **figure 34** montre une augmentation d'expression de BCL-2 dans la lignée HCT116 p21<sup>-/-</sup>PUMA<sup>-/-</sup> pLVX (versus la lignée p21<sup>-/-</sup> pLVX), alors que ceci n'est pas le cas pour BCL-xL (figure S1 de l'article). De plus, des essais de PCR quantitative ont mis en évidence des différences de niveaux d'ARNm de BCL-2 entre les deux lignées étudiées (**figure 33-A**). L'effet observé n'est donc pas dépendant d'une régulation de la stabilité de la protéine BCL-2 mais serait dû à des différences d'activités transcriptionnelles et/ou à des différences de stabilité des ARNm de BCL-2, dépendantes de PUMA. Ainsi, le gène codant BCL-2 serait moins transcrit en présence de la protéine PUMA. La transcription de PUMA étant dépendante de p53, on peut supposer l'implication de ce facteur de transcription dans l'expression différentielle de BCL-2 en présence et en absence de PUMA (Budhram-Mahadeo et al., 1999).



**Figure 34 : PUMA régule l'expression de BCL-2**

Les lysats protéiques de lignées HCT116 ont été analysés par western blot. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

---

## ***Discussion***

### **A. PUMA module les interactions BAX / BCL-xL**

Afin de générer le moins de biais possibles liés à l'utilisation de protéines tronquées, nous avons eu recours à la technique de BRET qui nous permet d'étudier des interactions entre protéines entières dans des cellules vivantes aux compartiments intra-cellulaires intacts. L'approche par BRET que nous avons utilisée pour l'étude du réseau d'interactions PUMA / BAX / BCL-xL nous fournit des signaux au bruit de fond réduit (comparée aux essais utilisant un transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes) puisque le transfert d'énergie est initié par l'ajout d'un substrat plutôt que par une source lumineuse. De plus, le BRET permet une quantification relative des interactions et les signaux sont réversibles, ce qui est particulièrement adapté à la mesure des effets d'ajout d'inhibiteurs dans le milieu de culture de cellules exprimant les protéines de fusion d'intérêt. Par cette approche, nous avons montré à l'aide des lignées isogéniques HCT116 p21<sup>-/-</sup> et HCT116 p21<sup>-/-</sup> PUMA<sup>-/-</sup> que PUMA endogène favorise les interactions entre BAX et BCL-xL (en absence de stress génotoxique) dans la lignée HCT116 p21<sup>-/-</sup>. L'utilisation d'étoposide, agent de chimiothérapie induisant PUMA, n'exclue cependant pas l'intervention d'autres protéines (telles que BIM) dans ce mécanisme du fait des multiples gènes cibles de ce composé. Le développement d'essais BRET BAX/BCL-xL dans des cellules inductibles pour PUMA permettrait d'éclaircir ce point. En accord avec Gallenne et al., 2009, nos résultats suggèrent que PUMA favorise les interactions entre BAX et BCL-xL via son rôle d'activateur de BAX. Suite à son activation par PUMA, le domaine BH3 de BAX est exposé et peut alors interagir avec la poche hydrophobe de BCL-xL, et la liaison d'un BAX inactif à BCL-xL promeut l'exposition de son domaine BH3, favorisant le maintien d'un BAX déplié (Gautier et al., 2011). Au-delà de la simple séquestration de BAX, BCL-xL favorise donc son maintien sous une conformation active. Un traitement par des BH3-mimétiques dans ces conditions favorise et amplifie la réponse au stress en libérant BAX de BCL-xL. BAX alors libre et activé (ou activable par PUMA) s'insère dans la membrane externe mitochondriale où il s'oligomérisse et déclenche la MOMP. Plusieurs études sont en accord avec le fait que l'activation de BAX par PUMA est requise pour le déclenchement de l'apoptose dépendante de BAX, mais aucune n'a à ce jour



identifié si cette activation a lieu en amont et/ou en aval de la liaison de BAX à BCL-xL (**figure 35-A**).

## **B. BCL-xL contrecarre les effets des BH3-mimétiques**

BCL-xL est fréquemment surexprimée dans les cellules cancéreuses et est impliquée dans des phénomènes de résistances aux chimiothérapies actuelles. Ceci est en grande partie dû à sa puissante activité anti-apoptotique reliée à son interaction avec le domaine BH3 d'un large panel de membres pro-apoptotiques de la famille de BCL-2 et souligne l'importance du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques capables d'outrepasser ses effets anti-apoptotiques. Des molécules BH3-mimétiques, capables de s'insérer dans la poche hydrophobe de BCL-xL, constituent des outils permettant d'inhiber les fonctions de chimiorésistance exercées par cette protéine. Leur utilisation est limitée en clinique compte tenu de leurs effets de toxicité plaquettaire (Schoenwaelder et al., 2011). Outre cette limite inhérente à leur toxicité, BCL-xL n'est pas inhibée de façon efficace par ces composés dans les cancers. Il a été montré que de forts niveaux d'expression de BCL-xL confèrent une résistance des cellules à l'ABT-737 ou à l'ABT-263 (analogue de l'ABT-737 administrable par voie orale) combinés à des chimiothérapies. Cette résistance a été mise en évidence dans des modèles de fibroblastes embryonnaires murins (van Delft et al., 2006), dans des lignées de leucémies (Vogler et al., 2009, Tahir et al., 2010) et de lymphomes non-Hodgkiniens (Mérino et al., 2012). Au cours de ma thèse, nous avons montré que cette résistance existe également dans les lignées de cancers colorectaux HCT116 et DLD1 et dans la lignée de cancer mammaire MCF-7. De façon majeure, elle s'applique au WEHI-539, BH3-mimétique le plus puissant et sélectif de BCL-xL disponible actuellement.

## **C. La nature des interactions mises en jeu par BCL-xL détermine la sensibilité des cellules cancéreuses aux BH3-mimétiques**

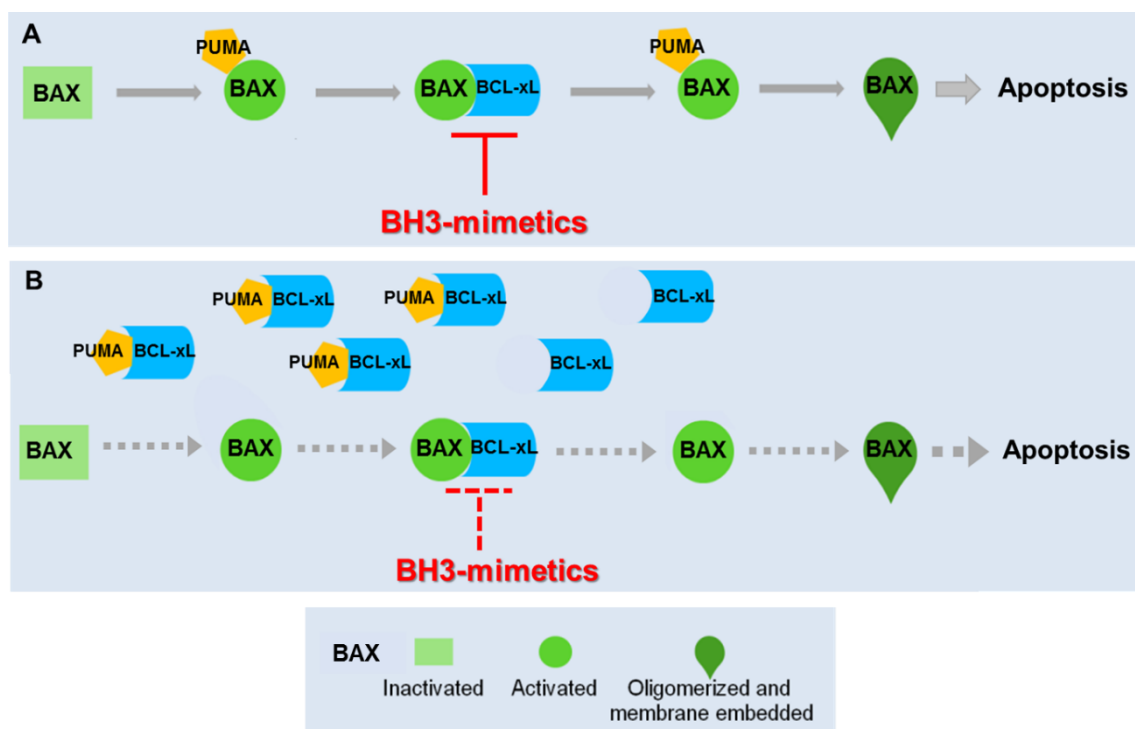
Augmenter l'expression de BCL-xL dans les cellules (la cible du WEHI-539) n'augmente pas la sensibilité aux BH3-mimétiques mais induit au contraire des phénomènes de résistance. Nos travaux fournissent une explication à ce paradoxe en montrant qu'il existe des différences qualitatives de complexes protéiques engagés par BCL-xL pour promouvoir la survie, en fonction de son profil

d'expression. Des travaux précédents ont mis en évidence un ciblage peu efficace de BCL-xL par l'ABT-263 en comparant la capacité de ce BH3-mimétique à inhiber BCL-xL, BCL-2 et BCL-w (Mérino et al., 2012, Rooswinkel et al., 2012). De plus, une étude a montré qu'au-delà de différences d'affinités, des différences de stabilité des protéines anti-apoptotiques dans les cellules affectent leur efficacité à protéger de la mort (Rooswinkel et al., 2014). Notre approche se distingue de ces études par le fait que nous pensons que ce sont les profils d'interactions moléculaires qui déterminent si l'activité anti-apoptotique de BCL-xL pourra être contrecarrée par des BH3-mimétiques. Nous avons donc comparé les interactions entre BCL-xL et des protéines pro-apoptotiques aux fonctions distinctes, BAX et PUMA par une approche utilisant le BRET. Ainsi, nous avons fourni des évidences montrant des différences de sensibilité entre différents complexes impliquant BCL-xL, mettant en avant l'existence d'une balance entre des complexes « BCL-xL/BAX » sensibles aux BH3-mimétiques et des complexes « BCL-xL/PUMA » résistants. Les BH3-mimétiques sont donc efficaces lorsque cette balance favorise la formation de couples sensibles, mais pas lorsque la balance penche en faveur des couples résistants. Ces différences sont en accord avec de précédentes études montrant que des inhibiteurs peptido-mimétiques de faible affinité pour BCL-xL empêchent les interactions BAX/BCL-xL mais pas les interactions PUMA/BCL-xL (Gautier et al., 2011).

#### **D. BCL-xL contrecarre la mort cellulaire induite par PUMA**

Nous avons mis en évidence qu'un traitement au WEHI-539 ne bloque pas la capacité d'une surexpression de BCL-xL à protéger les cellules d'une mort induite par PUMA. Un point majeur de ce travail est la mise en avant que les interactions PUMA/BCL-xL comme résistantes aux BH3-mimétiques, ce qui empêche PUMA d'activer BAX (**figure 35-B**). Au vu de l'importance de PUMA dans la réponse aux traitements chimiothérapeutiques (Middelburg et al., 2005), cette étude est particulièrement importante dans la compréhension de mécanismes conférant une résistance des cellules cancéreuses en présence de dommages causés par des agents génotoxiques. Nous avons en effet montré que PUMA (lorsqu'il est libre d'une protéine anti-apoptotique) peut activer directement BAX (Cartron et al., 2004). Cette découverte a ensuite été affinée par d'autres groupes d'un point de vue structurel (Edwards et al., 2013) et fonctionnel (Du et al., 2011, Hockings et al., 2015) et est en

autre étayée par nos travaux indiquant que PUMA favorise les changements conformationnels ainsi que l'oligomérisation de BAX en cellule entière. Ces résultats impliquent que l'activation de BAX induite par sa liaison à PUMA constitue un signal de mort que BCL-xL doit contrecarrer pour maintenir la survie (Gallenne et al., 2009). Les essais de profilage-BH3 utilisant des peptides recouvrant le domaine BH3 de certaines protéines à BH3-seul ont montré des effets additifs de la surexpression de BCL-xL et de l'absence d'expression de PUMA. Ceci n'est pas en accord avec un modèle selon lequel PUMA agit uniquement comme un inhibiteur de BCL-xL. Cela confirme davantage le fait que BCL-xL contrecarre l'activité de PUMA pour maintenir la survie cellulaire et que cette activité s'exerce au moyen de la liaison du domaine BH3 de PUMA à sa poche hydrophobe.



**Figure 35 : Les interactions PUMA / BCL-xL diminuent l'efficacité des BH3-mimétiques**

**(A)** Dans des conditions où BCL-xL n'est pas surexprimé. La liaison de PUMA libre à BAX inactivé provoque l'activation de ce dernier. Ceci passe par l'exposition de son domaine BH3, qui vient s'enchaîner dans le sillon hydrophobe de BCL-xL. Les couples BAX/BCL-xL ainsi formés sont sensibles aux BH3-mimétiques. Leur dissociation sous traitement par ces composés libère BAX de BCL-xL qui est alors capable de s'oligomériser et de s'ancrer aux membranes externes mitochondriales afin d'engager la MOMP et l'apoptose qui s'en suit.

**(B)** Dans des conditions de surexpression de BCL-xL, les molécules de PUMA libres sont séquestrées par BCL-xL. Il n'y a alors pas de PUMA disponible pour procéder à l'activation de BAX. Les couples PUMA/BCL-xL ainsi formés sont résistants aux BH3-mimétiques et la dissociation des interactions BAX/BCL-xL formés ne suffit dans ce cas pas à déclencher une MOMP efficace.

## **E. Les interactions BAX / BCL-xL et PUMA / BCL-xL ne sont pas ciblées avec la même efficacité par les BH3-mimétiques.**

Nos données corrèlent en partie avec un modèle de double engagement de BCL-xL, proposé par Llambi et al., présenté dans la **figure 18** de l'introduction (Llambi et al., 2011), dans lequel les protéines anti-apoptotiques interagissent avec un effecteur pro-apoptotique à multidomains BH (BAX ou BAK) ou avec un BH3-seul activateur (PUMA, BIM, BID), par deux modes différant dans leur efficacité et leur sensibilité à être déréprimés par des BH3-mimétiques. Nous avons adapté ce modèle dans le but de comprendre les mécanismes de résistance à la mort cellulaire médiés par BCL-xL. Sous ces conditions, BCL-xL est capable d'engager de façon critique une liaison avec PUMA (bloquant ainsi un signal fort de mort : interaction nommée « mode 1 » par Llambi), ou avec BAX (bloquant ainsi la réponse des effecteurs à un stress cellulaire : interaction « mode 2 »). Les interactions sont décrites comme mutuellement exclusives puisqu'elles nécessitent l'engagement du sillon hydrophobe de BCL-xL et des domaines BH3 des pro-apoptotiques. Elles ne sont d'ailleurs pas détectables avec un BCL-xL muté au niveau de sa poche hydrophobe et possèdent des affinités différentes notamment du fait de la présence de différences de séquences des domaines BH3 impliqués. Ceci est en accord avec la notion que PUMA est plus affin pour BCL-xL que BAX. Dans ce sens, nous avons observé dans des expériences de co-immuno-précipitation de RLuc-BAX ou RLuc-PUMA avec eYFP-BCL-xL, que RLuc-PUMA inhibe mieux les interactions entre eYFP-BCL-xL et BAX endogène que RLuc-BAX (données non présentées). PUMA favorise l'oligomérisation de BAX mais ceci est contrecarré par une surexpression de BCL-xL : en se liant à PUMA malgré la présence de molécules BH3-mimétiques, BCL-xL empêche ces composés de participer à une pleine activation de BAX. Les résultats de notre étude sont en contradiction avec ceux obtenus par Llambi car les interactions « mode 1 » (du type BCL-xL/PUMA) sont décrites comme étant plus facilement dissociables que les interactions « mode 2 » (du type BCL-xL/BAX) selon cet article. Il doit cependant être noté que le travail de Llambi est essentiellement basé sur des investigations fonctionnelles utilisant des protéines chimériques et qui quantifient les effets des BH3-mimétiques en ne tenant pas compte du contexte cellulaire (notamment membranaire) dans lequel se produisent ces interactions. De

plus, ces auteurs ont utilisé une forme de BID tronquée comme protéine activatrice à BH3-seul.

Dans des essais en cellules entières vivantes basés sur l'utilisation de techniques de transfert d'énergie par résonance similaires à notre approche, l'interaction de BCL-xL avec BID a été décrite comme sensible aux BH3-mimétiques (Aranovich et al., 2012). Mode 1 peut être plus ou moins sensible aux BH3-mimétiques, en comparaison avec mode 2 : ceci dépend de la nature des protéines à BH3-seul engagées dans des interactions avec les anti-apoptotiques. BIM est une autre protéine à BH3-seul activatrice qui interagit avec BCL-xL : une résistance des interactions BIM/BCL-xL aux BH3-mimétiques a d'ailleurs été rapportée (Aranovich et al., 2012, Mérimo et al., 2012), en corrélation avec la résistance des interactions PUMA/BCL-xL identifiée dans nos travaux. Dans le cas de BIM, des interactions additionnelles n'impliquant pas le domaine BH3 de BIM ont été proposées comme impliquées dans cette résistance. Bien que cet aspect ne puisse pas être écarté dans le cas de PUMA, nous avons montré que l'interaction entre le domaine BH3 de PUMA isolé et BCL-xL est réfractaire aux BH3-mimétiques. La liaison du domaine BH3 de PUMA isolé avec BCL-xL en solution induit un dépliement partiel de BCL-xL (Follis et al., 2013). La mutation du tryptophane 71 dans le BH3 de PUMA contribue à ce dépliement et est impliquée dans une interaction de type  $\pi$ -stacking avec l'histidine 113 de BCL-xL. La mutation du tryptophane 71 est cependant insuffisante pour sensibiliser l'interaction PUMA/BCL-xL aux BH3-mimétiques (données préliminaires non présentées). Ainsi, ce motif structurel ne semble pas impliqué en lui-même dans la force de l'interaction PUMA/BCL-xL. La résistance de cette interaction aux BH3-mimétiques pourrait être due à la forte affinité d'interaction entre d'autres résidus de PUMA et BCL-xL. La localisation mitochondriale des deux protéines contribue également à cette résistance : nos observations corrélient avec l'augmentation de sensibilité des complexes BCL-xL/PUMA cytosoliques comparés aux complexes membranaires. Ceci a précédemment été suggéré dans le travail d'Aranovich et al. 2012, pour le couple BCL-xL/BIM.

Outre les mécanismes de résistance discutés ci-dessus, les BH3-mimétiques peuvent néanmoins cibler l'interactome PUMA / BAX / BCL-xL afin de déclencher la mort cellulaire : l'interaction du domaine BH3 de BAX isolé ou de BAX entier avec

BCL-xL, ainsi que les effets d'une surexpression de BCL-xL sur l'oligomérisation de BAX sont sensibles aux BH3-mimétiques. Cette sensibilité implique que la résistance des interactions PUMA/BCL-xL et la résistance des cellules surexprimant BCL-xL à la mort induite par PUMA ne résulte pas simplement du fait que les cellules cancéreuses expriment des niveaux de BCL-xL allant au-delà de ceux atteints par les concentrations de BH3-mimétiques dans les cellules.

## **F. Rôle des membranes mitochondriales**

La liaison aux membranes de BCL-xL module ses fonctions en modifiant sa capacité à interagir avec les pro-apoptotiques et avec PUMA en particulier (Leber et al., 2007). La localisation membranaire peut en effet altérer les capacités d'association et de dissociation des complexes protéine/protéine, démasquant des domaines additionnels de BCL-xL contribuant à la liaison des domaines BH3 des pro-apoptotiques ou contribuant à la réalisation de modifications post-traductionnelles qui sont souvent négligées lors de l'emploi d'essais acellulaires et de protéines recombinantes.

Les résultats obtenus au cours de ce travail ne nous permettent pas de pouvoir écarter l'hypothèse d'une interaction tri-protéique entre PUMA, BAX et BCL-xL. En effet, l'utilisation en BRET de la protéine chimérique BAX possédant le domaine BH3 de PUMA nous a permis de mettre en évidence que le domaine BH3 des pro-apoptotiques n'est pas responsable à lui seul des interactions avec les anti-apoptotiques. Le contexte protéique dans lequel se trouve le BH3 des pro-apoptotiques détermine les propriétés de chaque interaction et rend donc envisageables des interactions engageant des régions de BCL-xL allant au-delà du sillon hydrophobe. L'hypothèse d'une interaction tri-protéique est renforcée par des travaux montrant l'existence de deux sites d'interaction des protéines à BH3-seul sur BAX (Gavathiotis et al., 2008), ainsi que par une étude portant sur le domaine BH4 de BCL-2, décrit comme étant capable d'interagir avec BAX et d'inhiber son activation (Barclay et al., 2015). De plus, la proximité de localisation de BCL-xL et de PUMA à la membrane externe mitochondriale donne la possibilité de la formation d'un complexe tri-protéique à ce niveau. BAX pouvant être activé par PUMA puis se lier à BCL-xL tout en conservant son interaction avec PUMA. Ceci serait en accord avec nos observations faites pour le couple BRET PUMA/BAX qui interagit avec une

meilleure affinité en présence de BCL-xL. Ce phénomène pourrait passer par une stabilisation de PUMA par BCL-xL, PUMA étant alors davantage disponible pour interagir avec BAX.

Par des interactions physiques avec BAX, BCL-xL régule sa localisation subcellulaire. En l'absence d'une activation, BAX est à l'équilibre entre le cytosol et les membranes mitochondriales, transporté à l'image d'une navette entre ces deux compartiments cellulaires. BCL-xL favorise la localisation cytosolique de BAX par un phénomène de rétro-translocation de la membrane mitochondriale vers le cytosol (Edlich et al., 2011). La fusion de l'eYFP, dont la taille est comparable à celle de la RLuc, à l'extrémité N-terminale de BAX génère une protéine qui, lorsqu'elle est exprimée en cellule entière vivante, est présente au cytosol et aux mitochondries (données non présentées). Ceci suggère que RLuc-BAX utilisé dans les expériences de BRET est localisé de façon semblable (et est donc capable de rétro-translocation) et implique, en accord avec de précédents travaux, que les BH3-mimétiques sont capables d'interférer avec la liaison de BCL-xL à ces deux formes de BAX. De plus, BCL-xL empêche l'oligomérisation de BAX activé, intégré aux membranes. Nous avons étudié ce point en évaluant l'effet de BCL-xL sur l'oligomérisation de BAX dans une configuration de cellule entière par BRET. La forte intensité du BRET mesurée pour le couple RLuc-BAX et eYFP-BAX peut être attribuée à la nature auto-amplificatrice de l'oligomérisation de BAX (Czabotar et al., 2013). Même si ce phénomène peut être amplifié par des activateurs comme PUMA, BCL-xL empêche ce phénomène d'oligomérisation et les BH3-mimétiques dérèglent cette action de BCL-xL.

Les comparaisons quantitatives d'interactions entre les couples BAX/BCL-xL et BAX/BAX étudiés en BRET sont difficilement réalisables puisque BCL-xL est exprimé à de plus faibles niveaux dans les expériences d'oligomérisation que dans les expériences d'interactions BAX/BCL-xL. Nous pensons cependant que les effets de BCL-xL sur la formation d'oligomères de BAX sont moins facilement dérégulés par les BH3-mimétiques que les interactions directes entre BAX (cytosolique ou mitochondrial) et BCL-xL. Les membranes en elles-mêmes contribuent au renforcement des effets de BCL-xL sur l'oligomérisation de BAX (Ding et al., 2014), tout comme elles le font pour les interactions PUMA/BCL-xL. Dans tous les cas, ces

données suggèrent que les BH3-mimétiques sont capables d'inhiber directement les effets de BCL-xL sur BAX activé alors que ce n'est pas le cas sur PUMA.

### **G. Comment prédire la sensibilité des cellules aux BH3-mimétiques ?**

Puisque BCL-xL séquestre PUMA d'une manière résistante aux BH3-mimétiques, et BAX d'une manière sensible, PUMA peut contribuer à l'induction de la mort cellulaire BAX-dépendante uniquement lorsqu'il est exprimé en excès. Ceci a lieu quand la balance dynamique d'expression et d'interactions de PUMA, BAX et BCL-xL favorise l'activation de molécules de BAX par un processus nourrit par le relargage de molécules de BAX de BCL-xL par les BH3-mimétiques. Ce processus étant bloqué par une augmentation de l'expression de BCL-xL.

Quels sont les paramètres en accord avec cet état de déclenchement de la mort par PUMA, dépendant de BCL-xL ? Afin d'étudier cela, nous avons établi une collaboration avec le Dr. Tucker (Servier, Paris) dans le but de construire un modèle mathématique étudiant la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) sous contrôle du réseau d'interactions PUMA / BAX / BCL-xL. Ce modèle est adapté de Albeck et al., 2008, et alimenté par nos estimations de concentrations protéiques exprimées dans les cellules ainsi que par nos mesures d'interactions par BRET. Nous avons l'intention d'utiliser ce modèle afin de réévaluer les affinités relatives entre PUMA, BAX et BCL-xL et de déterminer quels paramètres affectent la sensibilité des cellules aux BH3-mimétiques. Cette réflexion complète nos observations selon lesquelles des variations d'expression de BCL-xL entre les cellules d'une même population déterminent la sensibilité aux BH3-mimétiques. L'état de sensibilité aux BH3-mimétiques d'une population cellulaire est instable dans le sens où un tel traitement contribue au fil du temps à la sélection positive des cellules exprimant fortement BCL-xL. Ceci souligne l'importance de l'étude du caractère soutenu ou non de la résistance des cellules qui ont survécu à un traitement aux BH3-mimétiques et de la compréhension des mécanismes mis en jeu. Ce point est relevant dans le sens où des études ont montré par ailleurs que des traitements sub-létaux par ces composés aboutissent à une instabilité génomique (Ichim et al., 2015).



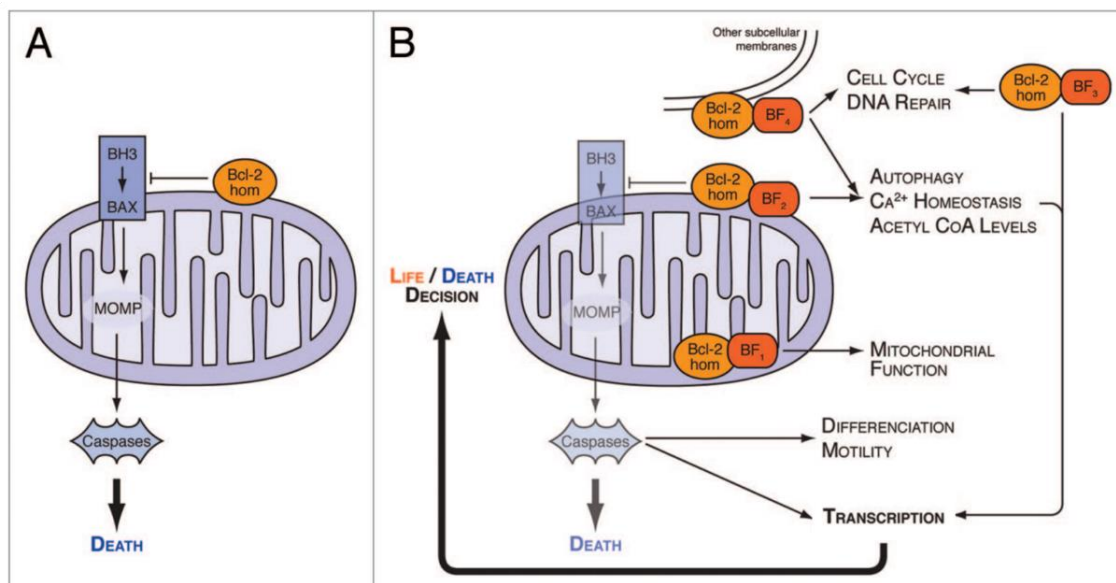
Outre la liaison à ses partenaires pro-apoptotiques, la liaison de BCL-xL aux membranes mitochondriales peut également provoquer des changements conformationnels et fonctionnels, influençant sa capacité d'inhibition par les BH3-mimétiques. Afin de comprendre comment le réseau impliquant les protéines de la famille de BCL-2 répond aux BH3-mimétiques, des systèmes expérimentaux prenant en compte la contribution des membranes en cellule entière sont requis. Ainsi, l'approche utilisant le BRET développée dans ce travail devra être complétée à terme par l'étude globale du réseau d'interactions mis en jeu par l'ensemble des protéines de la famille de BCL-2 afin de définir un modèle représentant les différences d'affinités des interactions en fonction de la réponse cellulaire observée aux BH3-mimétiques. Ceci permettra une administration de BH3-mimétiques en clinique uniquement chez des patients ayant un cancer sensible à ses composés, la sensibilité pouvant être déterminée via l'analyse du profil d'expression protéique des cellules cancéreuses et/ou par BH3-profiling (Montero et al., 2015). De plus, ce modèle participera au développement de nouveaux composés capables d'inhiber les interactions PUMA/BCL-xL et permettra de mettre en place de nouvelles stratégies permettant de révéler une sensibilité aux BH3-mimétiques dans des cellules résistantes. La finalité étant d'outrepasser de façon efficace les phénomènes de chimiorésistance médiés par BCL-xL.

## Projet 2 : Effets oncogéniques non canoniques de l'interaction RAS / BCL-xL

### Introduction

#### A. Fonctions non canoniques des protéines de la famille de BCL-2

La vision selon laquelle les protéines de la famille de BCL-2 sont uniquement impliquées dans la régulation de l'apoptose mitochondriale est restrictive. Un nombre grandissant de travaux suggèrent en effet que les protéines de cette famille ne se localisent pas uniquement au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. De plus, elles sont capables de moduler des fonctions cellulaires qui vont au-delà de la régulation de l'apoptose, impliquant des interactions avec des protéines n'appartenant pas à la famille de BCL-2 (**figure 1**). Ainsi, plus de cinquante partenaires non canoniques des membres anti-apoptotiques de la famille de BCL-2 ont été décrits (Beverly, 2012).



**Figure 1 : Fonctions canoniques et non canoniques exercées par les protéines anti-apoptotiques de la famille de BCL-2**

(A) Les protéines anti-apoptotiques homologues de BCL-2 exercent leurs fonctions canoniques en interagissant avec les membres pro-apoptotiques de leur famille, empêchant ainsi le déclenchement de l'apoptose mitochondriale. (B) Outre leurs effets canoniques, les protéines anti-apoptotiques de la famille de BCL-2 sont capables d'interagir avec d'autres effecteurs (BF = Binding Factor) afin de réguler des processus cellulaires autres que l'apoptose, tels que le métabolisme mitochondrial, l'autophagie ou encore la transcription. Ceci renforce le contrôle exercé par ces protéines sur la destinée cellulaire (d'après Braun et al., 2013)

## I. Localisations subcellulaires des protéines de la famille de BCL-2

Les protéines anti-apoptotiques homologues de BCL-2 comportent une extrémité C-terminale hydrophobe qui, lorsqu'elle est dépliée, permet leur ancrage à la membrane externe de la mitochondrie, au Réticulum Endoplasmique (RE), aux MAM (Mitochondria-Associated Membranes) qui constituent des régions du RE au contact des mitochondries, mais également aux membranes péri-nucléaires (Krajewski et al., 1993). Ces différentes localisations suggèrent donc l'existence de différents partenaires pour ces protéines. Ainsi, il a été décrit que BCL-2 régule les activités de SERCA (Sarco/ER Ca<sup>2+</sup>-ATPase) (Dremina et al., 2004), de VDAC1 (Voltage Dependent Anion Channel 1), un canal protéique échangeant des métabolites et de l'ATP entre le cytosol et la mitochondrie et permettant l'entrée d'ions Ca<sup>2+</sup> du réticulum dans la mitochondrie (Shimizu et al., 1999) et des IP3Rs (Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptors) (Chen et al., 2004) présents au niveau de la membrane du réticulum. Il n'est pas à exclure que ces interactions aient lieu au niveau des MAM qui contiennent des complexes multi-protéiques impliquant notamment IP3R et VDAC. Par ailleurs, une localisation de BCL-xL et MCL-1 dans la matrice mitochondriale a été rapportée comme responsable de l'augmentation de l'activité de la F1/F0 ATP synthase située sur la membrane interne de la mitochondrie (Alavian et al., 2011). Ceci permet la stabilisation du potentiel de la membrane interne mitochondriale et de la production d'ATP. La localisation dans la matrice mitochondriale de MCL-1 a pu être reliée à l'existence d'une séquence d'adressage mitochondrial au niveau de son extrémité N-terminale (Perciavalle et al., 2012).

La translocation de BCL-2 et BCL-xL aux membranes est régie par l'activité de molécules chaperonnes telles que l'inhibiteur de calcineurine FKBP38, dont l'absence empêche la localisation des anti-apoptotiques à la mitochondrie, affectant la survie des cellules. De plus, il a été observé que BCL-2 libre de FKBP38 est redirigé vers la membrane nucléaire, bloquant le transport de facteurs de transcription dans le noyau (Shirane and Nakayama, 2003). Une accumulation d'anti-apoptotiques à la membrane nucléaire pourrait donc aboutir à une diminution globale de la transcription. La présence de protéines anti-apoptotiques de la famille de BCL-2 dans le noyau a également été observée et corrèle avec l'induction de l'apoptose

(Portier and Taglialatela, 2006) et une inhibition de la transcription induite par de nombreux facteurs de transcription (Massaad et al., 2004). Ce transport nucléaire ne se fait pas grâce à un signal d'adressage nucléaire, mais dépend de protéines chaperonnes qui, en se liant aux anti-apoptotiques, régulent leur adressage aux différents compartiments subcellulaires. C'est le cas de la protéine FKBP38 citée plus haut.

## II. Interactions non canoniques

Les différentes localisations subcellulaires des protéines anti-apoptotiques de la famille de BCL-2 corrént avec une grande diversité de partenaires non canoniques décrits, au-delà de l'interactome mettant en jeu les protéines de la famille de BCL-2. Une importante liste de protéines partenaires de BCL-2 et BCL-xL a été établie sur la base de l'observation d'effets modulateurs de localisation, de fonctions canoniques ou de structure 3D de BCL-2 et BCL-xL par des modifications post-traductionnelles (clivages par des protéases, phosphorylations ou ubiquitinations).

L'étude de la nature des interfaces de liaison entre les anti-apoptotiques homologues de BCL-2 et leurs partenaires non canoniques constitue un paramètre clé permettant de comprendre dans quelles mesures des partenaires non canoniques peuvent entrer en compétition avec des membres pro-apoptotiques de la famille de BCL-2 pour la liaison à la poche hydrophobe des anti-apoptotiques. Il en découle notamment la question de la possible modulation de ces nouvelles interactions par les BH3-mimétiques. Des études ont ainsi permis de montrer l'existence de domaines BH3 dans des partenaires non canoniques tels que BECLIN (Sinha and Levine, 2008). De plus, il existe d'autres interfaces de liaison à la surface des protéines de la famille de BCL-2. Ainsi, la partie flexible liant les deux premières hélices des anti-apoptotiques (contenant le domaine BH4) constitue une interface de liaison avec des protéases telles que les CASPASES (Cheng et al., 1997) et des kinases (Chang et al., 1997). Le domaine BH4 lui-même constitue également un domaine d'interaction, impliqué dans l'interaction entre BCL-2 et des protéines telles que l'IP3R (Rong et al., 2009) ou les VDAC (Shimizu et al., 2000). L'ensemble des données disponibles montre donc qu'il existe plusieurs interfaces de liaison engagées par les protéines homologues de BCL-2, leur permettant d'interagir avec de nombreux partenaires.

### **III. Implication des interactions dans des fonctions non-canoniques**

L'interaction des anti-apoptotiques avec leurs nombreux partenaires souligne leur implication dans la régulation de processus divers tels que l'apoptose, l'homéostasie calcique, le métabolisme cellulaire, la réparation de l'ADN, la mitose ou encore la réponse inflammatoire.

#### ***a. Modulation de la réponse inflammatoire***

L'inflammasome est un complexe contenant la CASPASE1 et des protéines telles que NALP1 ou NALP3, reconnaissant des motifs associés aux pathogènes. Sa formation implique l'activation de la CASPASE1 et aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1 $\beta$ . Il a été montré que BCL-2 et BCL-xL sont capables de se lier à NALP1 afin de bloquer la capacité de cette protéine à activer la CASPASE1, empêchant la production d'IL1 $\beta$  et le déclenchement d'une réponse inflammatoire efficace (Bruey et al., 2007). Cette interaction engage la boucle flexible de BCL-2, située entre les hélices 1 et 2 (Faustin et al., 2009).

#### ***b. Régulation de l'homéostasie calcique***

La régulation des échanges de calcium entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique est indispensable à la production d'ATP par phosphorylation oxydative. Les protéines de la famille de BCL-2 sont capables de réguler ces échanges et donc l'homéostasie calcique des cellules afin de moduler des processus divers tels que le développement embryonnaire, l'activation des lymphocytes ou la migration cellulaire. Ceci passe notamment par la liaison des anti-apoptotiques avec IP3R et VDAC. Il existe deux interfaces de liaison des anti-apoptotiques sur l'IP3R : une dans un domaine central de la protéine, l'autre en C-terminal. BCL-2 et BCL-xL se lient à ces deux interfaces de façon plus ou moins affine (Monaco et al., 2012), régulant différemment les flux calciques du réticulum vers le cytosol. Ainsi, en se liant à l'IP3R (au niveau d'un domaine central de la protéine) au moyen de son domaine BH4, BCL-2 empêche la libération de Ca<sup>2+</sup> du RE vers le cytosol (Rong et al., 2009). L'interaction de BCL-xL avec la partie C-terminale de l'IP3R sensibilise quant à elle l'ouverture du canal en présence de faibles concentrations d'IP3, ce qui tend à diminuer la concentration calcique du RE et à stimuler le métabolisme

mitochondrial (White et al., 2005). VDAC est un canal exprimé à la membrane externe de la mitochondrie, appartenant à une structure multiprotéique nommée PTPC (Permeability Transition Pore Complex) et participant au transport de métabolites et de  $\text{Ca}^{2+}$  entre la mitochondrie et le cytosol ou le RE. Des protéines de la famille de BCL-2 telles que BCL-xL, BCL-2, BAX, BAK et BIM ont été décrites comme capables de se lier à VDAC. Cependant, la fonction exacte de chacune de ces interactions demeure controversée (Bonneau et al., 2013).

### ***c. Régulation transcriptionnelles de voies oncogéniques***

Les homologues de BCL-2 modulent les activités transcriptionnelles des voies MYC (Jin et al., 2006), E2F1 (Youn et al., 2005) et NF $\kappa$ B (Ricca et al., 2000) : en empêchant la régulation CASPASE-dépendante de ces voies, en interagissant avec des kinases modulant ces facteurs de transcription, ou en interagissant directement avec ces facteurs de transcription. Ces interactions non canoniques permettent aux protéines de la famille de BCL-2 d'exercer un contrôle supplémentaire sur les voies de survie et de croissance cellulaire. En revanche, ce modèle ne semble pas valable pour tous les facteurs de transcription puisque les études menées jusqu'à présent avec p53 indiquent que ce facteur de transcription interagit avec BCL-2 à la membrane mitochondriale (Mihara et al., 2003) et que cette interaction influence la fonction de BCL-2 et l'amorçage mitochondrial. Inversement, BCL-2 influence les fonctions cytoplasmiques de p53 en séquestrant ce facteur de transcription. De même, p53 induit suite à un stress génotoxique est séquestré par BCL-xL à la membrane externe mitochondriale (Chipuk et al., 2005). En parallèle, p53 nucléaire induit l'expression de PUMA qui va ensuite entrer en compétition avec p53 pour la liaison à BCL-xL, entraînant le déclenchement de la MOMP. Cependant, aucun travail ne met en évidence une régulation des fonctions transcriptionnelles de p53 par la famille de BCL-2.

### ***d. Réparation de l'ADN***

Les homologues de BCL-2 inhibent les voies de réparation des cassures simple-brin et double-brin de l'ADN via différents mécanismes impliquant des interactions avec des protéines telles que APE1 (APurinic/APyrimidinic Endonuclease1), PARPs (PolyADP-Ribose Polymerases), Ku70 ou le suppresseur

de tumeur BRCA1 (BRCA1 Cancer susceptibility protein) (Laulier and Lopez, 2012). Ainsi, les protéines anti-apoptotiques ont par exemple été décrites comme capables de réguler l'activité enzymatique de protéines PARPs. Ces enzymes catalysent l'attachement covalent de polymères d'ADP-ribose sur des protéines cibles et sur elles-mêmes. Les PARPs peuvent être recrutées au niveau de cassures d'ADN simple brin et procéder à leur auto-Poly-ADP-ribosylation, fournissant un signal de recrutement pour des acteurs de la réparation de l'ADN. En revanche, une activation excessive des PARPs peut induire le déclenchement de l'apoptose mitochondriale. Il a été montré que BCL-2 inhibe les fonctions de PARP1 (Song et al., 2002) et MCL-1 inhibe l'activité de TNKS1 (Tankyrase 1) (Bae et al., 2003) par des interactions directes. L'inhibition de l'activité de PARP1 par BCL-2 nécessite la présence de la protéine S3a (protéine ribosomale). En effet, BCL-2 interagit avec PARP1 lié à S3a : S3a et BCL-2 contribuent alors ensemble à la diminution de l'activité de PARP1. De façon intéressante et réciproque, TNKS1 bloque les fonctions anti-apoptotiques de MCL-1. La diminution d'activité des PARPs liées à l'interaction avec des homologues de BCL-2 constituerait donc un mécanisme par lequel les anti-apoptotiques préviendraient la survenue du démantèlement cellulaire au cours de l'apoptose.

#### ***e. Rôle de protéine d'échafaudage***

L'existence de plusieurs interfaces de liaison décrites à la surface des protéines anti-apoptotiques amène à suggérer un rôle de « plate-forme » à ces protéines. Elles constitueraient une structure d'ancrage simultanée pour différentes protéines qui pourraient alors interagir entre elles. Une étude menée dans ce sens a montré que BCL-2, BCL-xL et BCL-w constituent des protéines d'ancrage à BAD et PP1 $\alpha$  (Protein Phosphatase 1 alpha) : les anti-apoptotiques favorisent l'activité phosphatase de PP1 $\alpha$  et l'interaction BAD/PP1 $\alpha$  (Ayllón et al., 2002).

## **B. L'oncogène RAS**

Des données suggèrent que les interactions entre les voies de signalisation induites par RAS et les protéines de la famille de BCL-2 sont nombreuses (Kang and Pervaiz, 2012). La superfamille RAS est constituée de petites protéines G monomériques à activité GTPase. Plus de cent protéines sont décrites à ce jour et sont classées en huit groupes sur la base de leurs séquences, leurs structures et

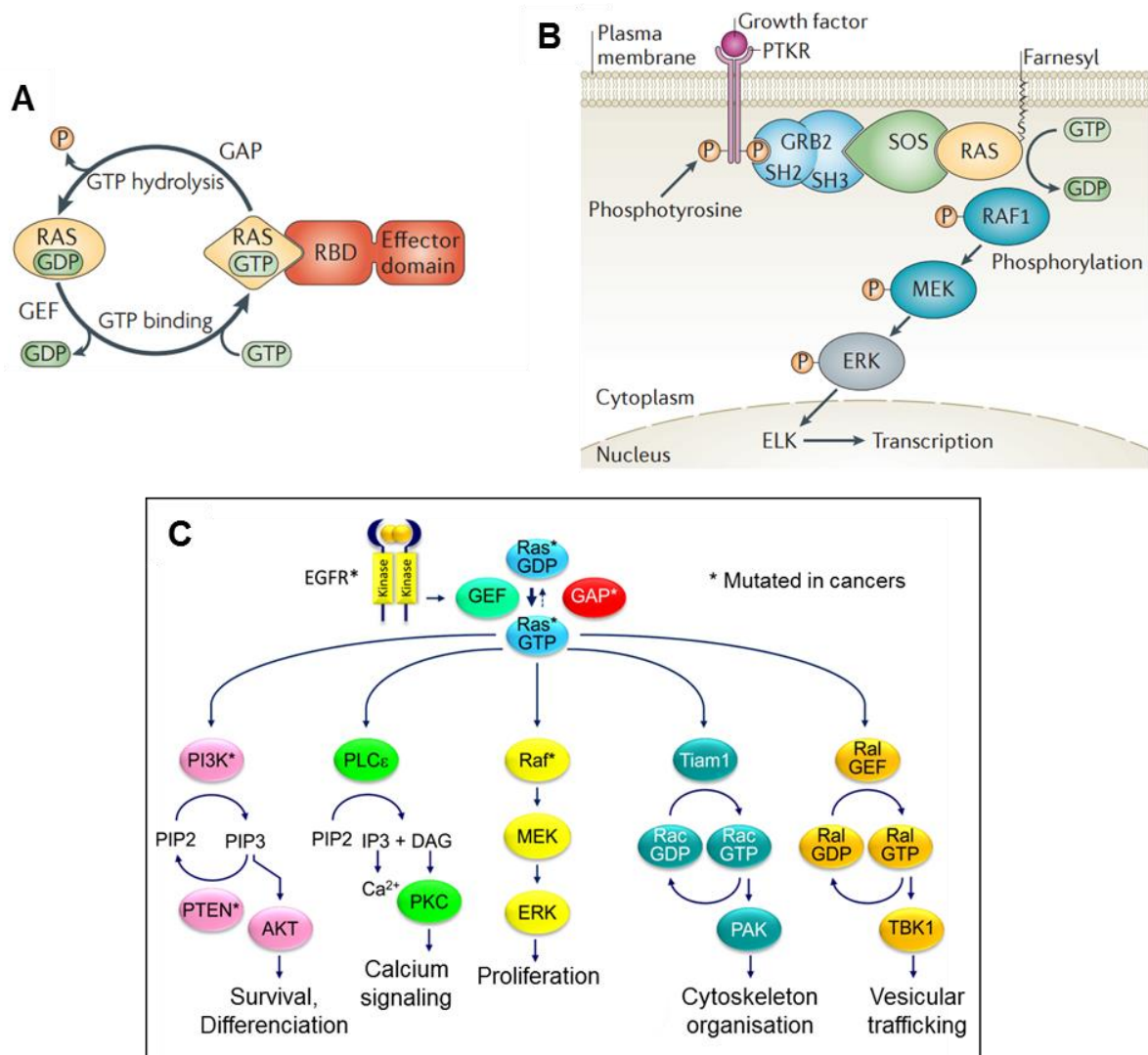
leurs similarités de fonctions : RAS, RAD, RAB, RAP, RAN, RHO, RHEB, ARF et RIT (Wennerberg et al., 2005). L'activité de ces protéines GTPases est régulée par la liaison, l'hydrolyse de GTP et le relargage de GDP. Une série de motifs conservés structurellement et fonctionnellement au sein de la superfamille RAS forment le site de liaison au GTP. La découverte de l'oncogène RAS a eu lieu dans les années 1960, au cours de l'étude de rétrovirus transformants isolés d'animaux et induisant le développement de sarcomes dans les animaux infectés et la transformation de cellules en culture. L'identification des virus de Harvey en 1964 (Harvey, 1964) et de Kirsten en 1967 (Kirsten and Mayer, 1967) a ainsi fourni les premiers éléments à la description des oncogènes H-RAS (Harvey RA<sub>t</sub> Sarcoma) et K-RAS (Kristen RA<sub>t</sub> Sarcoma) que nous connaissons actuellement.

## I. La signalisation RAS

L'oncogène RAS est impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la sénescence, l'apoptose et la transition épithélio-mésenchymateuse principalement en contrôlant les voies PI3K et MEK/ERK (**figure II**). Cette protéine de 21 kDa s'associe à la face interne de la membrane plasmique grâce à des modifications post-traductionnelles. Elle possède un domaine de liaison capable de lier alternativement du GTP (Guanosine Triphosphate) ou du GDP (Guanosine Diphosphate). Liée au GTP, RAS se trouve sous sa forme active alors qu'elle est inactive lorsqu'elle est liée au GDP. Les GEF (Guanine nucléotide Exchange Factors) catalysent le relargage de GDP tandis que les GAP (GTPase Activating Proteins) catalysent l'hydrolyse du GTP. RAS est activée en réponse à des signaux environnementaux via des récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase comme l'EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) ou le récepteur ERBB2 (ERB-B2 receptor tyrosine kinase 2). A la suite de leur activation, ces récepteurs s'autophosphorylent et recrutent les protéines GEF au niveau de leurs domaines intra-cellulaires. Ces GEF chargent une molécule de GTP sur RAS, qui passe alors sous un état actif, capable d'activer à son tour différents effecteurs qui se lient à RAS au moyen d'un domaine RBD (RAS Binding Domain) conservé : parmi eux, la protéine RAF, activant la voie des MAP Kinases MEK/ERK. La cascade d'activation de kinases qui en découle permet l'activation de la transcription des gènes du cycle cellulaire. La voie RAF1-ERK est la mieux



caractérisée et est fréquemment dérégulée dans les cancers. RAS est également capable d'activer d'autres voies (**figure II-C**) comme celle de la PI3K (Phosphoinositol-3-Kinase) qui permet la production de PIP3, recrute PDK1 (Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1) et phosphoryle et active la kinase AKT. Cette voie conduit à une augmentation de la survie cellulaire et active mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), augmentant la biosynthèse des ribosomes et la traduction des ARNm.



### Figure II : La signalisation RAS

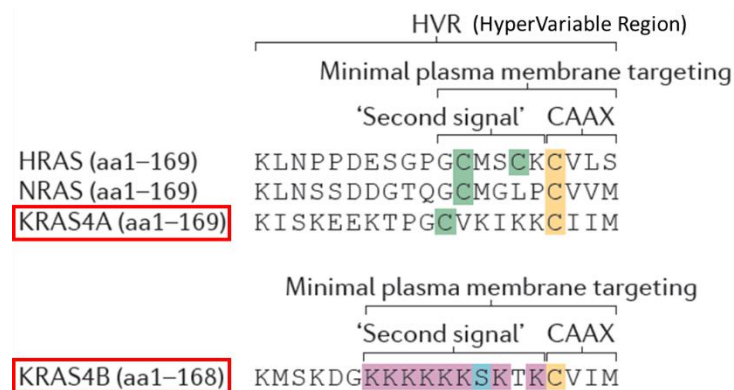
(A) Sous sa forme inactive, RAS est lié au GDP. Il est activé par une protéine GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) qui permet à RAS de lier du GTP en l'échange d'un GDP. La liaison au GTP induit un changement de conformation de la protéine, permettant la liaison de protéines effectrices via l'interaction de leurs domaines RBD (Ras Binding Domain) sur RAS. La liaison d'une GAP (GTPase-Activating Protein) à RAS augmente son activité GTPase et permet son retour à une conformation inactive, liée au GDP. (B) La signalisation RAS-RAF1-ERK est engagée suite à l'activation de récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase par des facteurs de croissance. La protéine adaptatrice GRB2 (Growth factor Receptor Bound 2) se lie au domaine intra-cellulaire des récepteurs activés (phosphorylés). GRB2 interagit également avec la GEF SOS (Son Of Sevenless), l'adressant à la membrane plasmique, où elle peut alors activer RAS. RAS active une cascade de signalisation en se liant à RAF1 à la membrane, activant ainsi sa fonction kinase (d'après Ahearn et al., 2012). (C) RAS lié au GTP interagit avec divers effecteurs. Les cinq effecteurs représentés ont été validés par des expériences in vitro et/ou in vivo pour leur implication dans l'oncogenèse induite par RAS. L'activité de RAS est augmentée dans les cancers par des mécanismes directs (via des mutations de sa séquence) ou indirects (via des mutations inactivatrices de GAP ou activatrices de récepteurs membranaires) (modifié d'après Baines et al., 2011).

## II. Isoformes de RAS

Il existe quatre isoformes de RAS : K-RAS4A, K-RAS-4B, H-RAS et N-RAS, codées par trois gènes distincts (les deux isoformes K-RAS étant obtenues suite à l'épissage alternatif de l'ARNm issu du gène *K-RAS*). Leurs séquences en acides aminés sont très similaires (90 % d'homologie) et aucune variabilité fonctionnelle n'a été clairement définie. Cependant un nombre grandissant de travaux souligne que les différentes isoformes de RAS exercent des rôles spécifiques en fonction des contextes cellulaires. Ainsi, les isoformes de RAS lient des panels différents de protéines GAP et GEF (Jones and Jackson, 1998) et d'effecteurs (Yan et al., 1998), ce qui régule de façon différentielle leur activité GTPase d'une part et leurs voies de signalisation sous-jacentes d'autre part. De plus, la description de différences de mécanismes d'adressage membranaire et de localisation subcellulaire des isoformes renforce la notion de spécificité fonctionnelle de chacune d'elles (Hancock, 2003).

La transduction de signaux intracellulaires par RAS est permise par sa capacité de liaison au GTP mais également par son association aux membranes. La liaison de RAS aux membranes facilite son interaction avec les GAP et les GEF. La protéine RAS native est globulaire et hydrophile. Son association à des membranes est régulée par une série de modifications post-traductionnelles au niveau de son domaine C-terminal, qui diffèrent en fonction des isoformes (**figure III**). RAS appartient à une classe de protéines possédant un domaine CAAX en C-terminal, C correspondant à une cystéine, A à des acides aminés aliphatiques et X à un acide aminé aléatoire. Cette séquence est modifiée post-traductionnellement par trois enzymes agissant de façon séquentielle (Wright and Philips, 2006). Dans un premier temps, la séquence est prénylée : ceci correspond à l'ajout d'un groupement farnésyl (lipide à 15 carbones) sur la cystéine par une enzyme farnésyl-transférase. RAS ainsi farnésylé s'accumule à la membrane du RE où il se trouve alors au contact de l'endoprotéase RCE1 (RAS-Converting Enzyme 1), coupant la séquence de RAS juste après le résidu cystéine farnésylé. La cystéine C-terminale subit alors une méthylation par l'enzyme ICMT (Isoprénylcysteine CarboxylMethylTransferase). Des trois modifications citées ci-dessus, seule celle effectuée par l'ICMT est réversible. Ces modifications permettent à RAS d'acquérir un domaine C-terminal hydrophobe, capable de s'enchâsser dans les membranes. Bien que les modifications de la

séquence CAAX soient nécessaires à l'association de RAS avec les membranes, elles ne sont pas suffisantes. En effet, une séquence HVR (Hyper Variable Region) présente en amont de CAAX constitue un second signal d'adressage qui peut être de deux types : pour les isoformes K-RAS4A, H-RAS et N-RAS, des cystéines présentes sur cette séquence peuvent servir de sites de palmitoylation ; pour l'isoforme K-RAS4B, ce signal correspond à une région polybasique riche en lysines. Outre les modifications post-traductionnelles d'adressage membranaire citées ci-dessus, RAS subit d'autres modifications, qui sont cette fois dépendantes du contexte cellulaire. On peut citer les ubiquitinations, les nitrosylations ou encore la phosphorylation de K-RAS4B sur la sérine 181 par la PKC (Protein Kinase C) induisant une diminution des charges positives au niveau de la région polybasique C-terminale et aboutissant à un « switch électrostatique farnésyl » de RAS vers la membrane du réticulum (Bivona et al., 2006). Bien que ces différences de modifications post-traductionnelles aient été observées entre les isoformes de RAS, leur signification biologique reste à élucider.



**Figure III : Modifications post-traductionnelles de l'extrémité C-terminale de RAS permettant l'adressage aux membranes cellulaires**

Les régions hypervariables (HVR) des quatre isoformes de RAS contiennent des informations requises pour leur adressage vers divers membranes subcellulaires. Le motif CAAX est souvent considéré comme le premier signal. Un second signal précédant cette séquence est requis pour un adressage à la membrane plasmique. Pour H-RAS, N-RAS et K-RAS4A, ce second signal est constitué de résidus cystéine palmitoylés. Pour K-RAS4B, le second signal est une région polybasique ayant une charge positive (représentée en rose). Les résidus farnésylés de la séquence CAAX figurent en jaune. Le résidu cystéine palmitoylé dans le second signal est représenté en vert. La sérine 181 de K-RAS4B, principal site de phosphorylation figure en bleu (d'après Ahearn et al., 2012).

### III. Tumorigenèse induite par RAS

Le fait que RAS soit fréquemment muté dans différents types de tumeurs ou qu'il soit activé par des mécanismes situés en amont (tels que des mutations

activatrices de récepteurs membranaires ou inhibitrices de GAP) suggère que les signaux qu'il induit jouent un rôle important dans la tumorigenèse. Ainsi, les mutations activatrices de RAS sont retrouvées dans 30 % des cancers et touchent des organes variés tels que le pancréas, le colon/rectum et le poumon (Barbacid, 1990). La séquence de l'isoforme K-RAS est celle retrouvée la plus souvent mutée (21,6 % des cancers sont concernés). Paradoxalement, l'isoforme la plus étudiée, H-RAS, est mutée dans seulement 3,3 % des cancers (source : COSMIC Database). Les trois sites les plus souvent mutés dans la séquence de RAS se trouvent au niveau des codons 12, 13 et 61. Une des mutations la plus courante est la substitution d'une glycine en valine sur le codon 12 (K-RAS V12). Toutes les mutations décrites empêchent l'hydrolyse du GTP associé à RAS, qui se trouve alors sous une forme constitutivement active, activant ses effecteurs de façon dérégulée. La capacité de RAS à transformer des cellules dépend donc de ses capacités à interagir avec ses effecteurs sous-jacents. RAS est une protéine dont la fonction est majoritairement décrite à la surface interne de la membrane plasmique mais des travaux ont mis en évidence l'existence d'une signalisation induite par RAS au niveau de membranes intracellulaires du RE, du golgi et des mitochondries (Fehrenbacher et al., 2009). Cette compartimentation subcellulaire de l'activité de RAS dépend des isoformes et semble modulée par des différences de prénylation de leurs extrémités C-terminales (Lynch et al., 2015). La compartimentation de la signalisation associée à RAS dans la cellule est donc un élément participant à la diversité des fonctions cellulaires associées à cet oncogène.

#### **IV. Stratégies de ciblage de RAS en thérapie**

##### ***a. Ciblage de l'activité GTPase de RAS***

Les mutations de RAS au niveau du site de liaison au GDP/GTP retrouvées dans les cancers entraînent une liaison constitutive du GTP à son site de liaison, ou empêche la liaison de RAS aux GAPs, d'où une activation constante de l'oncogène. Des recherches ont donc ciblé le domaine de liaison au GTP de RAS en utilisant des petites molécules antagonistes du GTP. Bien que ce type d'approche fonctionne pour empêcher la liaison d'ATP aux protéines kinases (l'ATP ayant une affinité faible pour son site de liaison), il demeure inefficace pour bloquer la liaison du GTP à RAS

(le GTP s'associant à RAS avec une forte affinité, de l'ordre du picomolaire) (Ostrem et al., 2013). D'autres travaux ont porté sur le développement de molécules capables de mimer les effets de protéines GAP afin de restaurer une activité GTPase à RAS muté mais se sont avérés peu concluants. Les recherches se sont par la suite axées sur des approches indirectes de ciblage décrites ci-dessous.

### ***b. Inhibition de l'adressage membranaire***

Les modifications post-traductionnelles d'ajout de lipides au niveau du domaine C-terminal de RAS sont indispensables à l'association de cet oncogène aux membranes et à ses fonctions. La farnésylation de la séquence CAAX étant indispensable à l'activité transformante de RAS, des recherches ont été effectuées afin de bloquer ce processus. De nombreux inhibiteurs de farnesyl-transférase ont été développés parmi lesquels le tipifarnib et le lonafarnib (**figure IV**), testés en essais cliniques de phase III. Ces inhibiteurs ciblent efficacement la croissance tumorale médiée par H-RAS mais ne bloquent pas la prénylation de N-RAS et K-RAS (Whyte et al., 1997). Ceci est dû aux différences de séquences C-terminales des isoformes de RAS. En effet, lorsque l'activité de farnésylation est bloquée, N-RAS et K-RAS4B peuvent malgré tout subir une prénylation alternative, via l'ajout d'un groupement géranyl (par une géranyl-transférase), qui se substitue au farnésyl et permet l'adressage de RAS à la membrane. Une molécule inhibant à la fois les activités de farnésyl-transférases et géranyl-transférases utilisée en essais cliniques n'a cependant pas permis de bloquer la prénylation de K-RAS (Lobell et al., 2002). Une autre limite à l'utilisation de tels inhibiteurs est qu'il n'existe pas de corrélation entre la réponse tumorale aux inhibiteurs de farnésyl-transférases et le statut de mutation de RAS, suggérant que ces molécules ne ciblent pas spécifiquement RAS muté. Enfin, ces enzymes de transfert de lipides ciblent d'autres protéines GTPases : il est alors difficile d'attribuer une réponse thérapeutique anti-tumorale à l'inhibition unique de RAS.

Parmi les autres approches développées dans le but d'empêcher l'adressage de RAS aux membranes on peut citer : l'inhibition des enzymes RCE1 et ICMT (Winter-Vann and Casey, 2005), l'inhibition de la palmitoylation (qui constitue le second signal permettant l'adressage de H-RAS, N-RAS et K-RAS4A) ou encore la

synthèse de molécules empêchant la liaison des groupements prényl aux membranes (la liaison de ces groupements lipidiques aux membranes ne se faisant pas de façon aléatoire, mais via des récepteurs membranaires pouvant être ciblés de façon spécifique (Marshall, 1993)).

### ***c. Inhibition de l'expression de RAS***

Une approche basée sur l'utilisation de nucléotides anti-sens inhibant l'expression de H-RAS a été développée et a montré des effets anti-tumoraux in vivo (Yang et al., 2003). Elle emploie des oligonucléotides synthétiques ciblant spécifiquement des séquences présentes dans l'ARNm de H-RAS. Via la liaison à l'ARNm de H-RAS, ces oligonucléotides inhibent la production de la protéine en permettant la dégradation des complexes « ARNm/acide nucléique interférent » par des RNAses et en empêchant directement la traduction. Ce type d'approche permet de cibler de façon fine chaque isoforme de RAS. Des essais in vitro ont d'ailleurs été menés dans ce sens pour le ciblage de K-RAS, mais aucun n'a abouti à un essai clinique. L'utilisation d'oligonucléotides en clinique pose le problème de sélectivité de délivrance d'un tel traitement uniquement aux cellules tumorales. En effet, inhiber la production de RAS dans des cellules saines peut aboutir à des phénomènes de toxicité.

### ***d. Ciblage des voies de signalisation induites par RAS***

RAS activé se lie à ses effecteurs caractérisés par la présence d'un domaine RBD (RAS Binding Domain) dans leur structure. Les kinases RAF sont les effecteurs les mieux caractérisés à ce jour. Par ailleurs, les mutations activatrices fréquemment observées de B-RAF et de PI3K dans les cancers, combinées au rôle décrit de ces voies dans la croissance cellulaire, ont fourni des preuves de l'importance de ces deux voies dans les mécanismes oncogéniques induits par RAS. De plus, des études ont permis de mettre en évidence l'implication des voies impliquant les RalGEF (Ral Guanine nucleotide Exchange Factor), de la PLC $\epsilon$  (PhosphoLipase C epsilon) et de Tiam1 (T-Cell Lymphoma Invasion And Metastasis 1) dans l'oncogenèse médiée par RAS.

### 1. La voie RAF1-MEK-ERK

Le fait que des mutations de RAF et de RAS ne surviennent jamais de façon simultanée dans les cancers suggère un rôle fonctionnel équivalent de ces protéines dans les phénomènes de tumorigenèse. Ce constat fait de la voie RAF-MEK-ERK une cible attractive pour le ciblage de cancers dans lesquels RAS est muté. De ce fait, une multitude d'inhibiteurs de RAF et de MEK sont actuellement en cours de développement (Smith et al., 2006). Parmi eux, le vemurafenib (**figure IV**), un inhibiteur de B-RAF muté, est entré en essai clinique de phase I/II. De plus, l'activité anti-tumorale des inhibiteurs de MEK s'avère effective dans des modèles de xénogreffes de cancers pancréatiques, colorectaux et mammaires, ce qui a permis la poursuite de leur développement vers des essais cliniques. Cependant, des travaux menés in vitro suggèrent que ces inhibiteurs sont efficaces dans les cas où RAF est muté mais pas dans ceux où RAS est muté (Solit et al., 2006). Ces éléments révèlent la possibilité de mise en place de mécanismes de compensation, permettant aux cellules tumorales de poursuivre leur croissance malgré l'inhibition de la signalisation MEK.

### 2. La voie PI3K

La seconde classe d'effecteurs de RAS la mieux caractérisée est celle des sous-unités catalytiques des PI3K (Phosphoinositol tri phosphate Kinases) de classe I ( $p110\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  and  $\gamma$ ). Ces protéines ont été décrites comme requises pour l'oncogénèse induite par RAS (Castellano and Downward, 2010). La voie PI3K-AKT-mTOR est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération et la survie et est fréquemment altérée dans les cancers. Elle constitue une cible pour le développement de composés anti-tumoraux ciblant PI3K, AKT et mTOR. Deux inhibiteurs de mTOR ont déjà été autorisés à l'utilisation dans des cas de cancers rénaux avancés et de lymphomes du manteau RAS mutés (Fasolo and Sessa, 2012).

### 3. Ciblage d'autres voies

Certaines études ont mis en évidence l'absence de corrélation entre le statut mutationnel de RAS et l'activation de la voie RAF-MEK-ERK, suggérant que d'autres voies sont importantes dans les fonctions de RAS. Parmi elles, la voie RalGEF

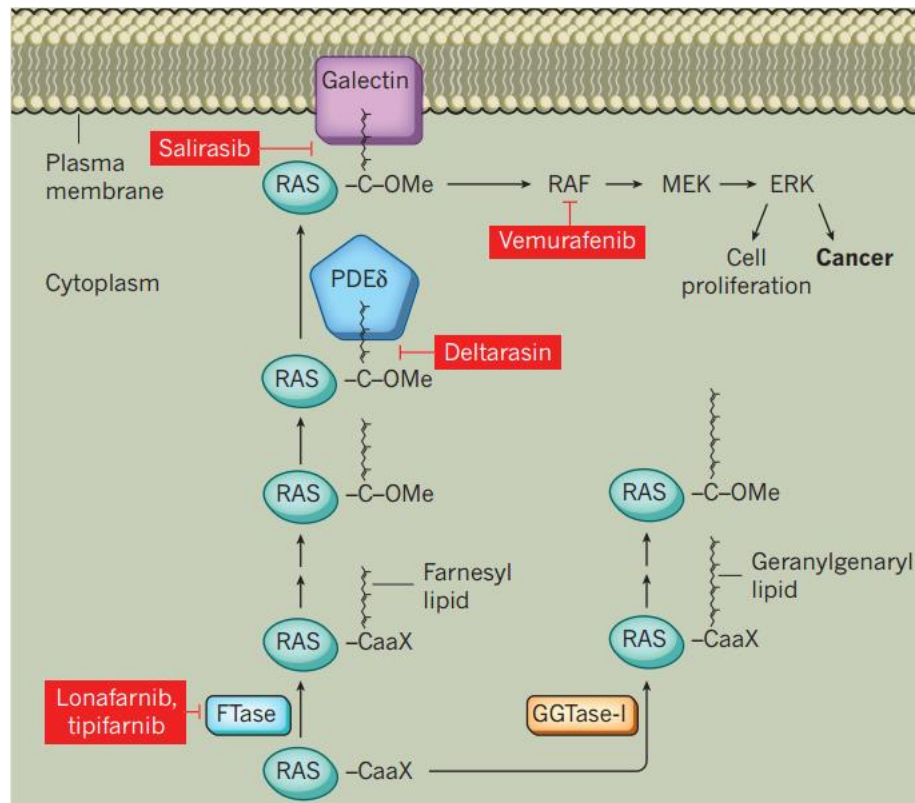


comprend des protéines ayant un fort degré d'homologie avec RAS : RAS-like RalA et RalB. De façon similaire à RAS, ces homologues possèdent une séquence CAAX en C-terminal et leur adressage est donc régulé via des mécanismes de prénylation précédemment décrits. Bien qu'aucune mutation activatrice de cette voie n'ait été décrite à ce jour, elle est malgré tout impliquée dans la tumorigenèse. De ce fait, des stratégies visant à inhiber l'activité d'enzymes géranyl-transférases ont été utilisées en vue d'inhiber cette voie, mais abandonnées du fait de leur manque de spécificité. En revanche, un travail a mis en évidence l'importance de la phosphorylation de RalA par la kinase Aurora-A dans la transformation induite par cette kinase. Ceci suggère que l'utilisation d'inhibiteurs d'Aurora-A pourrait cibler efficacement les fonctions oncogéniques de RalA (Lim et al., 2010).

#### ***e. Approches de létalité synthétique***

Afin d'identifier de nouveaux traitements ciblant les voies induites par RAS avec efficacité, des équipes ont développé des approches de criblage basées sur le principe de létalité synthétique. Selon ce principe, deux gènes sont définis comme « synthétiquement létaux » si la mutation de chaque gène seule est compatible avec la viabilité, mais que les mutations simultanées des deux gènes sont létales (Kaelin, 2009). L'identification de voies oncogéniques dans les cancers ayant une mutation RAS est ainsi permise grâce à l'utilisation de molécules d'ARN interférence ciblant un large panel de gènes sur des cellules portant un RAS muté. La perturbation de certains gènes aboutit alors à la mise en évidence d'une « létalité synthétique » entre un gène de RAS muté et un second gène ciblé par ARN interférence, fournissant de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour les cancers portant une mutation de RAS. Un travail utilisant des ARN interférence ciblant uniquement des gènes codant pour des protéines kinases a mis en évidence une létalité synthétique entre K-RAS muté et la sérine/thréonine kinase STK33, requise uniquement dans des cellules ayant une forme de RAS mutée. STK33 participe à la viabilité cellulaire en permettant l'inactivation des fonctions pro-apoptotiques de BAD via sa phosphorylation dépendante de la kinase S6K1 (Scholl et al., 2009). Ces approches d'identification de nouvelles cibles thérapeutiques sont primordiales. En effet, du fait de son expression constante, l'absence de mutations dans sa séquence et son

défaut d'activité transformante, STK33 n'aurait pas pu être identifiée par des approches plus classiques.



#### Figure IV : Inhibiteurs de la signalisation RAS

Suite à leur synthèse, les molécules de RAS inactif subissent une série de modifications post-traductionnelles au niveau du motif CAAX présent à leur extrémité C-terminale. L'ajout d'un groupement farnésyl, suivi de modifications de ce lipide et de la méthylation de la séquence CAAX conduit à la liaison de la protéine PDEδ au groupement farnésyl, ce qui favorise l'accumulation de RAS à la membrane plasmique. Des stratégies pharmacologiques utilisant des inhibiteurs de farnésyltransférases (lonafarnib, tipifarnib) sont inefficaces sur K-RAS et N-RAS car elles induisent des modifications alternatives par des géranylgeranyltransférases. Une autre molécule (salirasib) a été développée pour entrer en compétition avec RAS pour sa liaison à une protéine d'ancrage membranaire (GALECTIN), encourageant ainsi la dégradation de RAS. D'autres stratégies ont été mises en œuvre, comme l'inhibition de la liaison de RAS farnésylé à PDEδ (deltarasin) ou encore le ciblage de la voie RAF-MEK-ERK située en aval de RAS (vemurafenib) (d'après Baker and Der, 2013).

### **C. L'interaction RAS / BCL-xL comme cible thérapeutique ?**

Les interactions décrites entre les voies de signalisation induites par RAS et les protéines de la famille de BCL-2 sont nombreuses (Kang and Pervaiz, 2012). RAS a été décrit comme interagissant directement avec la protéine anti-apoptotique BCL-2, cette interaction permettant à BCL-2 d'empêcher le déclenchement de l'apoptose induite par RAS (Chen and Faller, 1996). Un travail a par la suite mis en évidence des interactions différentielles des isoformes de RAS avec BCL-2 associées à des localisations subcellulaires propres à chaque isoforme de RAS (Rebollo et al., 1999). Ainsi, cette étude a montré que l'induction de l'apoptose dans une lignée de lymphocytes T murins aboutit à la relocalisation de H-RAS aux membranes mitochondriales, alors que K-RAS se situe à la mitochondrie uniquement en absence de stimulus apoptotique, suggérant que les interactions des isoformes de RAS avec BCL-2 ont des fonctions distinctes. La localisation de l'interaction N-RAS/BCL-2 régule également la sensibilité des cellules à l'apoptose : l'étude d'échantillons de myélodysplasies a en effet révélé que la présence de complexes N-RAS/BCL-2 à la membrane plasmique lève les fonctions anti-apoptotiques de BCL-2 et est retrouvée chez des patients ayant un stade peu avancé de la maladie. A l'opposé, une accumulation des interactions au niveau de la membrane mitochondriale est associée à une pathologie au stade plus avancé (Le Pogam et al., 2013). L'interaction RAS/BCL-2 serait impliquée dans la migration tumorale : un travail a suggéré que l'interaction de RAS et de BCL-2 à la mitochondrie coïncide avec le phénotype invasif de lignées cancéreuses mammaires n'exprimant pas de récepteurs aux œstrogènes (Wang et al., 2009).

Un lien fonctionnel a également été établi entre RAS et BCL-xL lors de l'étude du phénomène d'anoïkis induit par RAS. L'anoïkis est une mort cellulaire déclenchée par le détachement des cellules de la matrice extra-cellulaire. Une équipe a montré que la stabilisation de BCL-xL est un mécanisme de résistance à l'anoïkis de cellules transformées par H-RAS ou K-RAS activé (Rosen et al., 2000). RAS est également décrit comme interagissant directement avec BCL-xL : l'interaction entre K-RASV12G (une forme constitutivement active de K-RAS) et BCL-xL à la mitochondrie induisant l'apoptose (Bivona et al., 2006). Une étude a par la suite suggéré une interaction tri-moléculaire entre l'IP3R, K-RAS4B et BCL-xL à la

membrane du réticulum endoplasmique. Ainsi, K-RAS se lie à un site présent en C-terminal de l'IP3R de façon dépendante de BCL-xL, ce qui aboutit au blocage des flux calciques du réticulum vers les mitochondries et au déclenchement de la mort cellulaire (Sung et al., 2013). De plus, RAS et BCL-xL sont impliqués dans l'échappement des cellules cancéreuses à la sénescence. En effet, un travail mené sur des lignées de cancer du côlon a montré que l'échappement de cellules à la sénescence induite par l'oncogène RAS est corrélée à une dédifférenciation cellulaire et une dépendance à BCL-xL et MCL-1 pour la survie (de Carné Trécesson et al., 2011). Enfin, une approche utilisant le principe de létalité synthétique a mis en évidence qu'une combinaison d'inhibiteurs de BCL-xL (ABT-263) et de MEK induit l'apoptose de cellules tumorales K-RAS mutées (Corcoran et al., 2013). Le ciblage concomitant des fonctions de RAS et de BCL-xL semble donc être prometteur en thérapie.

Les modalités d'interaction entre RAS et BCL-xL/BCL-2 restent cependant mal connues : le domaine BH4 de BCL-2 serait impliqué (Denis et al., 2003). Il semble que l'intérieur de la poche hydrophobe ne soit pas mis en jeu. Bien que de nombreux travaux suggérant l'importance de ces interactions dans des processus cellulaires variés aient été menés, la structure ainsi que les conséquences fonctionnelles de ces liaisons demeurent inconnues et restent donc à évaluer.

#### **D. Objectifs du projet 2 de thèse**

En vue de mieux comprendre la structure et les conséquences de l'interaction K-RAS/BCL-xL en cellule entière vivante, le premier objectif de mon travail a été de développer un modèle d'étude basé sur la technologie de Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). Ce modèle a été validé par différentes techniques incluant la co-immunoprécipitation et la réalisation d'expériences de saturation par BRET.

En collaboration avec Didier Decaudin et Angelita Rebollo de l'Institut Pierre et Marie Curie (Paris), une approche utilisant la technique de pep-scan a été développée afin de permettre l'identification de domaines de RAS et de BCL-xL impliqués dans l'interaction et d'identifier des peptides inhibiteurs de cette interaction.

Par ailleurs, une approche complémentaire de criblage d'une banque de 640 molécules chimiques provenant de la Chimiothèque Nationale Essentielle (CNE) a été développée sur le modèle BRET K-RAS/BCL-xL dans le but d'identifier des modulateurs de l'interaction. L'identification de tels composés nous fournissant des outils d'étude de l'interaction, car aucune molécule ciblant spécifiquement l'interaction RAS/BCL-xL n'est décrite à ce jour. Suite à ce criblage, l'objectif a été de réaliser des essais fonctionnels in vitro et ex vivo avec un hit inhibiteur potentiel identifié afin de le valider comme outil d'étude de l'interaction.

---

## Résultats

K-RAS est la forme de RAS la plus souvent mutée dans les cancers, ce qui en fait une cible de choix pour le développement de nouveaux traitements. L'interaction K-RAS/BCL-xL a été précédemment décrite par des techniques de co-immuno-précipitation et de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Elle a été suggérée comme participant à divers processus oncogéniques tels que la résistance à l'apoptose induite par K-RAS et la migration cellulaire. Cependant, les modalités et les conséquences fonctionnelles de cette interaction restent mal connues. Plusieurs questions demeurent : Quel est l'impact du statut d'activation de K-RAS dans l'interaction avec BCL-xL ? Quelles sont les conséquences fonctionnelles de cette interaction ? Quels sont les domaines protéiques impliqués ? Comment développer des inhibiteurs de cette interaction ?

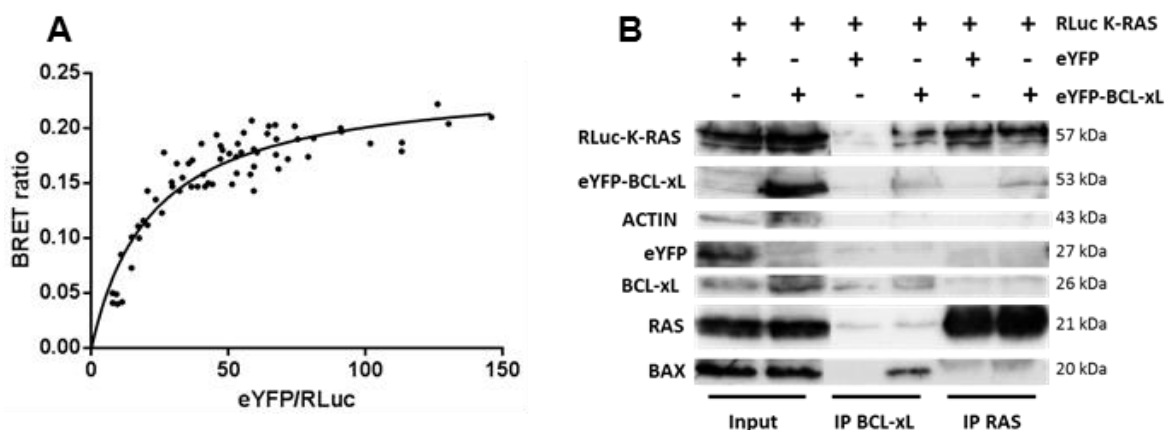
### A. K-RAS interagit avec BCL-xL en cellule entière vivante

Afin d'étudier l'interaction K-RAS/BCL-xL en cellule entière vivante, nous avons développé un modèle basé sur l'utilisation de la technologie BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer). Ceci nous permet de travailler dans des conditions plus proches de la réalité biologique (en comparaison avec les co-immuno-précipitations) tout en s'affranchissant des problèmes de bruit de fond inhérents au FRET.

#### I. Mise au point d'un modèle de mesure des interactions K-RAS/BCL-xL en cellule entière par BRET

Le modèle BRET mis au point pour l'étude de l'interaction K-RAS/BCL-xL a été développé en utilisant un vecteur codant pour K-RAS fusionné avec la RLuc en N-terminal et un vecteur codant pour BCL-xL fusionné avec l'eYFP en N-terminal. Les courbes de régression tirées des expériences de saturation BRET permettent de préciser la nature spécifique de l'interaction étudiée. Nous avons procédé à des essais de saturation dans lesquels le BRET est mesuré dans des cellules co-exprimant une quantité constante de donneur RLuc-K-RAS et des quantités croissantes d'accepteur eYFP-BCL-xL. Un faible niveau de donneur permettant d'obtenir un signal de luminescence suffisant et stable est utilisé. Les interactions

spécifiques résultent en un signal BRET qui tend à atteindre un plateau pour de fortes quantités d'accepteur exprimées tandis que les interactions non-spécifiques résultent en un signal BRET qui augmente parallèlement à l'augmentation de la quantité d'accepteur, de façon linéaire. La **figure V-A** présente la courbe de saturation RLuc-K-RAS4A/eYFP-BCL-xL qui tend à atteindre un plateau pour de fortes quantités d'eYFP-BCL-xL exprimées, ce qui correspond à un profil d'interaction spécifique et saturante.



**Figure V : RLuc-K-RAS et eYFP-BCL-xL interagissent en cellule entière**

(A) La lignée HeLa est transfectée par 50 ng de plasmide codant RLuc-K-RAS4A et des quantités croissantes de plasmides codant eYFP-BCL-xL avant mesure du BRET. La courbe de saturation présentée est représentative de trois expériences indépendantes. (B) La lignée HeLa est transfectée par deux plasmides codant RLuc-K-RAS4A et eYFP-BCL-xL avant analyse de son lysat protéique par immunoprécipitation avec un anticorps anti-panRAS ou anti-BCL-xL et western blot. Le western blot présenté est représentatif de deux expériences indépendantes.

La seule mesure d'un signal BRET est insuffisante pour conclure à une spécificité de l'interaction étudiée. Il a été indispensable de la valider par une technique complémentaire d'immuno-précipitation. Les vecteurs codant RLuc-K-RAS et eYFP-BCL-xL ou l'eYFP seule ont été co-transfectés dans des cellules HeLa. L'eYFP exprimée dans les cellules est observée au microscope à fluorescence et permet d'estimer l'efficacité de nos transfections par eYFP-BCL-xL aux alentours de 80 %. L'efficacité de la transfection par RLuc-K-RAS ne peut quant à elle pas être vérifiée, mais l'obtention d'un pourcentage de transfection par l'eYFP élevé suggère que la plupart des cellules transfectées par la luciférase auront également été transfectées par l'eYFP. Un western blot réalisé avec les extraits protéiques totaux a permis de confirmer l'expression des protéines endogènes RAS et BCL-xL ainsi que celle des protéines exogènes RLuc-K-RAS, eYFP-BCL-xL et eYFP seule dans les

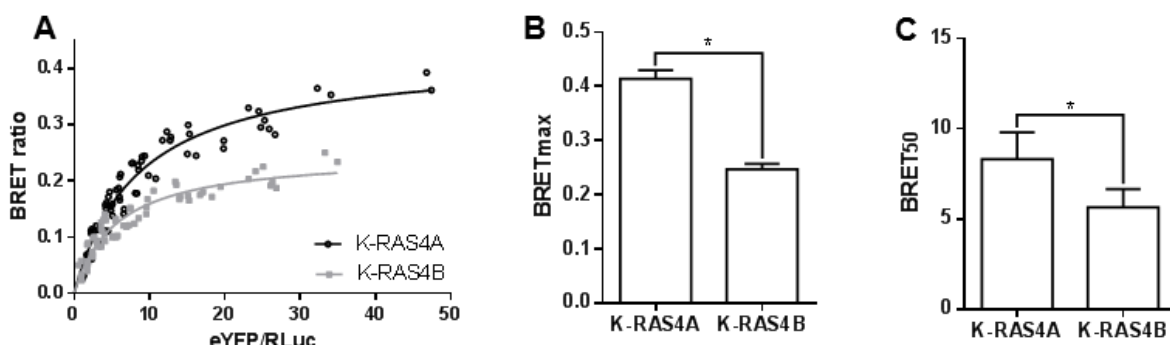
cellules transfectées (**Figure V-B**). Des immunoprécipitations avec des anticorps anti-BCL-xL et anti-RAS indiquent une interaction entre les deux protéines de fusion, en accord avec des résultats publiés par l'équipe de Mark Philips (Bivona et al., 2006). On observe également un signal associé à RAS endogène dans l'immunoprécipitation de BCL-xL et un signal associé à BCL-xL endogène dans l'immunoprécipitation de RAS. Ces signaux sont plus faibles que ceux détectés pour les protéines exogènes co-immuno-précipitées. Ceci peut s'expliquer par le fait que les protéines de fusion sont surexprimées dans les cellules comparativement aux protéines endogènes. De plus, l'interaction entre les protéines K-RAS et BCL-xL endogènes est confirmée : nous détectons un signal associé à K-RAS endogène dans l'immunoprécipitation de BCL-xL faite dans des cellules n'exprimant pas eYFP-BCL-xL. Il faut également noter que l'eYFP seule n'interagit ni avec K-RAS ni avec BCL-xL. BAX est connu pour interagir avec BCL-xL et constitue donc un contrôle positif de notre immunoprécipitation réalisée avec un anticorps anti-BCL-xL. En revanche, on n'observe pas de BAX co-immunoprécipité avec BCL-xL endogène dans des cellules n'exprimant pas eYFP-BCL-xL. Il est possible que la protéine RLuc-K-RAS entre en compétition avec BAX pour la liaison à BCL-xL, d'où moins d'interactions entre BCL-xL et BAX dans ces cellules. Une autre hypothèse peut être un manque de sensibilité de la technique utilisée pour détecter des interactions BAX / BCL-xL endogènes peu représentées dans la cellule.

## II. Les deux isoformes de K-RAS interagissent avec BCL-xL

K-RAS possède deux isoformes : K-RAS4A et 4B issues de l'épissage alternatif du gène *K-RAS*, qui diffèrent uniquement par leur séquence C-terminale (**figure III**). Afin de déterminer si ces deux protéines sont capables d'interagir avec BCL-xL, nous avons procédé à des essais de saturation BRET en transfectant une quantité fixe de plasmide codant RLuc-K-RAS4A ou RLuc-K-RAS4B et des quantités croissantes de plasmide codant eYFP-BCL-xL. Les courbes de saturation obtenues présentées **figure VI** tendent à atteindre un plateau pour de fortes quantités de eYFP-BCL-xL exprimées, ce qui correspond à des profils d'interactions spécifiques et saturables.



On note cependant une différence d'intensité de signal BRET mesuré à saturation (=  $BRET_{max}$ , **figure VI-B**) entre les deux isoformes de RAS. Ceci peut s'expliquer des différences de localisations sub-cellulaires des deux protéines. En effet, ces isoformes diffèrent par la séquence de leur région hyper-variable, ce qui a un impact sur leurs modifications post traductionnelles et *in fine* sur leur localisation sub-cellulaire. Un transfert d'énergie d'intensité différente entre les isoformes de K-RAS et BCL-xL pourrait s'expliquer par l'adressage différentiel aux membranes des mitochondries et au RE de K-RAS4A et 4B qui sont décrits comme possédant des séquences d'adressage membranaires différentes (Tsai et al., 2015). De plus, la mesure d'un  $BRET_{50}$  plus faible pour le couple K-RAS4B / BCL-xL souligne une affinité relative de K-RAS4B pour BCL-xL plus importante que celle de K-RAS4A. Il faut donc une moins grande quantité d'eYFP-BCL-xL exprimé pour parvenir à un transfert d'énergie maximal. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que K-RAS4B se localise davantage aux membranes des mitochondries et du réticulum endoplasmique pour une meilleure interaction avec BCL-xL. Une modification du BRET mesuré pouvant également être liée à une insertion membranaire différente des deux isoformes de K-RAS selon leurs motifs d'adressage.



**Figure VI : Les isoformes K-RAS4A et K-RAS4B interagissent avec BCL-xL**

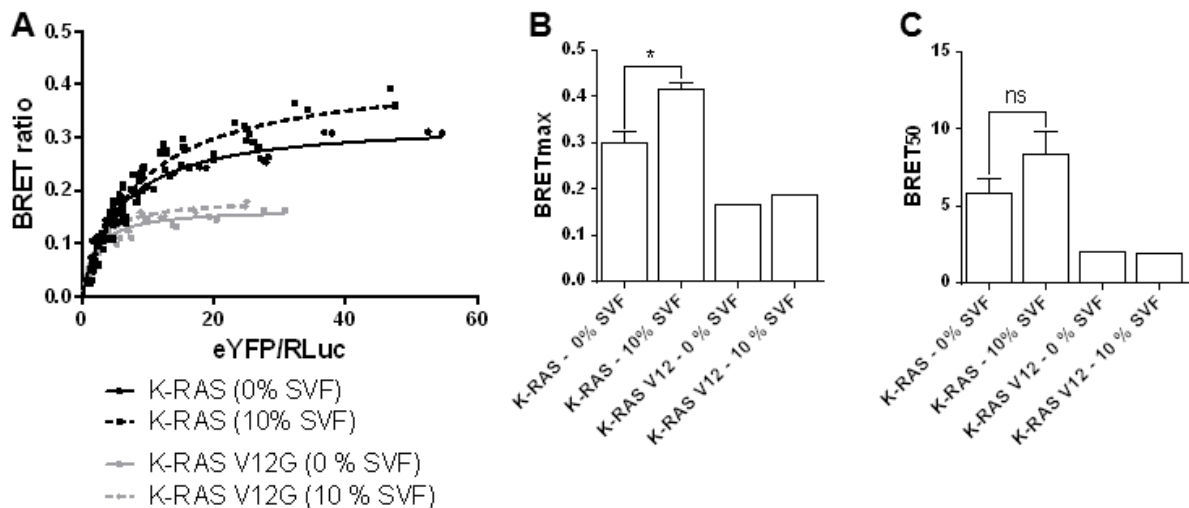
(A) La lignée MCF-7 est transfectée par 50 ng de plasmide codant RLuc-K-RAS4A ou RLuc-K-RAS4B et des quantités croissantes de plasmides codant eYFP-BCL-xL avant mesure du BRET et détermination des paramètres  $BRET_{max}$  (B) et  $BRET_{50}$  (C). Les courbes de saturation présentées sont représentatives de trois expériences indépendantes.

### III. BCL-xL interagit préférentiellement avec RAS activé

Des mutations activatrices de K-RAS étant détectées dans 30 % des cancers, il paraît intéressant de déterminer si ces mutations influencent l'interaction étudiée. Dans ce but, nous avons procédé à des mesures BRET sur les couples RLuc-K-

RAS/eYFP-BCL-xL et RLuc-K-RASV12/eYFP-BCL-xL exprimés dans des cellules MCF-7 (**Figure VII**). La forme de K-RAS portant la mutation G12V (= RASV12) a été étudiée : cette mutation, consistant en la substitution d'une glycine par une valine est une des plus fréquentes dans les cancers. Elle compromet la fonction d'hydrolyse du GTP de RAS et rend donc la protéine constitutivement active.

Dans le but de vérifier la spécificité de l'interaction entre K-RASV12 et BCL-xL, nous avons procédé à des essais de saturation dans lesquels le BRET est mesuré dans des cellules co-exprimant une quantité constante de donneur RLuc-K-RASV12 et des quantités croissantes d'accepteur eYFP-BCL-xL. La **figure VII** présente les courbes de saturation RLuc-K-RASV12 ou RLuc-K-RAS/eYFP-BCL-xL obtenues dans des conditions de culture en absence (0 %) ou en présence (10 %) de SVF. Les courbes tendent à atteindre un plateau pour de fortes quantités d'eYFP-BCL-xL exprimées, ce qui correspond à un profil d'interaction spécifique et saturante. Une baisse du signal BRET entre RLuc-K-RASV12 et eYFP-BCL-xL est observée (versus le couple RLuc-K-RAS/eYFP-BCL-xL). Cette diminution de signal pourrait être due à une différence de localisation de K-RASV12 comparé à son homologue non muté.

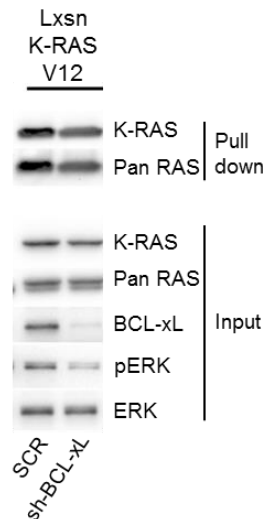


**Figure VII : La mutation V12 activatrice modifie la capacité de liaison de RAS à BCL-xL**

(A) La lignée MCF-7 est transfectée par 50 ng de plasmide codant RLuc-K-RAS4A ou RLuc-K-RAS4A V12G et des quantités croissantes de plasmides codant eYFP-BCL-xL, puis cultivée 24 h en présence ou en absence de SVF, avant mesure du BRET et détermination des paramètres BRETmax (B) et BRET50 (C). Les courbes de saturation présentées sont représentatives de trois expériences indépendantes pour le couple K-RAS4A/BCL-xL. Une seule expérience a été réalisée avec le couple K-RAS4A V12G/BCL-xL.

Le SVF est utilisé ici comme activateur non spécifique de K-RAS. La présence de SVF permet de détecter un signal BRET plus important à saturation avec le couple K-RAS/BCL-xL, alors que le signal BRET mesuré avec le couple K-RASV12/BCL-xL n'est pas dépendant de la présence de SVF. Ainsi, le SVF active K-RAS, permettant un meilleur transfert d'énergie entre RLuc-K-RAS et eYFP-BCL-xL. K-RASV12 étant quant à lui constitutivement sous forme active, il ne peut pas être activé davantage par le SVF, ce qui aboutit à un signal BRET<sub>max</sub> constant quel que soit le pourcentage de SVF (résultats préliminaires). Les BRET<sub>50</sub> reflétant les affinités relatives des couples étudiés ne varient pas en présence de SVF mais K-RAS4A V12G semble avoir une meilleure affinité relative pour BCL-xL que son homologue non muté : le BRET<sub>50</sub> du couple K-RAS4A V12G/BCL-xL étant inférieur à celui du couple K-RAS4A/BCL-xL (résultats préliminaires, **figure VII-C**). Ceci pourrait s'expliquer par un meilleur adressage de K-RAS muté aux membranes mitochondriales, où il interagirait alors plus facilement avec BCL-xL.

Nous avons ensuite cherché à déterminer l'effet de BCL-xL sur l'activité de RAS. Pour cela nous avons procédé à des expériences de pull-down de RAS activé, présentées **figure VIII**. Ces expériences ont été menées dans la lignée cellulaire mammaire non cancéreuse MCF10-A transduite par un vecteur induisant la surexpression de K-RAS V12 (lignée MCF10-A Lxsn K-RAS V12). Ces cellules ont été infectées par des sh-BCL-xL pendant 72 heures avant leur lyse et la réalisation d'un pull-down de RAS activé. Le pull-down reflète l'activation de RAS en montrant sa capacité à interagir avec le domaine de liaison de RAS dans RAF1 (RBD-RAF1). Nous avons ainsi pu montrer que la présence de BCL-xL stabilise RAS sous une forme active. En effet, nous détectons des quantités de RAS plus importantes dans le pull-down lorsque BCL-xL est exprimé. Ces résultats corrélerent avec une diminution de la phosphorylation de ERK lorsque l'expression de BCL-xL est éteinte, confirmant un effet stabilisateur de BCL-xL sur la voie RAF1 / MEK / ERK.

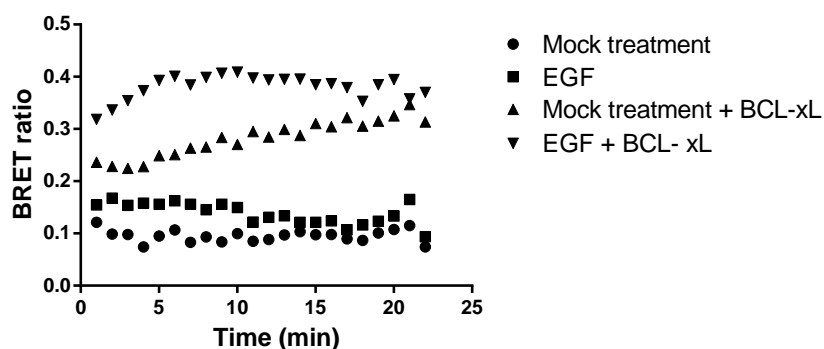


**Figure VIII : BCL-xL stabilise RAS sous forme active**

L'expression de BCL-xL est éteinte dans la lignée MCF-10A Lxsn K-RASV12 par infection lentivirale par un sh-BCL-xL (72 h). Les cellules sont lysées avant analyse leur statut d'activation de RAS par pull-down avec la protéine de fusion GST-RAF1-RBD et western-blot. Les résultats présentés sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Le rôle de stabilisation de l'activité de RAS par BCL-xL pourrait se faire de façon directe, par interaction avec RAS, ou par interaction avec ses effecteurs. De plus, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse d'une interaction tri-moléculaire entre RAS, BCL-xL et RAF1. Ces expériences de pull-down ont été complétées par des expériences de BRET visant à évaluer l'impact de BCL-xL sur les interactions entre RLuc-RBD-RAF1 et eYFP-K-RAS4A (résultats préliminaires, **figure IX**). Les lignées MCF-7 pLVX et pLVX(BCL-xL) ont été transfectées avec des vecteurs codant ces deux protéines de fusion. Les cellules ont été privées de SVF pendant 24 heures puis traitées à l'EGF afin de stimuler l'activité de RAS avant mesure du BRET. Dans les cellules non traitées et en absence de BCL-xL, on observe un signal BRET constant au cours des mesures. Ce signal augmente sous stimulation à l'EGF, preuve d'une meilleure interaction entre RAS et RBD-RAF1 suite à l'activation de RAS par l'EGF. Nous avons montré que l'interaction RAS/RBD-RAF1 est modulée par BCL-xL, une surexpression de BCL-xL ayant pour effet d'augmenter les interactions mesurées au cours du temps. Ceci appuie le fait que BCL-xL stabilise l'activité de RAS ou le complexe RAS/RBD-RAF1, en interagissant directement avec RAS, avec le RBD de RAF1 ou avec un site formé lors de l'interaction entre RAS et RBD-RAF1. Une stimulation à l'EGF combinée à une surexpression de BCL-xL aboutit à un effet mesuré encore plus marqué et plus rapide. En présence d'EGF, les couples RAS/RBD-RAF1 se forment plus rapidement et sont plus nombreux, et BCL-

xL favorise encore davantage ces interactions d'où un signal BRET mesuré plus important.



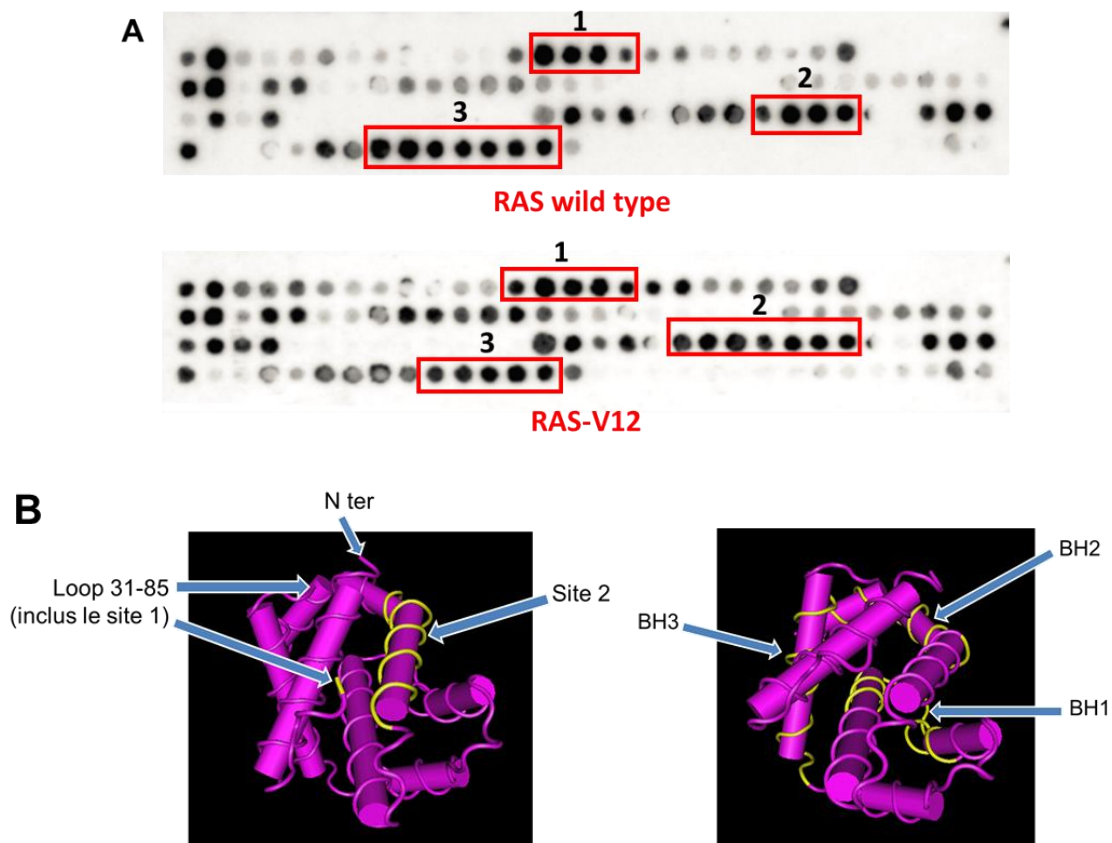
**Figure IX : BCL-xL favorise les interactions de RAS avec son effecteur RAF1**

Les lignées MCF-7 pLVX et pLVX(BCL-xL) sont transfectées par deux plasmides codant RLuc-RBD-RAF1 et eYFP-K-RAS4A, puis cultivées 24 h en absence de SVF, avant ajout d'EGF à t=0 (20 ng / ml) et mesure du BRET. Les résultats présentés correspondent à ceux d'une expérience préliminaire.

## B. Identification des domaines d'interaction entre K-RAS et BCL-xL par une approche de pep-scan

### I. Identification de domaines d'interaction de RAS sur BCL-xL

Des expériences de pep-scan ont été effectuées en vue de déterminer les domaines de liaison de RAS sur BCL-xL d'une part, et d'identifier des peptides inhibiteurs de l'interaction d'autre part. Nous avons pour cela travaillé en collaboration avec le Dr Angelita Rebollo (Université Pierre et Marie Curie, Paris). Des peptides de 12 acides aminés recouvrant toute la séquence de BCL-XL et se chevauchant de 2 acides aminés les uns avec les autres ont été synthétisés sur des membranes de cellulose. Ces membranes sont ensuite incubées avec de la protéine RAS ou RASV12 purifiée. La révélation se fait en utilisant un anticorps primaire dirigé contre RAS, puis un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à un système de détection. Les résultats exposés **figure X** mettent en évidence trois domaines d'interaction de RAS sur BCL-xL. Ces domaines semblent être également ceux impliqués dans la liaison de RASV12 à BCL-xL. La séquence 3 correspond à une séquence transmembranaire, souvent génératrice de bruit de fond dans ce type d'étude. Elle est par conséquent écartée pour la suite de nos investigations.



**Figure X : Identification de domaines d'interaction de RAS sur BCL-xL par pep-scan**

(A) Des peptides de BCL-xL de 12 acides aminés chevauchants de 2 acides aminés ont été synthétisés sur une membrane de cellulose. La membrane a ensuite été incubée en présence de protéines recombinantes RAS ou RASV12 avant révélation au moyen d'un anticorps anti-RAS. Trois domaines d'interactions ont été identifiés (cadres rouges). Les résultats présentés sont issus de deux expériences indépendantes (en collaboration avec le Dr Angelita Rebollo, UPMC, Paris). (B) Les domaines d'interaction de RAS sur BCL-xL identifiés ont été modélisés avec le logiciel Cn3D (en jaune, figure de gauche). Ces sites sont à l'opposé des sites BH1, 2 et 3 (en jaune, figure de droite).

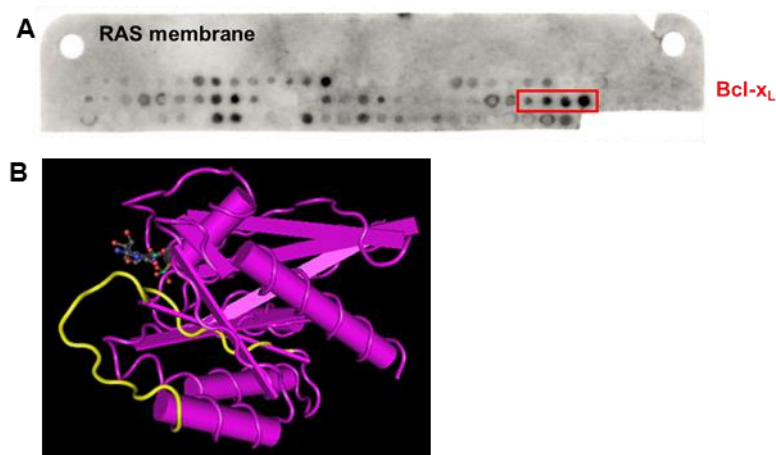
Les données issues d'expériences de pep-scan ont montré que deux séquences de BCL-xL seraient mises en jeu dans la liaison avec RAS. Les quatre domaines BH ainsi que l'intérieur de la poche hydrophobe de BCL-xL ne semblent pas impliqués : les deux sites identifiés (représentés **figure X-B**) se trouvent en position distale par rapport au site de liaison des BH3 de BCL-xL. Le premier site d'interaction identifié, nommé site 1, se situe sur la boucle non structurée de BCL-xL, entre les domaines BH4 et BH3. Le site 2 se situe quant à lui entre les domaines BH3 et BH1. Les zones d'interactions identifiées dans le cadre de ce pep-scan ne correspondent donc pas à des zones d'interaction de BCL-xL avec les membres de la famille de BCL-2 : ceci est en accord avec le fait qu'il n'existe pas de séquence correspondant à un potentiel domaine BH3 dans RAS. De plus, ils ne coïncident pas avec la zone d'interaction engagée par BCL-xL lors de sa liaison avec des

partenaires non canoniques tels que p53 (Ha et al., 2013) ou VDAC1 (Malia and Wagner, 2007). Le site 1 est très proche du BH4 qui a été décrit comme étant un domaine de BCL-2 interagissant avec RAS (Denis et al., 2003). De plus, des résultats préliminaires obtenus en BRET montrent une diminution des signaux lors de l'utilisation de BCL-xL dépourvu de son domaine BH4. Ces deux domaines identifiés lors du pep-scan restent à confirmer en vue du développement potentiel de peptides correspondant à la séquence de BCL-xL et capables d'inhiber les interactions entre RAS et BCL-xL.

## II. Identification de domaines d'interaction de BCL-xL sur RAS

L'approche de pep-scan décrite précédemment a également été utilisée dans le but de déterminer les domaines de liaison de BCL-xL sur RAS et d'identifier des peptides inhibiteurs de cette interaction (**figure XI-A**). Les résultats préliminaires obtenus indiquent que la zone d'interaction de BCL-xL sur RAS est une boucle située à proximité du site de liaison aux nucléotides de RAS et qui s'externalise par rapport à la structure générale relativement globulaire de la protéine (en jaune, **figure XI-B**).

Les effecteurs de RAS (RAF1, PI3K...) ainsi que les protéines régulant l'activité GTPase de RAS (les GAP et les GEF) interagissent via leur RBD avec les régions switch I et switch II de RAS (Pacold et al., 2000, Karnoub and Weinberg, 2008). La région switch I est également nommée « région effectrice ». Le domaine d'interaction de BCL-xL identifié dans le cadre du pep-scan ne correspond pas à ces régions switch I et II. Il ne coïncide pas non plus avec le domaine de liaison aux nucléotides, ni à la région C-terminale de RAS. En se liant à une région proche du site de liaison au GTP de RAS, BCL-xL pourrait modifier l'environnement de RAS aux alentours de ce site, facilitant son activité. Ces résultats seront à confirmer et permettront le développement potentiel de peptides correspondant à la séquence de RAS et capables d'inhiber les interactions entre RAS et BCL-xL.



**Figure XI : Identification de domaines d'interaction de BCL-xL sur RAS par pep-scan**

**(A)** Des peptides de K-RAS de 12 acides aminés chevauchants de 2 acides aminés ont été synthétisés sur une membrane de cellulose. La membrane a ensuite été incubée en présence de protéines recombinantes BCL-xL avant révélation au moyen d'un anticorps anti-BCL-xL. Un domaine d'interaction a été identifié (cadre rouge). Les résultats présentés sont issus d'une expérience préliminaire (en collaboration avec le Dr Angelita Rebollo, UPMC, Paris). **(B)** Modélisation de la structure de K-RAS4A (violet) lié au GDP. Le domaine de liaison de BCL-xL sur K-RAS est représenté en jaune.

## C. Identification de composés inhibiteurs de l'interaction K-RAS / BCL-xL par une approche de criblage

### I. Criblage de la Chimiothèque Nationale Essentielle

L'identification d'inhibiteurs de l'interaction K-RAS/BCL-xL pourrait constituer un outil pertinent d'étude de cette interaction et de ses conséquences fonctionnelles. Dans ce but, nous avons utilisé une approche de criblage d'une banque de molécules chimiques provenant de la Chimiothèque Nationale Essentielle (CNE) sur le modèle d'interaction BRET K-RAS/BCL-xL précédemment décrit. Ce criblage a été effectué au cours de mon Master 2 : par conséquent, toutes les étapes ne seront pas décrites en détails dans cette thèse.

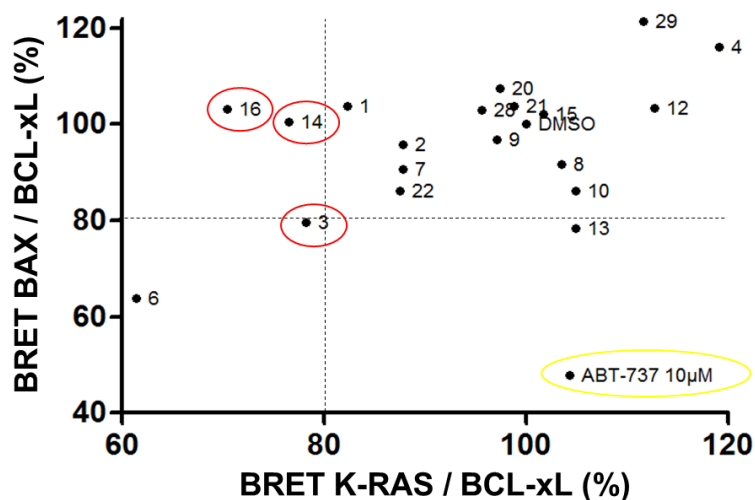
La chimiothèque nationale est un groupement d'intérêt scientifique formé entre le CNRS et 29 établissements d'enseignement supérieur et de recherche. Elle a pour mission de regrouper les collections de produits de synthèse, de composés et d'extraits naturels existant dans les laboratoires publics français et d'en promouvoir la valorisation scientifique et industrielle. 59782 substances composent cette chimiothèque (mise à jour du 12 juin 2015, source : <http://chimiotheque-nationale.cn.cnrs.fr>).



La Chimiothèque Nationale Essentielle est une sous-chimiothèque de 640 substances sélectionnées sur un critère de diversité maximale et conditionnées en plaques 96 puits pour le criblage. Elle constitue un échantillon représentatif de la chimiothèque globale à partir duquel nous avons pu mettre en œuvre une procédure de criblage visant à identifier des inhibiteurs des interactions K-RAS4A/BCL-xL en utilisant le modèle BRET précédemment décrit. Ce criblage a été effectué sans connaître la structure des molécules testées. Les conditions de transfection ont été définies afin d'obtenir un fort pourcentage de cellules transfectées tout en permettant de mesurer un signal BRET stable mais non saturant. Nous avons travaillé avec un signal BRET se trouvant dans la phase ascendante de la courbe de saturation, zone dans laquelle les molécules testées sont susceptibles de pouvoir provoquer la plus importante variation du signal BRET. L'ABT-737 a été utilisé comme molécule contrôle se liant au domaine de liaison des BH3 de BCL-xL. Ce BH3-mimétique diminue l'encombrement stérique de la poche hydrophobe de BCL-xL en entrant en compétition avec les protéines pro-apoptotiques de la famille de BCL-2 pour la liaison à BCL-xL. Un traitement à l'ABT-737 ne diminue pas les interactions K-RAS/BCL-xL (résultats non présentés), ce qui souligne le fait que ce composé n'inhibe pas cette interaction et que la poche hydrophobe de BCL-xL n'est pas impliquée (il n'existe d'ailleurs pas de séquence correspondant à un potentiel domaine BH3 dans RAS). Les résultats du criblage à l'aveugle sur les 640 molécules de la chimiothèque nationale essentielle testées à 10  $\mu$ M nous ont permis de sélectionner 24 molécules parmi lesquelles seules 19 se sont avérées disponibles auprès de la CNE pour de nouveaux tests. Les résultats obtenus avec ces 19 molécules (numérotées de façon arbitraire par souci de confidentialité) sont présentés **figure XII**. Ils confirment l'augmentation du BRET associé à l'interaction en présence d'ABT-737. L'activité luciférase ainsi que la fluorescence de l'eYFP ne sont quant à elles pas modifiées pour de faibles doses d'ABT-737 et pour la plupart des molécules testées (données non présentées). Comme attendu, l'ABT-737 a pour effet d'augmenter le BRET K-RAS / BCL-xL de plus de 10 % et constitue un contrôle positif de l'augmentation du BRET lors du criblage. Parmi les molécules criblées, plusieurs diminuent le signal BRET de plus de 20 % et présentent donc un intérêt potentiel. Ce seuil de 20 %, déterminé empiriquement, restreint la possibilité de retenir des faux positifs. Des travaux similaires de criblages de molécules sur

l'interaction BAX / BCL-xL réalisés au laboratoire ont montré qu'en dessous d'une diminution de 20 %, la significativité du résultat BRET baisse fortement. De façon notable, l'ABT-737, qui est une molécule particulièrement affine pour BCL-2 et BCL-xL diminue l'amplitude de la mesure BRET pour BAX/BCL-xL de « seulement » 40 % (Vo. et al. 2012).

Une expérience de contre-crible a été réalisée afin de déterminer le degré de sélectivité des molécules pour l'interaction K-RAS/BCL-xL. Pour cela, les effets des composés sur le BRET RLuc-BAX/eYFP-BCL-xL ont été évalués (**figure XII**). Le but étant d'écarter par la suite les molécules induisant une diminution du BRET associé à l'interaction BAX/BCL-xL. Ainsi, nous nous sommes particulièrement intéressés aux molécules provoquant une diminution de l'interaction K-RAS/BCL-xL mais n'ayant pas d'effet sur l'interaction BAX/BCL-xL. L'ABT-737 a été utilisé comme molécule contrôle connue pour se lier au domaine de liaison des BH3 de BCL-xL, diminuant ainsi les interactions BAX/BCL-xL. La **figure XII** confirme la diminution du BRET associé à l'interaction BAX/BCL-xL en présence d'ABT-737.



**Figure XII : Sélection de molécules modulatrices de l'interaction K-RAS/BCL-xL suite au criblage par BRET de la Chimiothèque Nationale Essentielle**

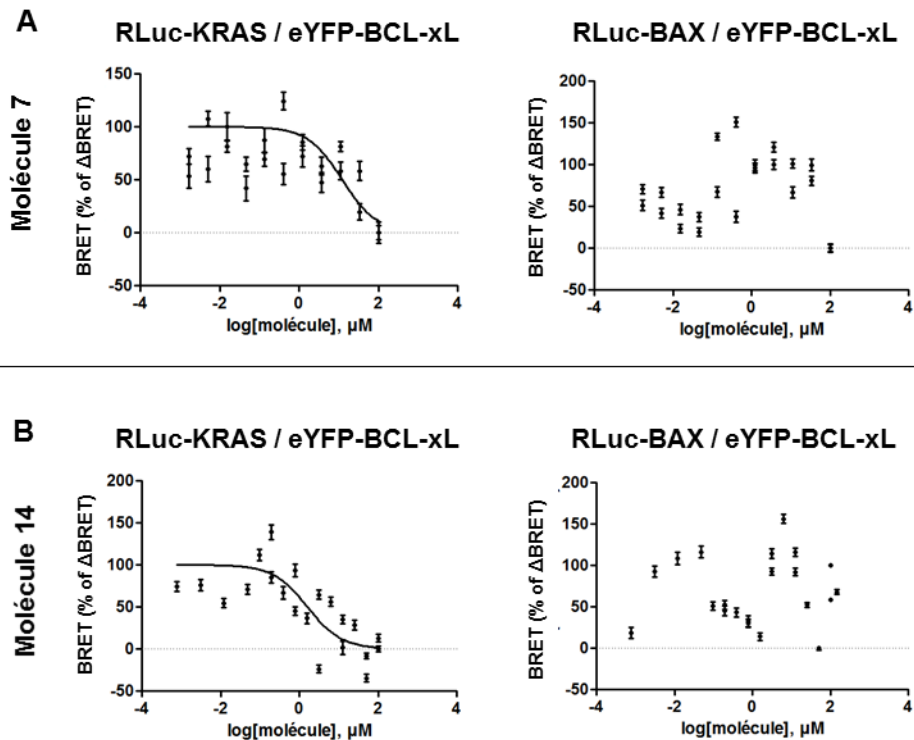
La lignée HeLa a été transfectée par des plasmides codant RLuc-BAX ou RLuc-K-RAS4A et eYFP-BCL-xL. La réponse de composés issus de la CNE est évaluée après 16 h de traitement à 10 µM. Les molécules entourées en rouge ont été sélectionnées comme hits potentiels pour la suite du projet. Le DMSO a été utilisé comme contrôle négatif de variation des BRET mesurés. L'ABT-737 (en jaune) a été utilisé comme contrôle positif de diminution du BRET BAX/BCL-xL.

Le criblage complété de ce contre-criblage nous a permis de déterminer les composés à écarter de notre sélection afin d'avoir le plus de chances possibles

d'identifier une molécule agissant spécifiquement sur le BRET K-RAS/BCL-xL. Ainsi, nous avons éliminé de notre sélection toutes les molécules faisant augmenter ou diminuer le BRET BAX/BCL-xL de plus de 20 %. De même, nous avons éliminé les molécules causant une variation importante de l'activité luciférase et/ou de la fluorescence eYFP (données non présentées). En effet, une forte variation de ces paramètres peut refléter une action des molécules sur la mort cellulaire : une diminution de ces paramètres peut être due à la mort massive des cellules qui sont éliminées lors du lavage précédant la lecture BRET. La lecture se fait alors sur les cellules les plus résistantes restées adhérentes au fond des puits, ce qui biaise les résultats. De plus, une variation importante de ces paramètres peut être reliée à une liaison directe des molécules sur le donneur RLuc ou l'accepteur eYFP, mais ceci reste difficile à évaluer. La prise en compte de tous les critères énoncés ci-dessus suggère que les molécules entourées en rouge sur la **figure XII** seront les plus prometteuses.

## **II. Evaluation du caractère concentration-dépendant de la réponse aux molécules sélectionnées**

Nous avons effectué des expériences de concentration / réponse en BRET sur les 19 molécules représentées **figure XII** afin d'être certains de ne pas écarter des composés potentiellement intéressants mais agissant à de plus fortes concentrations que celles utilisées lors du crible. Pour cela nous avons transfecté des cellules HeLa selon le protocole décrit pour le criblage, avec les couples RLuc-K-RAS4A/eYFP-BCL-xL et RLuc-BAX/eYFP-BCL-xL. Nous avons ensuite traité ces cellules par des concentrations croissantes des molécules d'intérêt (0 à 100  $\mu$ M) pendant 16 h avant mesure du BRET. L'ABT-737 a été utilisé en contrôle positif de diminution concentration-dépendante du BRET BAX / BCL-xL. Les résultats obtenus avec les composés 7 et 14 semblent les plus satisfaisants et sont présentés **figure XIII**.



**Figure XIII : Validation des molécules 7 et 14 comme modulatrices de l'interaction K-RAS/BCL-xL**

La lignée HeLa a été transfectée par des plasmides codant RLuc-BAX ou RLuc-K-RAS4A et eYFP-BCL-xL. La réponse aux composés 7 (A) et 14 (B) issus de la CNE est évaluée après 16 h de traitement par des doses croissantes de molécules.  $\Delta$ BRET = BRETmax (mesuré dans la condition contrôle) – BRETmin (mesuré à la plus forte concentration de traitement).  $4,26 \mu\text{M} < EC_{50}(\text{molécule } 7) < 36,05 \mu\text{M}$  ;  $0,59 \mu\text{M} < EC_{50}(\text{molécule } 14) < 4,43 \mu\text{M}$ . Les résultats présentés sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

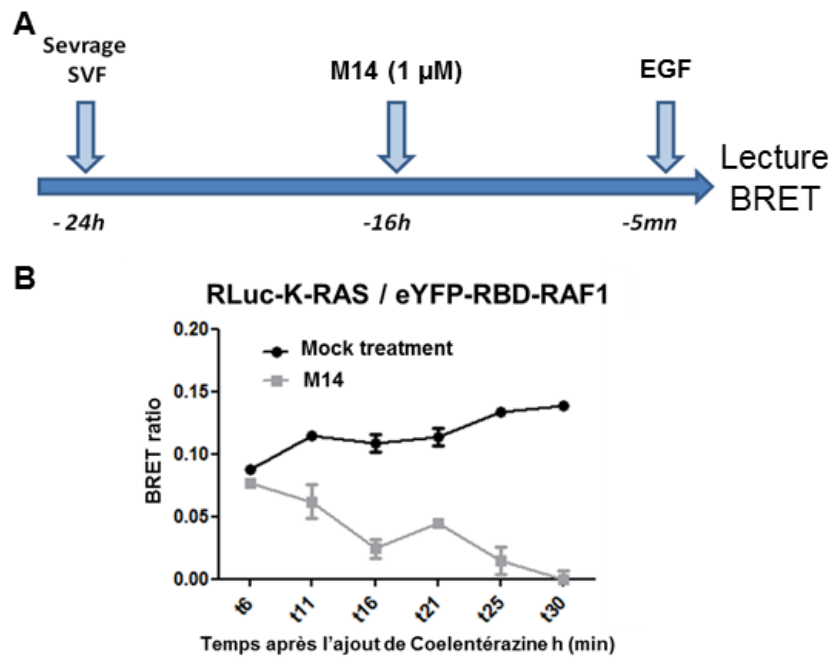
Ces deux composés diminuent le BRET K-RAS/BCL-xL de façon dose-dépendante sans affecter le BRET BAX/BCL-xL. Des  $EC_{50}$  sur le BRET K-RAS/BCL-xL ont été déterminés à partir de ces courbes :  $4,26 \mu\text{M} < EC_{50}(\text{molécule } 7) < 36,05 \mu\text{M}$  ;  $0,59 \mu\text{M} < EC_{50}(\text{molécule } 14) < 4,43 \mu\text{M}$ . Par la suite nous avons fait le choix de nous focaliser sur l'étude fonctionnelle des effets de la molécule 14, qui semble la plus affine pour l'interaction K-RAS/BCL-xL.

### III. Validation fonctionnelle de la molécule 14

Nous avons réalisé différents tests cellulaires dans le but de caractériser les effets moléculaires de la molécule 14 (M14) sur la signalisation induite par RAS ainsi que les effets fonctionnels de ce composé sur les processus participant au développement tumoral. La finalité de ces travaux étant de valider M14 comme composé d'intérêt, modulateur de l'interaction K-RAS/BCL-xL.

**a. La molécule 14 modifie la capacité de K-RAS à interagir avec ses effecteurs**

Nous avons procédé à des expériences utilisant des techniques de BRET avec un senseur d'activité RAS : RBD-RAF1 (RAS Binding Domain of RAF1). Les cellules sont transfectées avec deux vecteurs codant RLuc-RBD-RAF1 et eYFP-K-RAS, lavées puis cultivées dans un milieu sans SVF 24 h (afin de maintenir RAS dans un état non activé). Le BRET est mesuré pendant 30 min, après traitement par M14 suivi d'une stimulation à l'EGF (Epithelial Growth Factor) permettant d'activer RAS. Les résultats présentés **figure XIV** montrent que M14 module la capacité de K-RAS à interagir avec son effecteur RAF1 lorsque K-RAS est activé. Bien que le BRET de référence (mesuré à t6) soit de même intensité en présence ou en absence de M14, on observe une diminution du signal dès t11 en présence de M14, alors que le signal tend légèrement à augmenter dans la condition contrôle. Le fait que le BRET soit d'intensité équivalente dans les deux conditions lors de la première mesure indique que M14 n'empêche pas l'interaction entre le donneur et l'accepteur. Cependant, bien qu'une activation de RAS par l'EGF aboutisse à une augmentation du BRET au cours du temps (reflétant une meilleure capacité de RAS à interagir avec le RBD de RAF1), une diminution du BRET au cours des mesures est observée en présence de M14. Ainsi, M14 serait capable de lier le domaine de RAS décrit pour interagir avec ses effecteurs, ce qui indique qu'on ne peut pas exclure que M14 puisse avoir un effet indirect sur l'interaction RAS/BCL-xL. Ce domaine serait davantage exposé dans un RAS activé, ce qui expliquerait un effet de M14 observé au cours du temps suite à la stimulation de RAS par l'EGF. Une autre hypothèse serait que le site de liaison de M14 soit formé au cours de l'interaction entre RAS et RBD-RAF1 et nécessite donc les deux protéines. L'effet de M14 sur l'interaction entre RAS et BCL-xL serait alors dépendant de la liaison de RAS à RAF1.

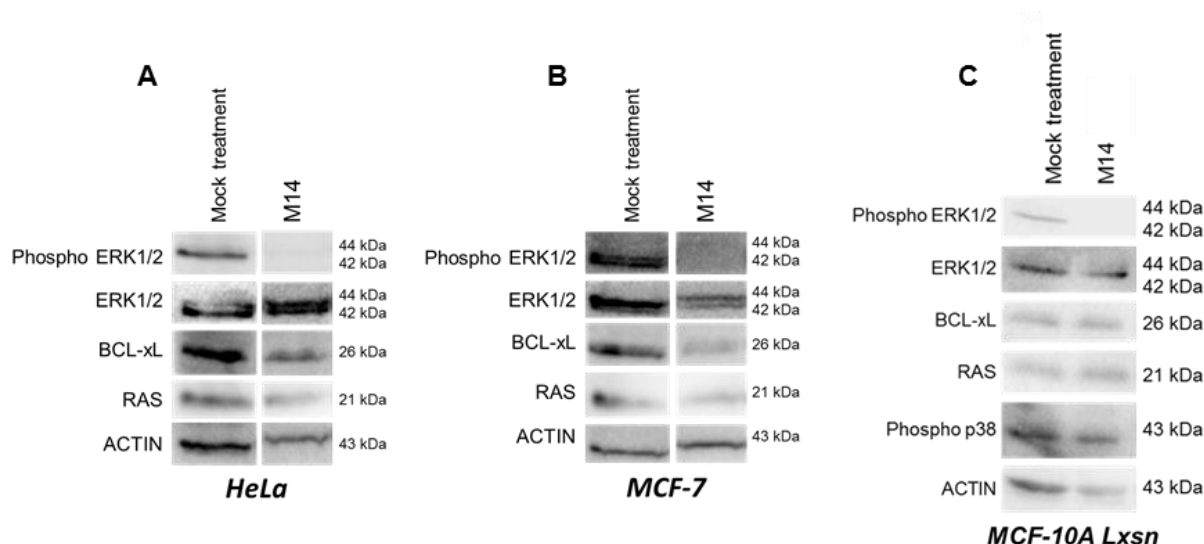


**Figure XIV : La molécule 14 module la capacité de K-RAS à interagir avec son effecteur RAF1**

La lignée Hela est transfectée par des plasmides codant RLuc- RBD-RAF1 et eYFP- K-RAS4A puis traitée selon le plan décrit en (A), avant lecture du BRET (B). M14, Molécule 14. Coelenterazine h, substrat de RLuc. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

**b. La molécule 14 module la voie de signalisation RAF1-MEK-ERK**

La modulation de la liaison de RAS à son effecteur RAF1 par M14 suggère un effet possible de ce composé sur la voie de signalisation RAF1-MEK-ERK. Afin de valider cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de western blot dans différentes lignées cellulaires : HeLa (lignée cancéreuse utérine), MCF-7 (lignée cancéreuse mammaire) et MCF-10A Lxsn (lignée de cellules épithéliales mammaires non transformées). Les résultats présentés **figure XV** montrent une diminution de la phosphorylation de ERK1, ERK2 et p38 sous traitement par la M14, ce qui corrèle avec une diminution de l'activation de la voie RAF1-MEK-ERK par M14 via son effet modulateur de l'interaction RAS/RAF1.

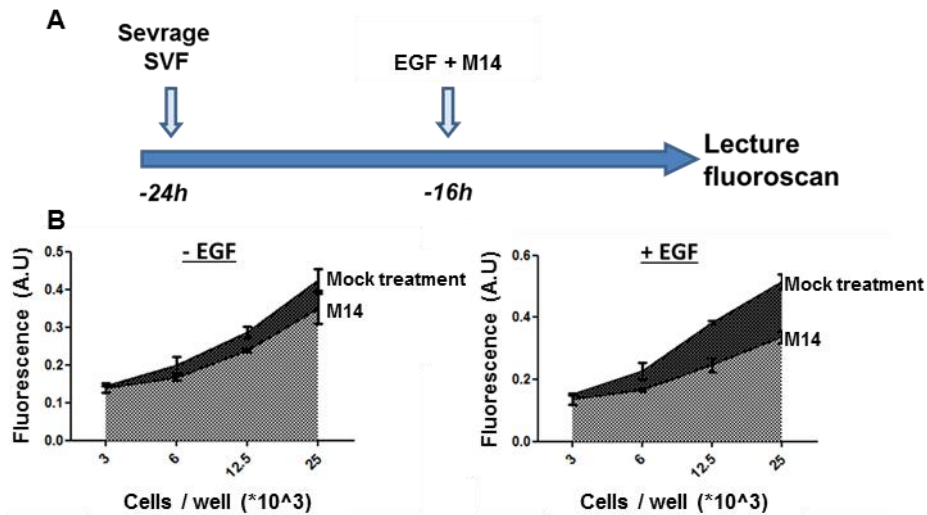


**Figure XV : La molécule 14 module la voie de signalisation RAF1-MEK-ERK induite par RAS**

Les lignées HeLa (A), MCF-7 (B) et MCF-10A Lxsn (C) ont été traitées par la molécule 14 (M14) pendant 16 h à 5  $\mu$ M (A et B) ou à 1  $\mu$ M (C) avant analyse de leurs lysats protéiques par western blot. Les western blots présentés sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

### c. La molécule 14 affecte la prolifération cellulaire

La voie RAF1-MEK-ERK est impliquée dans de nombreux processus incluant la prolifération. Nous avons donc déterminé l'effet de M14 sur la prolifération cellulaire en utilisant un test basé sur la mesure de fluorescence Uptiblué (Uptima). Pour cela nous avons cultivé la lignée HeLa en absence de SVF puis traité ces cellules avec M14 combinée ou non avec une stimulation par l'EGF. Nous avons ainsi mis en évidence que la M14 diminue la capacité des cellules à proliférer (figure XVI), et que cet effet est dépendant du statut d'activation de RAS. En effet, nous observons que M14 affecte la prolifération cellulaire uniquement lorsque les cellules sont traitées par de l'EGF, donc lorsque RAS est activé et interagit davantage avec ses effecteurs et avec BCL-xL (en corrélation avec les résultats BRET entre RBD-RAF1 et RAS présentés figure XIV).



**Figure XVI : La molécule 14 diminue la prolifération cellulaire**

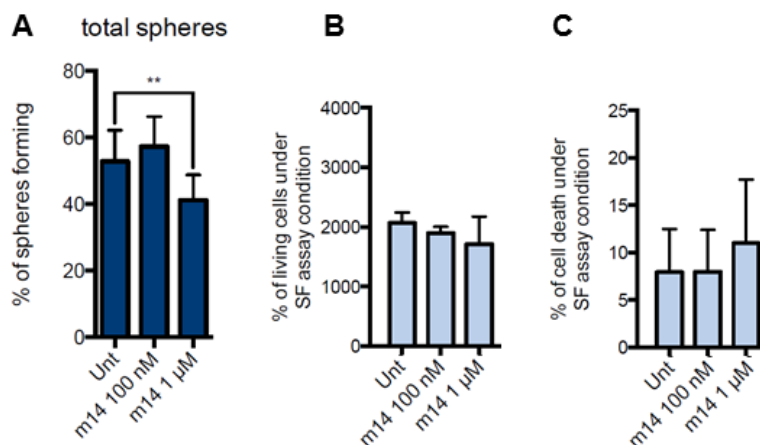
La lignée HeLa est cultivée en présence de 10 % de SVF, sevrée ou non 24h, puis stimulée 16h à l'EGF (20 ng/ml) et par M14 (1  $\mu$ M) selon le plan décrit en (A) avant incubation avec le réactif Uptiblue (30 min à 37°C) et lecture de la fluorescence au fluoroscan (B). Les résultats présentés sont la moyenne de deux expériences indépendantes.

**d. La molécule 14 diminue la capacité de cellules mammaires isolées à former des sphères**

Au laboratoire, le Dr Sophie de Carné a mis en évidence un rôle de BCL-xL dans le maintien de cellules souches cancéreuses, par son action sur des voies induites par RAS (manuscrit en cours d'écriture). Le pourcentage de cellules capables d'initier la formation d'une tumeur, appelées Cellules Souches Cancéreuses (CSC) ou Cellules Initiatrices de Cancer (CIC) peut être évalué au sein d'une population cellulaire par la réalisation d'un test de croissance de cellules isolées en conditions de faible adhérence. Ce test a permis de mettre en évidence une diminution de la capacité de cellules mammaires isolées à former des sphères en condition de culture de faible adhérence sous traitement M14 (figure XVII-A). Ces expériences ont été réalisées en utilisant la lignée mammaire MCF-10A non cancéreuse, transformée par le virus Lxsn K-RASV12. Ainsi, ces cellules qui surexpriment la forme mutée K-RASV12 ont un phénotype mésenchymal et forment spontanément des sphères. Après avoir observé que M14 ne modifie pas la prolifération des cellules en culture 3D (figure XVII-B) et n'induit pas de mort massive dans ces mêmes conditions (figure XVII-C), nous avons confirmé que la diminution du pourcentage de cellules formant des sphères sous traitement M14 est



due à une altération de la capacité intrinsèque de ces cellules à former des sphères. Via son effet sur l'interaction RAS/BCL-xL et sur la diminution de la signalisation RAS, M14 contribue à atténuer le caractère souche de cellules cancéreuses.



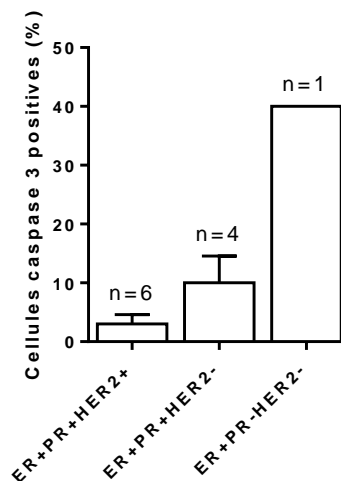
**Figure XVII : La molécule 14 diminue la capacité de cellules mammaires isolées à former des sphères**

(A) Les cellules de la lignée MCF-10A Lxsn K-RASV12 individualisées sontensemencées en conditions de faible adhérence puis traitées par la molécule 14 (m14) ou non (unt) une semaine avant comptage des sphères formées. La prolifération (B) et la mort cellulaire (C) dans ces mêmes conditions ont été évaluées. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences menées de façon indépendante. SF : *Sphere Forming*. (Expériences réalisées par Dr Sophie De Carné).

#### e. Certaines tumeurs mammaires sont sensibles à la molécule 14 ex-vivo

Les résultats encourageants obtenus avec M14 sur des lignées cellulaires en culture nous ont poussés à tester ce composé ex vivo, sur des tranches de tumeurs mammaires. Des prélèvements de carcinomes mammaires invasifs obtenus en collaboration avec l'Institut de Cancérologie de l'Ouest ont été pris en charge par le Dr Céline Séveno afin d'être découpés en tranches de 250 µm d'épaisseur environ puis mis en culture pendant 48 h en présence de M14. Les tranches ont ensuite été fixées et envoyées au Dr Delphine Loussouarn pour un marquage anti-CASPASE 3 active (reflet de la mort cellulaire) et une analyse anatomopathologique. Ainsi, M14 a été testée sur 11 échantillons issus de patientes ayant des profils d'expression des récepteurs hormonaux différents (**figure XVIII**). Ces premiers résultats suggèrent que les tumeurs triple-positives (= exprimant les trois types de récepteurs hormonaux : récepteurs aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR) et les récepteurs HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor-2)) ne sont pas sensibles à un traitement en agent simple par M14. En revanche, l'absence d'expression de HER2 accompagnée ou non de celle des PR est corrélée à

l'induction de la mort de plus de 10 % des cellules. Les récepteurs HER2 sont des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase dont l'activation aboutit à notamment à celle de RAS. Les PR sont des récepteurs intra-cellulaires dont l'activation conduit à celle de la voie RAS et à l'augmentation de la transcription de gènes cibles. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus précédemment : nous aurions pu nous attendre à une meilleure réponse à M14 des cellules exprimant les récepteurs hormonaux. Cependant, le statut d'activité RAS (mutations de RAS, de RAF1, de protéines GAP etc.) n'a pas été déterminé pour ces tranches. De plus, il faut souligner que même si une voie aboutissant à l'activation de RAS est invalidée dans une tumeur, des mécanismes de compensation peuvent exister et contribuent au développement tumoral.



**Figure XVIII : Certaines tumeurs mammaires répondent à un traitement ex vivo par la molécule 14**

Des tranches de tumeurs mammaires ont été traitées par M14 à 1  $\mu$ M pendant 48 h avant d'être fixées, marquées par un anticorps anti-CASPASE 3 clivée puis analysées. Le marquage est exprimé en fonction du profil d'expression des récepteurs aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR) et des récepteurs HER2 dans les tranches de tumeurs (expériences réalisées par Dr Céline Séveno et Dr Delphine Loussouarn).

Au cours de l'analyse anatomo-pathologique, d'autres paramètres ont été étudiés tels que le grade des tumeurs, leur type histologique ou encore le nombre de ganglions envahis, mais aucune corrélation n'a pu être établie entre ces paramètres et la réponse à M14 (données non présentées).



## ***Discussion***

L'oncogène RAS possède des mutations activatrices dans 30% des cancers. Ces mutations compromettent la fonction GTPase intrinsèque de la protéine, la rendant constitutivement active. Les réponses biologiques qui en découlent sont variées : certaines favorisent l'oncogenèse (prolifération, dédifférentiation), alors que d'autres (sénescence, apoptose) limitent ce potentiel oncogénique et doivent être surpassées pour que le cancer se développe. RAS s'associe avec des membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 par un mécanisme peu connu, mais qui influence la survie cellulaire (Bivona et al., 2006).

### **A. K-RAS interagit avec BCL-xL en cellule entière vivante**

Afin d'étudier les interactions K-RAS/BCL-xL ainsi que leurs conséquences biologiques, nous avons développé un modèle d'étude basé sur la technologie de Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). Nous avons choisi d'orienter nos travaux sur le couple K-RAS/BCL-xL : K-RAS est l'isoforme de RAS la plus fréquemment mutée dans les cancers (Baines et al., 2011) et BCL-xL est un homologue de BCL-2 connu pour être surexprimé dans de nombreux cancers. Nous avons testé les couples K-RAS4A/BCL-xL et K-RAS4B/BCL-xL dans des expériences de saturation BRET afin de comparer les interactions entre BCL-xL et ces deux isoformes de RAS. Les amplitudes de signaux obtenues ont permis de définir des courbes de régression saturables pour de fortes quantités d'accepteur exprimées, ce qui correspond à des profils d'interactions spécifiques (Pfleger et Eidne, 2006). Le transfert d'énergie entre le donneur RLuc et l'accepteur eYFP requiert une distance inférieure ou égale à 10 nm entre ces deux acteurs. Même si cette distance est considérée comme suffisamment faible pour être assimilée à celle d'une interaction protéine/protéine, le BRET ne nous donne pas la certitude absolue que l'interaction se fasse de façon directe. Des expériences acellulaires à partir de protéines recombinantes purifiées (pull down, résonance plasmonique de surface) permettraient de clarifier ce point. L'interaction entre K-RAS et BCL-xL semble toutefois spécifique, saturable et non diminuée par l'ABT-737 qui est un inhibiteur des interactions entre BCL-xL et les protéines pro-apoptotiques de la famille de BCL-2. Cette réponse est également observée pour l'interaction K-RASV12 / BCL-xL.

Le signal BRET associé à l'interaction K-RAS4B/BCL-xL est plus faible que celui associé à l'interaction K-RAS4A/BCL-xL : les domaines de liaison à BCL-xL de ces deux isoformes pourraient présenter des différences. Ces 2 isoformes de RAS possèdent 90 % d'homologie au niveau de leurs séquences en acides-aminés : les différences se trouvent au niveau de la région hyper-variable présente en C-terminal, lieu de modifications post-traductionnelles régulant la localisation sub-cellulaire de RAS. Des différences de structure de cette région C-terminale pourraient expliquer les différences de signaux BRET mesurés. Ce résultat sera difficile à confirmer par co-immunoprécipitation car les anticorps commercialement disponibles reconnaissant différenciellement chaque isoforme fonctionnent mal en immunoprécipitation. Il pourra être confirmé par des approches acellulaires de résonance plasmonique de surface, permettant d'évaluer les interactions entre protéines purifiées. De plus, des différences d'adressage membranaire de ces deux isoformes (Tsai et al., 2015) pourraient également expliquer ces variations de transfert d'énergie.

Le modèle d'interaction BRET entre K-RAS et BCL-xL a nécessité la vérification des niveaux d'expression des protéines de fusion RLuc-K-RAS et eYFP-BCL-xL dans les cellules par western blot. De précédents résultats issus de l'étude du couple BRET RLuc-BAX/eYFP-BCL-xL ont montré que la transfection d'eYFP-BCL-xL dans les cellules protège d'une mort induite par PUMA (protéine pro-apoptotique de la famille de BCL-2), preuve que la fonction de BCL-xL est conservée malgré la fusion avec l'eYFP. Un modèle BRET d'activité RAS utilisant RBD-RAF1 a permis de confirmer la fonctionnalité de RLuc-K-RAS dans les cellules. La seule observation d'un signal BRET mesurable ne suffit cependant pas à confirmer la spécificité d'une interaction. Aussi, l'utilisation de techniques d'immuno-précipitation a été nécessaire pour spécifier l'interaction entre RLuc-K-RAS et eYFP-BCL-xL. La co-immunoprécipitation de K-RAS et BCL-xL a révélé que ces protéines interagissent bien dans les cellules HeLa.

K-RASV12 est une forme mutée de K-RAS liée au GTP et constitutivement active. Elle est essentiellement associée à la membrane plasmique. La baisse de signal BRET observée avec le couple K-RASV12 / BCL-xL (versus le couple K-RAS non muté / BCL-xL) s'expliquerait par une différence de localisation entre K-RAS et

K-RASV12. Ceci est renforcé par le fait que le traitement de cellules par la bryostatine-1, un agoniste de la PKC relocalisant K-RASV12 aux membranes des organites (Bivona et al., 2006) nous a permis de visualiser une augmentation du BRET K-RAS4AV12/BCL-xL (résultats préliminaires). L'utilisation de techniques telles que la résonance plasmonique de surface et le FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) préciserait le travail portant sur les différences d'affinités entre K-RAS et BCL-xL liées à la présence de la mutation V12. En 2006, l'équipe de Mark Philips (Bivona et al., 2006) a montré une localisation mitochondriale de l'interaction K-RASV12G/BCL-xL par une étude de colocalisation en microscopie confocale. Le FLIM, qui est une technique spécialement adaptée à ce type d'approche, permettra de développer ce point particulier. En effet, les deux protéines ont diverses localisations cellulaires décrites : cytosol, membrane plasmique, membranes des organites (mitochondries, RE, MAM, golgi, noyau). Il paraît important d'identifier la (ou les) localisation(s) de l'interaction afin de déterminer dans quelles mesures la compartimentation cellulaire de RAS (Aran and Prior, 2013) dépendante de l'interaction avec BCL-xL pourrait orienter la réponse cellulaire en faveur de processus initiateurs de la transformation. L'utilisation en BRET de mutants de BCL-xL uniquement cytosoliques (comme BCL-xL  $\Delta$ C, forme dépourvue de son extrémité C-terminale) ou uniquement membranaires permettra d'éclaircir ce point.

## **B. Identification de domaines d'interaction par une approche de pep-scan**

Les travaux de pep-scan réalisés en collaboration avec le Dr Angelita Rebollo (UPMC, Paris) ont permis d'identifier des sites d'interactions de RAS sur BCL-xL, et de BCL-xL sur RAS d'une part, et d'amorcer le développement de peptides inhibiteurs de cette interaction utilisables comme outil d'étude d'autre part. Ainsi, les résultats obtenus en pep-scan suggèrent que BCL-xL module l'activité de RAS en se liant directement à lui car ces études sont réalisées avec des peptides et des protéines purifiés. Ce travail a permis de montrer que RAS et RASV12 sont capables d'interagir avec deux domaines de BCL-xL ne correspondant pas à des domaines connus d'interaction de BCL-xL avec les autres protéines de la famille de BCL-2. En effet, les quatre domaines BH, dont trois sont situés à l'intérieur de la poche hydrophobe de BCL-xL ne semblent pas impliqués, ce qui corrèle avec l'absence de

domaine consensus BH3 dans RAS. De plus, les domaines identifiées ne coïncident pas avec la zone d'interaction engagée par BCL-xL lors de sa liaison avec des partenaires non canoniques décrits tels que p53 (Ha et al., 2013) ou VDAC1 (Malia and Wagner, 2007). Ces domaines se situent dans la région non structurée de BCL-XL (entre les domaines BH4 et BH3), et entre les domaines BH3 et BH1.

L'étude des domaines d'interaction de BCL-xL sur RAS a permis de montrer que BCL-xL semble interagir avec une boucle située à proximité du site de liaison aux nucléotides de RAS et qui s'externalise par rapport à la structure générale relativement globulaire de la protéine. Ce domaine ne correspond pas aux sites de liaison de RAS avec ses effecteurs précédemment décrits. En effet, les effecteurs de RAS (RAF1, PI3K...) ainsi que les protéines régulant l'activité GTPase de RAS (les GAP et les GEF) interagissent via leur RBD avec deux régions, switch I et switch II de RAS (Pacold et al., 2000, Karnoub and Weinberg, 2008). Le domaine d'interaction de BCL-xL identifié dans le cadre du pep-scan ne correspond ni à ces régions switch I et II, ni au domaine de liaison du GDP/GTP, ni à la région C-terminale de RAS.

La mesure des interactions entre RAS et des formes de BCL-xL mutées au niveau des séquences d'interaction identifiées, d'une part, et la mesure des interactions entre BCL-xL et des formes de RAS mutées au niveau des séquences d'interaction identifiées, d'autre part, permettra de confirmer ou non ces sites. Par la suite, le développement de peptides inhibiteurs cell-perméants correspondant aux séquences validées pourra être engagé, tout comme c'est déjà le cas pour l'inhibition de l'interaction CASPASE9/PP2A (Arrouss et al., 2013). Ce travail, effectué en contexte de cellule entière vivante permettra la prise en compte des modifications post-traductionnelles dont le rôle est crucial pour les interactions protéine/protéine.

## **C. Identification de composés inhibiteurs de l'interaction K-RAS/BCL-xL par une approche de criblage**

### **I. Effets de M14 sur les fonctions de RAS**

Les effets du composé M14 identifié lors du criblage de la CNE sur les fonctions de RAS ont été évalués en utilisant un modèle de senseur d'activité RAS, basé sur la mesure du BRET entre R-Luc-K-RAS et eYFP-RBD-RAF1. Nous avons

ainsi montré qu'une diminution des interactions RAS/BCL-xL par M14 est capable de diminuer les interactions entre K-RAS et RBD lorsque nous procédons à une activation de K-RAS. M14 serait donc capable de se lier davantage à RAS sous sa conformation active. Le domaine de liaison des effecteurs de RAS serait davantage exposé dans un RAS activé et changerait de conformation en présence de M14, diminuant les interactions RAS/RBD-RAF1 au cours du temps suite à la stimulation par l'EGF. Ces effets sont à confirmer par l'utilisation d'autres modèles de senseurs d'activité RAS tels que RBD-PI3K, mais aussi de protéines entières : RAF1 et PI3K notamment, qui sont les effecteurs les mieux décrits de RAS. De plus, il n'est pas à exclure que BCL-xL puisse interagir directement avec les effecteurs de RAS, dont RAF1 (Wang et al., 1994), afin de moduler l'activité de cet oncogène. Des études réalisées avec des modèles BRET tels que BCL-xL/RAF1 permettraient d'éclaircir ce point.

L'effet de M14 sur l'interaction de RAS avec son effecteur RBD-RAF1 nous a mené à étudier l'impact d'un traitement par ce composé sur la voie de signalisation RAF1-MEK-ERK. Nous avons ainsi montré que M14 diminue les niveaux de phosphorylation de ERK1, ERK2 et p38, coïncidant avec la diminution des interactions K-RAS/RBD-RAF1 mesurée en BRET. Afin de poursuivre ces investigations, il serait intéressant d'évaluer la réponse d'autres voies induites par RAS à un traitement par M14 telles que celles engagées par la PLC ou la PI3K, une inhibition concomitante de ces deux voies ayant été décrite comme efficace dans le traitement de certains cancers du poumon portant des mutations activatrices de RAS et de PI3K (Engelman et al., 2008). L'équipe de Mark Philips a montré en 2006 qu'une phosphorylation de K-RASV12 par la PKC (activée par la voie RAS-PLC) induit une relocalisation de l'oncogène à la mitochondrie où il interagit avec BCL-xL. Dans cette optique, il serait intéressant de déterminer l'impact d'un traitement M14 sur le degré de phosphorylation de la PKC. Un autre travail a montré que la voie PI3K agit en synergie avec BCL-xL pour réguler la mort cellulaire (Qian et al., 2009). Ainsi, l'inhibition de la PI3K combinée à celle de BCL-xL induit la mort cellulaire. Dans ce contexte, il serait intéressant de déterminer le résultat d'une inhibition des interactions RAS/BCL-xL sur la phosphorylation d'AKT, une kinase effectrice de la voie PI3K.



Nous avons montré que M14 diminue la prolifération cellulaire de façon dépendante du statut d'activation de RAS. Ceci appuie l'hypothèse selon laquelle RAS sous sa forme activée interagit davantage avec BCL-xL (Bivona et al., 2006). L'inhibition de cette interaction par M14 dans ces conditions affecte donc la prolifération cellulaire. Ceci est probablement relié à l'inhibition des interactions entre RAS et RAF1 accompagnée d'une diminution des phosphorylations des protéines effectrices de cette voie. Nous nous sommes également intéressés à l'action de M14 sur la capacité de cellules mammaires isolées à former des sphères en condition de faible adhérence. Ces expériences ont montré une diminution du pourcentage de cellules capables de former des sphères en présence de M14, ce qui correspond à une diminution du nombre de cellules ayant des caractéristiques de cellules initiatrices de cancer. Ceci est en accord avec des travaux menés au laboratoire par le Dr Sophie De Carné, montrant un rôle de BCL-xL dans le maintien de cellules initiatrices de cancer par une modulation des voies induites par RAS (manuscrit en cours d'écriture).

## **II. Effets de M14 sur les fonctions de BCL-xL ?**

L'impact de M14 sur les fonctions de BCL-xL a dans un premier temps été évalué lors du criblage, par mesure du BRET BAX/BCL-xL, M14 ne modifiant pas la capacité de RLuc-BAX à interagir avec eYFP-BCL-xL. Des tests de M14 sur d'autres interactions mettant en jeu BCL-xL et des membres pro-apoptotiques de la famille de BCL-2 permettront d'évaluer plus finement les effets potentiels de M14 sur BCL-xL. Des tests de mort in vitro et ex vivo ont mis en évidence une induction de la mort cellulaire sous traitement prolongé par M14. In vitro (résultats non présentés), M14 est capable d'induire la mort de diverses lignées cellulaires mammaires, utérines et colorectales portant ou non des mutations de K-RAS, suggérant un rôle de l'interaction RAS/BCL-xL dans le maintien de la survie cellulaire. Cependant, d'autres travaux ont mis en évidence un rôle de cette interaction dans l'induction de la mort cellulaire (Bivona et al., 2006), illustrant la multiplicité des rôles exercés par RAS et BCL-xL. Deux dérivés de M14 obtenus suite au criblage (nommés M14(1) et M14(2)) ont donné des résultats similaires. Une surexpression de BCL-xL semble cependant protéger en partie de cette mort (résultats obtenus en comparant la mort sous traitement M14 dans des lignées MCF-7 surexprimant ou non BCL-xL). Afin de

vérifier si la mort induite est dépendante de BCL-xL, il serait intéressant de tester M14 en combinaison d'approches de surexpression ou d'extinction des anti-apoptotiques BCL-xL, BCL-2 et MCL-1. Ex vivo, M14 est capable de tuer des cellules de carcinomes mammaires invasifs n'exprimant pas de récepteurs HER2 ni de récepteurs à la progestérone. Le rôle de ces récepteurs étant notamment d'activer RAS, il serait intéressant de déterminer le statut d'activité de RAS des tumeurs (mutations de RAS, RAF1, de GAPs etc.) afin d'évaluer leur dépendance à RAS malgré l'absence d'expression des récepteurs HER2 et PR. De plus, un traitement combinant M14 et le Tamoxifène (molécule ciblant les récepteurs aux œstrogènes (ER), exprimés dans les cellules sensibles à M14) pourrait permettre d'augmenter les réponses observées.

### **III. Poursuite du développement de M14 ?**

Nous avons contacté la chimiothèque nationale afin d'identifier les structures chimiques des molécules sélectionnées et de pouvoir formuler des hypothèses de relation structure/activité. Les laboratoires ayant produit les molécules d'intérêt nous ont fourni deux dérivés de M14 que nous avons testés : M14(1) et M14(2). Les premières expériences menées avec ces dérivés ont montré des effets de M14(1) en BRET similaires à ceux obtenus avec M14, alors que ce n'est pas le cas pour M14(2). De plus, ces premiers résultats montrent que M14 et M14(1) diminuent le BRET associé aux interactions K-RAS4A/BCL-xL, K-RAS4A V12/BCL-xL et K-RAS4B/BCL-xL. Il sera essentiel de déterminer si ceci est aussi valable pour le couple K-RAS4B V12/BCL-xL. L'idéal serait d'obtenir une molécule diminuant les interactions K-RASV12/BCL-xL sans affecter les interactions K-RAS non muté/BCL-xL (Ostrem et al., 2013). Nous aurions ainsi un outil d'étude nous permettant de pouvoir étudier les conséquences d'une diminution d'interactions entre K-RAS/BCL-xL dans des cellules cancéreuses possédant une protéine K-RAS mutée, constitutivement active. Suite à l'obtention de l'ensemble des résultats présentés, nous avons pris la décision d'arrêter de la caractérisation fonctionnelle des effets de M14, dans l'attente d'une étude de brevetabilité par la SATT (Société d'Accélération du Transfert de Technologies).

## D. Conclusion

Ce projet de thèse a eu pour but d'étudier l'interaction K-RAS/BCL-xL en développant deux approches différentes : criblage d'inhibiteurs potentiel et identification de domaines d'interactions par pep-scan. L'approche basée sur le criblage de la CNE a montré des résultats encourageants mais s'avère limitée du fait du manque d'études structurales du couple K-RAS/BCL-xL réalisées en présence de M14. Ainsi, des essais de résonance plasmonique de surface couplés à une modélisation de l'interaction en présence de M14 nous permettraient de confirmer ou non une liaison directe de M14 à RAS et/ou à BCL-xL et de pouvoir améliorer le design de cette molécule afin d'en augmenter la spécificité. Ces études de structure nous indiqueraient également si les sites ciblés par M14 correspondent ou non aux domaines de liaisons de RAS à BCL-xL identifiés lors du pep-scan. L'approche de pep-scan exposée dans ce projet semble quant à elle prometteuse. Elle nous a fourni de précieuses indications concernant les domaines d'interaction de RAS sur BCL-xL, et de BCL-xL sur RAS. La potentielle validation future de ces domaines amorcerait le développement de peptides inhibiteurs cell-perméants.

L'utilisation d'inhibiteurs de l'interaction K-RAS / BCL-xL permettra de mieux définir les bases moléculaires et les conséquences cellulaires de ces associations, tant du point de vue de l'apoptose que celui de la fonctionnalité de la voie RAS. La poursuite de leur développement conduira à définir les événements qui jouent un rôle crucial dans la propagation des cellules cancéreuses possédant une voie de signalisation RAS active. Ceci est d'autant plus important que BCL-xL joue un rôle de maintien des cellules initiatrices de cancer (qui sont responsables de la formation de métastases ou de rechutes), en modulant la signalisation RAS (de Carné et al., en préparation). Bien que l'utilisation de peptides cell-perméants soit encore peu développée en clinique, une étude a déjà montré les effets bénéfiques de l'administration de peptides ciblant l'interaction CASPASE-9/phosphatase PP2A. Ce peptide inhibiteur déclenche la mort CASPASE-9-dépendante de nombreuses lignées cellulaires ainsi que l'inhibition de croissance tumorale in vivo de xénogreffes de cancers pulmonaires et mammaires (Arrouss et al., 2013). Le développement de tels peptides ciblant spécifiquement l'interaction K-RAS/BCL-xL pourrait donc être envisagé à terme en clinique.

## ***Conclusion générale***

BCL-xL est une protéine fréquemment surexprimée dans les cancers et impliquée dans leur résistance aux chimiothérapies (Minn et al., 1995). Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur deux projets de recherche étudiant les mécanismes de dépendance des cellules cancéreuses à BCL-xL pour leur survie :

Mon premier projet a montré que la capacité des BH3-mimétiques à inhiber efficacement BCL-xL est limitée par le fait qu'une surexpression de cette cible permet la survie cellulaire en favorisant des interactions PUMA/BCL-xL fortes et insensibles à ces composés. Ceci a d'importantes conséquences pour la mise en place de stratégies thérapeutiques combinant l'utilisation de chimiothérapies induisant l'expression de PUMA et celle de BH3-mimétiques. Ainsi, le développement de nouvelles molécules capables d'inhiber spécifiquement ces interactions réfractaires aux BH3-mimétiques semble requis pour le ciblage complet de BCL-xL.

BCL-xL est également capable de moduler des fonctions cellulaires qui vont au-delà de la régulation de l'apoptose, impliquant des interactions avec des protéines n'appartenant pas à la famille de BCL-2. Dans ce contexte, mon second projet de thèse a permis de montrer un rôle de stabilisation de l'activité de RAS par BCL-xL. Nous avons alors développé des approches de criblage et de pep-scan en vue d'identifier des molécules capables de moduler la liaison de RAS à BCL-xL, nous fournissant des outils d'étude pour une meilleure compréhension de cette interaction d'un point de vue structurel et fonctionnel.

Ces études soulignent l'importance de la compréhension du rôle joué par BCL-xL dans le contexte de tumorigenèse. Les mécanismes moléculaires aboutissant à une surexpression de BCL-xL dans les cancers restent largement inconnus, contrairement à BCL-2, protéine pour laquelle une translocation chromosomique mettant son gène juxtaposé au locus codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines dans les lymphomes B a été mise en évidence (Tsujimoto et al., 1985). Nous avons cependant de réelles preuves de l'implication de BCL-xL dans le développement tumoral. Ce travail de thèse met en évidence le fait qu'au-delà de la surexpression de BCL-xL, le profil d'expression des protéines

appartenant à son réseau d'interaction est également déterminant dans le devenir des cellules et devra à ce titre être étudié de façon approfondie afin d'envisager un ciblage efficace de BCL-xL en thérapie.

---

## Bibliographie

Adams, J.M., and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324–1337.

Ahearn, I.M., Haigis, K., Bar-Sagi, D., and Philips, M.R. (2012). Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 39–51.

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

Akiyama, T., Bouillet, P., Miyazaki, T., Kadono, Y., Chikuda, H., Chung, U.-I., Fukuda, A., Hikita, A., Seto, H., Okada, T., et al. (2003). Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *EMBO J.* 22, 6653–6664.

Alavian, K.N., Li, H., Collis, L., Bonanni, L., Zeng, L., Sacchetti, S., Lazrove, E., Nabili, P., Flaherty, B., Graham, M., et al. (2011). Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nat. Cell Biol.* 13, 1224–1233.

Albeck, J.G., Burke, J.M., Spencer, S.L., Lauffenburger, D.A., and Sorger, P.K. (2008). Modeling a Snap-Action, Variable-Delay Switch Controlling Extrinsic Cell Death. *PLoS Biol* 6, e299.

Amundson, S.A., Myers, T.G., Scudiero, D., Kitada, S., Reed, J.C., and Fornace, A.J. (2000). An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 60, 6101–6110.

Aouacheria, A., Rech de Laval, V., Combet, C., and Hardwick, J.M. (2013). Evolution of Bcl-2 homology motifs: homology versus homoplasy. *Trends in Cell Biology* 23, 103–111.

Aran, V., and Prior, I.A. (2013). Compartmentalized Ras signaling differentially contributes to phenotypic outputs. *Cellular Signalling* 25, 1748–1753.

Aranovich, A., Liu, Q., Collins, T., Geng, F., Dixit, S., Leber, B., and Andrews, D.W. (2012). Differences in the mechanisms of proapoptotic BH3 proteins binding to Bcl-XL and Bcl-2 quantified in live MCF-7 cells. *Mol. Cell* 45, 754–763.

Arrouss, I., Nemat, F., Roncal, F., Wislez, M., Dorgham, K., Vallerand, D., Rabbe, N., Karboul, N., Carlotti, F., Bravo, J., et al. (2013). Specific targeting of caspase-9/PP2A interaction as potential new anti-cancer therapy. *PLoS ONE* 8, e60816.

Ayllón, V., Martínez-A, C., García, A., Cayla, X., and Rebollo, A. (2000). Protein phosphatase 1alpha is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates interleukin-2 deprivation-induced apoptosis. *EMBO J.* 19, 2237–2246.

Ayllón, V., Cayla, X., García, A., Fleischer, A., and Rebollo, A. (2002). The anti-apoptotic molecules Bcl-xL and Bcl-w target protein phosphatase 1alpha to Bad. *Eur. J. Immunol.* 32, 1847–1855.

Bae, J., Donigian, J.R., and Hsueh, A.J.W. (2003). Tankyrase 1 interacts with Mcl-1 proteins and inhibits their regulation of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 5195–5204.

Bah, N., Maillet, L., Ryan, J., Dubreil, S., Gautier, F., Letai, A., Juin, P., and Barillé-Nion, S. (2014). Bcl-xL controls a switch between cell death modes during mitotic arrest. *Cell Death Dis* 5, e1291.

Baines, A.T., Xu, D., and Der, C.J. (2011). Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med Chem* 3, 1787–1808.

Baker, N.M., and Der, C.J. (2013). Cancer: Drug for an “undruggable” protein. *Nature* 497, 577–578.

Barbacid, M. (1990). ras oncogenes: their role in neoplasia. *European Journal of Clinical Investigation* 20, 225–235.

Barclay, L.A., Wales, T.E., Garner, T.P., Wachter, F., Lee, S., Guerra, R.M., Stewart, M.L., Braun, C.R., Bird, G.H., Gavathiotis, E., et al. (2015). Inhibition of Pro-apoptotic BAX by a noncanonical interaction mechanism. *Mol. Cell* 57, 873–886.

Beck, B., and Blanpain, C. (2013). Unravelling cancer stem cell potential. *Nat. Rev. Cancer* 13, 727–738.

Bellot, G., Cartron, P.-F., Er, E., Oliver, L., Juin, P., Armstrong, L.C., Bornstein, P., Mihara, K., Manon, S., and Vallette, F.M. (2007). TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein Bax. *Cell Death Differ.* 14, 785–794.

Beverly, L.J. (2012). Regulation of anti-apoptotic BCL2-proteins by non-canonical interactions: The next step forward or two steps back? *J. Cell. Biochem.* 113, 3–12.

Billen, L.P., Kokoski, C.L., Lovell, J.F., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol.* 6, e147.

Bissell, M.J., and Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nat. Rev. Cancer* 1, 46–54.

Bivona, T.G., Quatela, S.E., Bodemann, B.O., Ahearn, I.M., Soskis, M.J., Mor, A., Miura, J., Wiener, H.H., Wright, L., Saba, S.G., et al. (2006). PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol. Cell* 21, 481–493.

Bohnuud, T., Kozakov, D., and Vajda, S. (2014). Evidence of conformational selection driving the formation of ligand binding sites in protein-protein interfaces. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003872.

Bonneau, B., Prudent, J., Popgeorgiev, N., and Gillet, G. (2013). Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: the calcium connection. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 1755–1765.

Bonnefoy-Berard, N., Aouacheria, A., Vershelde, C., Quemeneur, L., Marçais, A., and Marvel, J. (2004). Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1644, 159–168.

Boya, P., González-Polo, R.-A., Casares, N., Perfettini, J.-L., Dessen, P., Larochette, N., Métivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., et al. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1025–1040.

Braun, F., Bertin-Ciftci, J., Gallouet, A.-S., Millour, J., and Juin, P. (2011). Serum-nutrient starvation induces cell death mediated by Bax and Puma that is counteracted by p21 and unmasked by Bcl-x(L) inhibition. *PLoS ONE* 6, e23577.

Braun, F., de Carné Trécesson, S., Bertin-Ciftci, J., and Juin, P. (2013). Protect and serve: Bcl-2 proteins as guardians and rulers of cancer cell survival. *Cell Cycle* 12, 2937–2947.

Bruet, J.-M., Bruet-Sedano, N., Luciano, F., Zhai, D., Balpai, R., Xu, C., Kress, C.L., Bailly-Maitre, B., Li, X., Osterman, A., et al. (2007). Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell* 129, 45–56.

Bruncko, M., Wang, L., Sheppard, G.S., Phillips, D.C., Tahir, S.K., Xue, J., Erickson, S., Fidanze, S., Fry, E., Hasvold, L., et al. (2015). Structure-guided design of a series of MCL-1 inhibitors with high affinity and selectivity. *J. Med. Chem.* 58, 2180–2194.

Brunelle, J.K., and Letai, A. (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J. Cell. Sci.* 122, 437–441.

Budhram-Mahadeo, V., Morris, P.J., Smith, M.D., Midgley, C.A., Boxer, L.M., and Latchman, D.S. (1999). p53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor. *J. Biol. Chem.* 274, 15237–15244.

Campane, M., Noël, B., Couriaud, C., Grau, M., Guillemin, Y., Gautier, F., Gouraud, W., Charbonnel, C., Campion, L., Jézéquel, P., et al. (2011). c-Myc dependent expression of pro-apoptotic Bim renders HER2-overexpressing breast cancer cells dependent on anti-apoptotic Mcl-1. *Mol. Cancer* 10, 110.

de Carné Trécesson, S., Guillemin, Y., Bélanger, A., Bernard, A.-C., Preisser, L., Ravon, E., Gamelin, E., Juin, P., Barré, B., and Coqueret, O. (2011). Escape from p21-mediated oncogene-induced senescence leads to

---

cell dedifferentiation and dependence on anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 proteins. *J. Biol. Chem.* 286, 12825–12838.

Carroll, R.G., Hollville, E., and Martin, S.J. (2014). Parkin sensitizes toward apoptosis induced by mitochondrial depolarization through promoting degradation of Mcl-1. *Cell Rep* 9, 1538–1553.

Cartron, P.-F., Moreau, C., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K., and Vallette, F.M. (2002). Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function. *FEBS Lett.* 512, 95–100.

Cartron, P.-F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M., and Juin, P. (2004). The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol. Cell* 16, 807–818.

Castellano, E., and Downward, J. (2010). Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 346, 143–169.

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

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

Charan, R.A., Johnson, B.N., Zaganelli, S., Nardozzi, J.D., and LaVoie, M.J. (2014). Inhibition of apoptotic Bax translocation to the mitochondria is a central function of parkin. *Cell Death Dis* 5, e1313.

Chen, C.-Y., and Faller, D.V. (1996). Phosphorylation of Bcl-2 Protein and Association with p21Ras in Ras-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 2376–2379.

Chen, C., Edelstein, L.C., and Gélinas, C. (2000). The Rel/NF- $\kappa$ B Family Directly Activates Expression of the Apoptosis Inhibitor Bcl-xL. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2687–2695.

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

Chen, R., Valencia, I., Zhong, F., McColl, K.S., Roderick, H.L., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Conway, S.J., Holmes, A.B., Mignery, G.A., et al. (2004). Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Cell Biol.* 166, 193–203.

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

Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D.D., and Green, D.R. (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 309, 1732–1735.

Chipuk, J.E., McStay, G.P., Bharti, A., Kuwana, T., Clarke, C.J., Siskind, L.J., Obeid, L.M., and Green, D.R. (2012). Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* 148, 988–1000.

Colak, S., Zimmerlin, C.D., Fessler, E., Hogdal, L., Prasetyanti, P.R., Grandela, C.M., Letai, A., and Medema, J.P. (2014). Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. *Cell Death Differ.* 21, 1170–1177.

Colell, A., Ricci, J.-E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N.J., Li, C.W., et al. (2007). GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* 129, 983–997.

Corcoran, R.B., Cheng, K.A., Hata, A.N., Faber, A.C., Ebi, H., Coffee, E.M., Greninger, P., Brown, R.D., Godfrey, J.T., Cohoon, T.J., et al. (2013). Synthetic lethal interaction of combined BCL-XL and MEK inhibition promotes tumor regressions in KRAS mutant cancer models. *Cancer Cell* 23, 121–128.



## Bibliographie

---

Cory, S., Huang, D.C.S., and Adams, J.M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590–8607.

Czabotar, P.E., Lee, E.F., van Delft, M.F., Day, C.L., Smith, B.J., Huang, D.C.S., Fairlie, W.D., Hinds, M.G., and Colman, P.M. (2007). Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 6217–6222.

Czabotar, P.E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Yao, S., Robin, A.Y., Smith, B.J., et al. (2013). Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* 152, 519–531.

Dai, H., Ding, H., Meng, X.W., Lee, S.-H., Schneider, P.A., and Kaufmann, S.H. (2013). Contribution of Bcl-2 phosphorylation to Bak binding and drug resistance. *Cancer Res.* 73, 6998–7008.

Dai, H., Pang, Y.-P., Ramirez-Alvarado, M., and Kaufmann, S.H. (2014). Evaluation of the BH3-only protein Puma as a direct Bak activator. *J. Biol. Chem.* 289, 89–99.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231–241.

Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543–8567.

Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* 1, 112–119.

Dejean, L.M., Martinez-Caballero, S., Guo, L., Hughes, C., Teijido, O., Ducret, T., Ichas, F., Korsmeyer, S.J., Antonsson, B., Jonas, E.A., et al. (2005). Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol. Biol. Cell* 16, 2424–2432.

van Delft, M.F., Wei, A.H., Mason, K.D., Vandenberg, C.J., Chen, L., Czabotar, P.E., Willis, S.N., Scott, C.L., Day, C.L., Cory, S., et al. (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 10, 389–399.

Deng, J., Carlson, N., Takeyama, K., Dal Cin, P., Shipp, M., and Letai, A. (2007). BH3 Profiling Identifies Three Distinct Classes of Apoptotic Blocks to Predict Response to ABT-737 and Conventional Chemotherapeutic Agents. *Cancer Cell* 12, 171–185.

Denis, G.V., Yu, Q., Ma, P., Deeds, L., Faller, D.V., and Chen, C.-Y. (2003). Bcl-2, via its BH4 domain, blocks apoptotic signaling mediated by mitochondrial Ras. *J. Biol. Chem.* 278, 5775–5785.

Dewson, G., Kratina, T., Czabotar, P., Day, C.L., Adams, J.M., and Kluck, R.M. (2009). Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their alpha6 helices. *Mol. Cell* 36, 696–703.

Dewson, G., Ma, S., Frederick, P., Hockings, C., Tan, I., Kratina, T., and Kluck, R.M. (2012). Bax dimerizes via a symmetric BH3:groove interface during apoptosis. *Cell Death Differ.* 19, 661–670.

Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffey, P.J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol.* 10, 1201–1204.

Ding, J., Zhang, Z., Roberts, G.J., Falcone, M., Miao, Y., Shao, Y., Zhang, X.C., Andrews, D.W., and Lin, J. (2010). Bcl-2 and Bax interact via the BH1-3 groove-BH3 motif interface and a novel interface involving the BH4 motif. *J. Biol. Chem.* 285, 28749–28763.

Ding, J., Mooers, B.H.M., Zhang, Z., Kale, J., Falcone, D., McNichol, J., Huang, B., Zhang, X.C., Xing, C., Andrews, D.W., et al. (2014). After embedding in membranes antiapoptotic Bcl-XL protein binds both Bcl-2 homology region 3 and helix 1 of proapoptotic Bax protein to inhibit apoptotic mitochondrial permeabilization. *J. Biol. Chem.* 289, 11873–11896.

Dremina, E.S., Sharov, V.S., Kumar, K., Zaidi, A., Michaelis, E.K., and Schöneich, C. (2004). Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA). *Biochem. J.* 383, 361–370.

- Droga-Mazovec, G., Bojic, L., Petelin, A., Ivanova, S., Romih, R., Repnik, U., Salvesen, G.S., Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2008). Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J. Biol. Chem.* 283, 19140–19150.
- Du, H., Wolf, J., Schafer, B., Moldoveanu, T., Chipuk, J.E., and Kuwana, T. (2011). BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *J. Biol. Chem.* 286, 491–501.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145, 104–116.
- Edwards, A.L., Gavathiotis, E., LaBelle, J.L., Braun, C.R., Opoku-Nsiah, K.A., Bird, G.H., and Walensky, L.D. (2013). Multimodal interaction with BCL-2 family proteins underlies the proapoptotic activity of PUMA BH3. *Chem. Biol.* 20, 888–902.
- Eichhorn, J.M., Alford, S.E., Sakurikar, N., and Chambers, T.C. (2014). Molecular analysis of functional redundancy among anti-apoptotic Bcl-2 proteins and its role in cancer cell survival. *Exp. Cell Res.* 322, 415–424.
- Elgendy, M., Sheridan, C., Brumatti, G., and Martin, S.J. (2011). Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol. Cell* 42, 23–35.
- Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817–829.
- Engelman, J.A., Chen, L., Tan, X., Crosby, K., Guimaraes, A.R., Upadhyay, R., Maira, M., McNamara, K., Perera, S.A., Song, Y., et al. (2008). Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat. Med.* 14, 1351–1356.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.* 20, 929–935.
- Fasolo, A., and Sessa, C. (2012). Targeting mTOR pathways in human malignancies. *Curr. Pharm. Des.* 18, 2766–2777.
- Faustin, B., Chen, Y., Zhai, D., Le Negrata, G., Lartigue, L., Satterthwait, A., and Reed, J.C. (2009). Mechanism of Bcl-2 and Bcl-X(L) inhibition of NLRP1 inflammasome: loop domain-dependent suppression of ATP binding and oligomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 3935–3940.
- Fazi, B., Bursch, W., Fimia, G.M., Nardacci, R., Piacentini, M., Di Sano, F., and Piredda, L. (2008). Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. *Autophagy* 4, 435–441.
- Fehrenbacher, N., Bar-Sagi, D., and Philips, M. (2009). Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Mol Oncol* 3, 297–307.
- Ferrandiz, N., Martin-Perez, J., Blanco, R., Donertas, D., Weber, A., Eilers, M., Dotto, P., Delgado, M.D., and Leon, J. (2009). HCT116 cells deficient in p21(Waf1) are hypersensitive to tyrosine kinase inhibitors and adriamycin through a mechanism unrelated to p21 and dependent on p53. *DNA Repair (Amst.)* 8, 390–399.
- Follis, A.V., Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Yun, M.-K., Grace, C.R., Nourse, A., Baran, K., Ou, L., Min, L., White, S.W., et al. (2013). PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis. *Nat. Chem. Biol.* 9, 163–168.
- Foreman, K.E., Wrone-Smith, T., Boise, L.H., Thompson, C.B., Poverini, P.J., Simonian, P.L., Nunez, G., and Nickoloff, B.J. (1996). Kaposi's sarcoma tumor cells preferentially express Bcl-xL. *Am. J. Pathol.* 149, 795–803.
- Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., Noël, B., Hickman, J.A., Geneste, O., Cartron, P.-F., Vallette, F.M., Manon, S., et al. (2009a). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J. Cell Biol.* 185, 279–290.
- Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., Noël, B., Hickman, J.A., Geneste, O., Cartron, P.-F., Vallette, F.M., Manon, S., et al. (2009b). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J Cell Biol* 185, 279–290.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* *19*, 107–120.

Gama, V., and Deshmukh, M. (2015). Life after MOMP. *Molecular Cell* *58*, 199–201.

Gardai, S.J., Hildeman, D.A., Frankel, S.K., Whitlock, B.B., Frasch, S.C., Borregaard, N., Marrack, P., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (2004). Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J. Biol. Chem.* *279*, 21085–21095.

Gautier, F., Guillemin, Y., Cartron, P.F., Gallenne, T., Cauquil, N., Le Diguarher, T., Casara, P., Vallette, F.M., Manon, S., Hickman, J.A., et al. (2011). Bax activation by engagement with, then release from, the BH3 binding site of Bcl-xL. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 832–844.

Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M.L., Pitter, K., Bird, G.H., Katz, S.G., Tu, H.-C., Kim, H., Cheng, E.H.-Y., Tjandra, N., et al. (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* *455*, 1076–1081.

Gavathiotis, E., Reyna, D.E., Bellairs, J.A., Leshchiner, E.S., and Walensky, L.D. (2012). Direct and selective small-molecule activation of proapoptotic BAX. *Nat Chem Biol* *8*, 639–645.

George, N.M., Evans, J.J.D., and Luo, X. (2007). A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes Dev.* *21*, 1937–1948.

Glaser, S.P., Lee, E.F., Trounson, E., Bouillet, P., Wei, A., Fairlie, W.D., Izon, D.J., Zuber, J., Rappaport, A.R., Herold, M.J., et al. (2012). Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia. *Genes Dev.* *26*, 120–125.

Gloaguen, C., Voisin-Chiret, A.S., Sopkova-de Oliveira Santos, J., Fogha, J., Gautier, F., De Giorgi, M., Burzicki, G., Perato, S., Pétigny-Lechartier, C., Simonin-Le Jeune, K., et al. (2015). First evidence that oligopyridines,  $\alpha$ -helix foldamers, inhibit Mcl-1 and sensitize ovarian carcinoma cells to Bcl-xL-targeting strategies. *J. Med. Chem.* *58*, 1644–1668.

Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I., and Green, D.R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol.* *2*, 156–162.

Gómez-López, S., Lerner, R.G., and Petritsch, C. (2014). Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 575–597.

Graupner, V., Alexander, E., Overkamp, T., Rothfuss, O., De Laurenzi, V., Gillissen, B.F., Daniel, P.T., Schulze-Osthoff, K., and Essmann, F. (2011). Differential regulation of the proapoptotic multidomain protein Bak by p53 and p73 at the promoter level. *Cell Death Differ.* *18*, 1130–1139.

Ha, J.-H., Shin, J.-S., Yoon, M.-K., Lee, M.-S., He, F., Bae, K.-H., Yoon, H.S., Lee, C.-K., Park, S.G., Muto, Y., et al. (2013). Dual-site interactions of p53 transactivation domain with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins reveal a highly convergent mechanism of divergent p53 pathways. *J. Biol. Chem.* jbc.M112.400754.

Halestrap, A.P., and Richardson, A.P. (2015). The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *78*, 129–141.

Han, B., Park, D., Li, R., Xie, M., Owonikoko, T.K., Zhang, G., Sica, G.L., Ding, C., Zhou, J., Magis, A.T., et al. (2015). Small-Molecule Bcl2 BH4 Antagonist for Lung Cancer Therapy. *Cancer Cell* *27*, 852–863.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.

Hancock, J.F. (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 373–384.

Harvey, J.J. (1964). AN UNIDENTIFIED VIRUS WHICH CAUSES THE RAPID PRODUCTION OF TUMOURS IN MICE. *Nature* *204*, 1104–1105.

Hershko, T., and Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J. Biol. Chem.* *279*, 8627–8634.

- Hitomi, J., Christofferson, D.E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R.J., and Yuan, J. (2008). Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 135, 1311–1323.
- Hockings, C., Anwari, K., Ninnis, R.L., Brouwer, J., O'Hely, M., Evangelista, M., Hinds, M.G., Czabotar, P.E., Lee, E.F., Fairlie, W.D., et al. (2015). Bid chimeras indicate that most BH3-only proteins can directly activate Bak and Bax, and show no preference for Bak versus Bax. *Cell Death Dis* 6, e1735.
- Hsu, Y.-T., and Youle, R.J. (1997). Nonionic Detergents Induce Dimerization among Members of the Bcl-2 Family. *J. Biol. Chem.* 272, 13829–13834.
- Hu, Y., Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N., and Núñez, G. (1998). Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 4386–4391.
- Hübner, A., Barrett, T., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2008). Multi-site Phosphorylation Regulates Bim Stability and Apoptotic Activity. *Mol Cell* 30, 415–425.
- Ichim, G., Lopez, J., Ahmed, S.U., Muthalagu, N., Giampazolias, E., Delgado, M.E., Haller, M., Riley, J.S., Mason, S.M., Athineos, D., et al. (2015). Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Mol. Cell* 57, 860–872.
- Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K.H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J.N., et al. (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 4, 321–328.
- Jin, Z., May, W.S., Gao, F., Flagg, T., and Deng, X. (2006). Bcl2 suppresses DNA repair by enhancing c-Myc transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 281, 14446–14456.
- Jin-Song, Y., Zhao-Xia, W., Cheng-Yu, L., Xiao-Di, L., Ming, S., Yuan-Yuan, G., and Wei, D. (2011). Prognostic significance of Bcl-xL gene expression in human colorectal cancer. *Acta Histochem.* 113, 810–814.
- Johnson, B.N., Berger, A.K., Cortese, G.P., and Lavoie, M.J. (2012). The ubiquitin E3 ligase parkin regulates the proapoptotic function of Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 6283–6288.
- Jones, M.K., and Jackson, J.H. (1998). Ras-GRF activates Ha-Ras, but not N-Ras or K-Ras 4B, protein in vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 1782–1787.
- Jorgensen, T.N., McKee, A., Wang, M., Kushnir, E., White, J., Refaeli, Y., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2007). Bim and Bcl-2 mutually affect the expression of the other in T cells. *J. Immunol.* 179, 3417–3424.
- Juhász, G., Csikós, G., Sinka, R., Erdélyi, M., and Sass, M. (2003). The Drosophila homolog of Aut1 is essential for autophagy and development. *FEBS Lett.* 543, 154–158.
- Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., and Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 13, 455–465.
- Kaefer, A., Yang, J., Noertersheuser, P., Mensing, S., Humerickhouse, R., Awni, W., and Xiong, H. (2014). Mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis of navitoclax (ABT-263) induced thrombocytopenia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 74, 593–602.
- Kaelin, W.G. (2009). Synthetic lethality: a framework for the development of wiser cancer therapeutics. *Genome Med* 1, 99.
- Kamer, I., Sarig, R., Zaltsman, Y., Niv, H., Oberkovitz, G., Regev, L., Haimovich, G., Lerenthal, Y., Marcellus, R.C., and Gross, A. (2005). Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. *Cell* 122, 593–603.
- Kang, J., and Pervaiz, S. (2012). Crosstalk between Bcl-2 family and Ras family small GTPases: potential cell fate regulation? *Front Oncol* 2, 206.
- Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 517–531.

## Bibliographie

---

Karpnich, N.O., Tafani, M., Rothman, R.J., Russo, M.A., and Farber, J.L. (2002). The Course of Etoposide-induced Apoptosis from Damage to DNA and p53 Activation to Mitochondrial Release of Cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 277, 16547–16552.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.

Kinnally, K.W., and Antonsson, B. (2007). A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis* 12, 857–868.

Kirsten, W.H., and Mayer, L.A. (1967). Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 39, 311–335.

Kline, M.P., Rajkumar, S.V., Timm, M.M., Kimlinger, T.K., Haug, J.L., Lust, J.A., Greipp, P.R., and Kumar, S. (2007). ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells. *Leukemia* 21, 1549–1560.

Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P.P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y.-X., Sneed, T., et al. (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10, 375–388.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., and 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 Res.* 53, 4701–4714.

Kreso, A., and Dick, J.E. (2014). Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* 14, 275–291.

Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 1004–1010.

Kroemer, G., and Martin, S.J. (2005). Caspase-independent cell death. *Nat. Med.* 11, 725–730.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16, 3–11.

Ku, B., Liang, C., Jung, J.U., and Oh, B.-H. (2011). Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Res.* 21, 627–641.

Kutuk, O., and Letai, A. (2008). Alteration of the mitochondrial apoptotic pathway is key to acquired paclitaxel resistance and can be reversed by ABT-737. *Cancer Res.* 68, 7985–7994.

Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W.D., Czabotar, P.E., Fischer, S.F., Perugini, M.A., Huang, D.C.S., and Colman, P.M. (2008). Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ.* 15, 1564–1571.

Labi, V., and Erlacher, M. (2015). How cell death shapes cancer. *Cell Death Dis* 6, e1675.

Lalier, L., Cartron, P.-F., Pedelaborde, F., Olivier, C., Loussouarn, D., Martin, S.A., Mefflah, K., Menanteau, J., and Vallette, F.M. (2007). Increase in PGE2 biosynthesis induces a Bax dependent apoptosis correlated to patients' survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene* 26, 4999–5009.

Laulier, C., and Lopez, B.S. (2012). The secret life of Bcl-2: Apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 751, 247–257.

Leber, B., Lin, J., and Andrews, D.W. (2007). Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis* 12, 897–911.

Leber, B., Lin, J., and Andrews, D.W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene* 29, 5221–5230.

Lee, H., Rotolo, J.A., Mesicek, J., Penate-Medina, T., Rimner, A., Liao, W.-C., Yin, X., Ragupathi, G., Ehleiter, D., Gulbins, E., et al. (2011). Mitochondrial ceramide-rich macrodomains functionalize Bax upon irradiation. *PLoS ONE* 6, e19783.

- Lei, K., and Davis, R.J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 2432–2437.
- Le Pogam, C., Krief, P., Beurlet, S., Soulié, A., Balitrand, N., Cassinat, B., Cavé, H., Kosmider, O., Setterblad, N., Leboeuf, C., et al. (2013). Localization of the NRAS:BCL-2 complex determines anti-apoptotic features associated with progressive disease in myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* *37*, 312–319.
- Lessene, G., Czabotar, P.E., and Colman, P.M. (2008). BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* *7*, 989–1000.
- Lessene, G., Czabotar, P.E., Sleebs, B.E., Zobel, K., Lowes, K.N., Adams, J.M., Baell, J.B., Colman, P.M., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., et al. (2013). Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 390–397.
- Leverson, J.D., Zhang, H., Chen, J., Tahir, S.K., Phillips, D.C., Xue, J., Nimmer, P., Jin, S., Smith, M., Xiao, Y., et al. (2015). Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). *Cell Death Dis* *6*, e1590.
- Lheureux, S., N'Diaye, M., Blanc-Fournier, C., Dugué, A.E., Clarisse, B., Dutoit, S., Giffard, F., Abeillard, E., Briand, M., Labiche, A., et al. (2015). Identification of predictive factors of response to the BH3-mimetic molecule ABT-737: an ex vivo experiment in human serous ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* *136*, E340–E350.
- Liang, X.H., Kleeman, L.K., Jiang, H.H., Gordon, G., Goldman, J.E., Berry, G., Herman, B., and Levine, B. (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J. Virol.* *72*, 8586–8596.
- Lim, K.-H., Brady, D.C., Kashatus, D.F., Ancrile, B.B., Der, C.J., Cox, A.D., and Counter, C.M. (2010). Aurora-A phosphorylates, activates, and relocalizes the small GTPase RalA. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 508–523.
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A Unified Model of Mammalian BCL-2 Protein Family Interactions at the Mitochondria. *Molecular Cell* *44*, 517–531.
- Lobell, R.B., Liu, D., Buser, C.A., Davide, J.P., DePuy, E., Hamilton, K., Koblan, K.S., Lee, Y., Mosser, S., Motzel, S.L., et al. (2002). Preclinical and clinical pharmacodynamic assessment of L-778,123, a dual inhibitor of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase type-I. *Mol. Cancer Ther.* *1*, 747–758.
- Lopez, H., Zhang, L., George, N.M., Liu, X., Pang, X., Evans, J.J.D., Targy, N.M., and Luo, X. (2010). Perturbation of the Bcl-2 network and an induced Noxa/Bcl-xL interaction trigger mitochondrial dysfunction after DNA damage. *J. Biol. Chem.* *285*, 15016–15026.
- Lynch, S.J., Snitkin, H., Gumper, I., Philips, M.R., Sabatini, D., and Pellicer, A. (2015). The Differential Palmitoylation States of N-Ras and H-Ras Determine Their Distinct Golgi Subcompartment Localizations. *J. Cell. Physiol.* *230*, 610–619.
- Ma, S.B., Nguyen, T.N., Tan, I., Ninnis, R., Iyer, S., Stroud, D.A., Menard, M., Kluck, R.M., Ryan, M.T., and Dewson, G. (2014). Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function. *Cell Death Differ.* *21*, 1925–1935.
- Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.-C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., et al. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* *26*, 2527–2539.
- Majno, G., La Gattuta, M., and Thompson, T.E. (1960). Cellular death and necrosis: chemical, physical and morphologic changes in rat liver. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* *333*, 421–465.
- Makino, S. (1959). The role of tumor stem-cells in regrowth of the tumor following drastic applications. *Acta Unio Int Contra Cancrum* *15(Suppl 1)*, 196–198.
- Malia, T.J., and Wagner, G. (2007). NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-xL. *Biochemistry* *46*, 514–525.
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., and Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 81–94.

## Bibliographie

---

- Marshall, C.J. (1993). Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. *Science* 259, 1865–1866.
- Martinez-Caballero, S., Dejean, L.M., Kinnally, M.S., Oh, K.J., Mannella, C.A., and Kinnally, K.W. (2009a). Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *J. Biol. Chem.* 284, 12235–12245.
- Martinez-Caballero, S., Dejean, L.M., Kinnally, M.S., Oh, K.J., Mannella, C.A., and Kinnally, K.W. (2009b). Assembly of the Mitochondrial Apoptosis-induced Channel, MAC. *J Biol Chem* 284, 12235–12245.
- Mason, K.D., Carpinelli, M.R., Fletcher, J.I., Collinge, J.E., Hilton, A.A., Ellis, S., Kelly, P.N., Ekert, P.G., Metcalf, D., Roberts, A.W., et al. (2007). Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 128, 1173–1186.
- Massaad, C.A., Portier, B.P., and Taglialatela, G. (2004). Inhibition of transcription factor activity by nuclear compartment-associated Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 279, 54470–54478.
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 961–967.
- Mathieu, A.-L., Sperandio, O., Pottiez, V., Balzarín, S., Herlédan, A., Elkaïm, J.O., Fogeron, M.-L., Piveteau, C., Dassonneville, S., Deprez, B., et al. (2014). Identification of Small Inhibitory Molecules Targeting the Bfl-1 Anti-Apoptotic Protein That Alleviates Resistance to ABT-737. *J Biomol Screen* 19, 1035–1046.
- Meacham, C.E., and Morrison, S.J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 501, 328–337.
- Mehta, S.V., Shukla, S.N., and Vora, H.H. (2013). Overexpression of Bcl2 protein predicts chemoresistance in acute myeloid leukemia: its correlation with FLT3. *Neoplasma* 60, 666–675.
- Mérino, D., Khaw, S.L., Glaser, S.P., Anderson, D.J., Belmont, L.D., Wong, C., Yue, P., Robati, M., Phipson, B., Fairlie, W.D., et al. (2012). Bcl-2, Bcl-x(L), and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells. *Blood* 119, 5807–5816.
- Middelburg, R., de Haas, R.R., Dekker, H., Kerkhoven, R.M., Pohlmann, P.R., Fuentes-Albuero, A., Mohar, A., Pinedo, H.M., and Lankelma, J. (2005). Induction of p53 up-regulated modulator of apoptosis messenger RNA by chemotherapeutic treatment of locally advanced breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 1863–1869.
- Mignard, V., Lalier, L., Paris, F., and Vallette, F.M. (2014). Bioactive lipids and the control of Bax pro-apoptotic activity. *Cell Death Dis* 5, e1266.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria. *Molecular Cell* 11, 577–590.
- Minn, A.J., Rudin, C.M., Boise, L.H., and Thompson, C.B. (1995). Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 86, 1903–1910.
- Moldoveanu, T., Follis, A.V., Kriwacki, R.W., and Green, D.R. (2014). Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem. Sci.* 39, 101–111.
- Monaco, G., Beckers, M., Ivanova, H., Missiaen, L., Parys, J.B., De Smedt, H., and Bultynck, G. (2012). Profiling of the Bcl-2/Bcl-XL-binding sites on type 1 IP3 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 428, 31–35.
- Montero, J., Sarosiek, K.A., DeAngelo, J.D., Maertens, O., Ryan, J., Ercan, D., Piao, H., Horowitz, N.S., Berkowitz, R.S., Matulonis, U., et al. (2015a). Drug-Induced Death Signaling Strategy Rapidly Predicts Cancer Response to Chemotherapy. *Cell* 160, 977–989.
- Montero, J., Sarosiek, K.A., DeAngelo, J.D., Maertens, O., Ryan, J., Ercan, D., Piao, H., Horowitz, N.S., Berkowitz, R.S., Matulonis, U., et al. (2015b). Drug-Induced Death Signaling Strategy Rapidly Predicts Cancer Response to Chemotherapy. *Cell* 160, 977–989.

Montessuit, S., Somasekharan, S.P., Terrones, O., Lucken-Ardjomande, S., Herzig, S., Schwarzenbacher, R., Manstein, D.J., Bossy-Wetzel, E., Basañez, G., Meda, P., et al. (2010). Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell* 142, 889–901.

Murrow, L., and Debnath, J. (2013). Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu Rev Pathol* 8, 105–137.

Nakajima, W., and Tanaka, N. (2011). Noxa induces apoptosis in oncogene-expressing cells through catch-and-release mechanism operating between Puma and Mcl-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413, 643–648.

Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* 7, 683–694.

Nechushtan, A., Smith, C.L., Hsu, Y.-T., and Youle, R.J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *The EMBO Journal* 18, 2330–2341.

Nguyen, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Korsmeyer, S.J., and Shore, G.C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.* 268, 25265–25268.

Ni Chonghaile, T., and Letai, A. (2008). Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene* 27 *Suppl 1*, S149–S157.

Nikiforov, M.A., Riblett, M., Tang, W.-H., Gratchouck, V., Zhuang, D., Fernandez, Y., Verhaegen, M., Varambally, S., Chinnaiyan, A.M., Jakubowiak, A.J., et al. (2007). Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 19488–19493.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053–1058.

O’Kane, S.L., Pound, R.J., Campbell, A., Chaudhuri, N., Lind, M.J., and Cawkwell, L. (2006). Expression of bcl-2 family members in malignant pleural mesothelioma. *Acta Oncol* 45, 449–453.

Olopade, O.I., Adeyanju, M.O., Safa, A.R., Hagos, F., Mick, R., Thompson, C.B., and Recant, W.M. (1997). Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am* 3, 230–237.

Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., et al. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435, 677–681.

Ostrem, J.M., Peters, U., Sos, M.L., Wells, J.A., and Shokat, K.M. (2013). K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* 503, 548–551.

Otilie, S., Diaz, J.L., Chang, J., Wilson, G., Tuffo, K.M., Weeks, S., McConnell, M., Wang, Y., Oltersdorf, T., and Fritz, L.C. (1997). Structural and functional complementation of an inactive Bcl-2 mutant by Bax truncation. *J. Biol. Chem.* 272, 16955–16961.

Pacold, M.E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C.T., Walker, E.H., Hawkins, P.T., Stephens, L., Eccleston, J.F., and Williams, R.L. (2000). Crystal Structure and Functional Analysis of Ras Binding to Its Effector Phosphoinositide 3-Kinase  $\gamma$ . *Cell* 103, 931–944.

Pang, X., Zhang, J., Lopez, H., Wang, Y., Li, W., O’Neill, K.L., Evans, J.J.D., George, N.M., Long, J., Chen, Y., et al. (2014). The carboxyl-terminal tail of Noxa protein regulates the stability of Noxa and Mcl-1. *J. Biol. Chem.* 289, 17802–17811.

Perciavalle, R.M., Stewart, D.P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., Temirov, J., Cleland, M.M., Pelletier, S., Schuetz, J.D., et al. (2012). Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat. Cell Biol.* 14, 575–583.

Portier, B.P., and Tagliatela, G. (2006). Bcl-2 localized at the nuclear compartment induces apoptosis after transient overexpression. *J. Biol. Chem.* 281, 40493–40502.



- Poulaki, V., Mitsiades, N., Romero, M.E., and Tsokos, M. (2001). Fas-mediated apoptosis in neuroblastoma requires mitochondrial activation and is inhibited by FLICE inhibitor protein and Bcl-2. *Cancer Res.* *61*, 4864–4872.
- Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., and Gabai, V.L. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* *283*, 1–16.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C., and Strasser, A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* *293*, 1829–1832.
- Qian, J., Zou, Y., Rahman, J.S.M., Lu, B., and Massion, P.P. (2009). Synergy Between PI3Kinase/AKT pathway and Bcl-xL in the Control of Apoptosis in Adenocarcinoma Cells of the Lung. *Mol Cancer Ther* *8*, 101–109.
- Rasola, A., and Bernardi, P. (2014). The mitochondrial permeability transition pore and its adaptive responses in tumor cells. *Cell Calcium* *56*, 437–445.
- Rebollo, A., Pérez-Sala, D., and Martínez-A, C. (1999). Bcl-2 differentially targets K-, N-, and H-Ras to mitochondria in IL-2 supplemented or deprived cells: implications in prevention of apoptosis. *Oncogene* *18*, 4930–4939.
- Reed, J.C., Zha, H., Aime-Sempe, C., Takayama, S., and Wang, H.G. (1996). Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv. Exp. Med. Biol.* *406*, 99–112.
- Reginato, M.J., Mills, K.R., Paulus, J.K., Lynch, D.K., Sgroi, D.C., Debnath, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. (2003). Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat. Cell Biol.* *5*, 733–740.
- Rehm, M., Düsselmann, H., and Prehn, J.H.M. (2003). Real-time single cell analysis of Smac/DIABLO release during apoptosis. *J. Cell Biol.* *162*, 1031–1043.
- Ren, D., Tu, H.-C., Kim, H., Wang, G.X., Bean, G.R., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., and Cheng, E.H.-Y. (2010). BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science* *330*, 1390–1393.
- Renault, T.T., Tejjido, O., Missire, F., Ganesan, Y.T., Velours, G., Arokium, H., Beaumatin, F., Llanos, R., Athané, A., Camougrand, N., et al. (2015). Bcl-xL stimulates Bax relocation to mitochondria and primes cells to ABT-737. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* *64*, 136–146.
- Ricca, A., Biroccio, A., Del Bufalo, D., Mackay, A.R., Santoni, A., and Cippitelli, M. (2000). bcl-2 over-expression enhances NF- $\kappa$ B activity and induces mmp-9 transcription in human MCF7ADR breast-cancer cells. *Int. J. Cancer* *86*, 188–196.
- Rong, Y.-P., Bultynck, G., Aromolaran, A.S., Zhong, F., Parys, J.B., De Smedt, H., Mignery, G.A., Roderick, H.L., Bootman, M.D., and Distelhorst, C.W. (2009). The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 14397–14402.
- Rooswinkel, R.W., van de Kooij, B., Verheij, M., and Borst, J. (2012). Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B. *Cell Death Dis* *3*, e366.
- Rooswinkel, R.W., van de Kooij, B., de Vries, E., Paauwe, M., Braster, R., Verheij, M., and Borst, J. (2014). Antiapoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. *Blood* *123*, 2806–2815.
- Rosen, K., Rak, J., Leung, T., Dean, N.M., Kerbel, R.S., and Filmus, J. (2000). Activated Ras prevents downregulation of Bcl-X(L) triggered by detachment from the extracellular matrix. A mechanism of Ras-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* *149*, 447–456.
- Roucou, X., Montessuit, S., Antonsson, B., and Martinou, J.-C. (2002). Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem. J.* *368*, 915–921.

- Ryan, J., and Letai, A. (2013). BH3 profiling in whole cells by fluorimeter or FACS. *Methods* 61, 156–164.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M., and Venkatachalam, M.A. (1999). Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am. J. Med.* 107, 489–506.
- Sakurikar, N., Eichhorn, J.M., and Chambers, T.C. (2012). Cyclin-dependent kinase-1 (Cdk1)/cyclin B1 dictates cell fate after mitotic arrest via phosphoregulation of antiapoptotic Bcl-2 proteins. *J. Biol. Chem.* 287, 39193–39204.
- Sanz, C., Benito, A., Inohara, N., Ekhterae, D., Nunez, G., and Fernandez-Luna, J.L. (2000). Specific and rapid induction of the proapoptotic protein Hrk after growth factor withdrawal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* 95, 2742–2747.
- Sarosiek, K.A., Chi, X., Bachman, J.A., Sims, J.J., Montero, J., Patel, L., Flanagan, A., Andrews, D.W., Sorger, P., and Letai, A. (2013a). BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. *Mol. Cell* 51, 751–765.
- Sarosiek, K.A., Ni Chonghaile, T., and Letai, A. (2013b). Mitochondria: gatekeepers of response to chemotherapy. *Trends Cell Biol.* 23, 612–619.
- 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., et al. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275, 983–986.
- Schafer, B., Quispe, J., Choudhary, V., Chipuk, J.E., Ajero, T.G., Du, H., Schneider, R., and Kuwana, T. (2009). Mitochondrial outer membrane proteins assist Bid in Bax-mediated lipidic pore formation. *Mol. Biol. Cell* 20, 2276–2285.
- Schoenwaelder, S.M., Jarman, K.E., Gardiner, E.E., Hua, M., Qiao, J., White, M.J., Josefsson, E.C., Alwis, I., Ono, A., Willcox, A., et al. (2011). Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopenia that undermines the hemostatic function of platelets. *Blood* 118, 1663–1674.
- Scholl, C., Fröhling, S., Dunn, I.F., Schinzel, A.C., Barbie, D.A., Kim, S.Y., Silver, S.J., Tamayo, P., Wadlow, R.C., Ramaswamy, S., et al. (2009). Synthetic lethal interaction between oncogenic KRAS dependency and STK33 suppression in human cancer cells. *Cell* 137, 821–834.
- Shamas-Din, A., Bindner, S., Chi, X., Leber, B., Andrews, D.W., and Fradin, C. (2015). Distinct lipid effects on tBid and Bim activation of membrane permeabilization by pro-apoptotic Bax. *Biochem. J.* 467, 495–505.
- Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483–487.
- Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T., and Tsujimoto, Y. (2000). BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3100–3105.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., and Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* 6, 1221–1228.
- Shirane, M., and Nakayama, K.I. (2003). Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 5, 28–37.
- Sinha, S., and Levine, B. (2008). The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 27 Suppl 1, S137–S148.
- Siskind, L.J., Mullen, T.D., Romero Rosales, K., Clarke, C.J., Hernandez-Corbacho, M.J., Edinger, A.L., and Obeid, L.M. (2010). The BCL-2 protein BAK is required for long-chain ceramide generation during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 285, 11818–11826.
- Smith, R.A., Dumas, J., Adnane, L., and Wilhelm, S.M. (2006). Recent advances in the research and development of RAF kinase inhibitors. *Curr Top Med Chem* 6, 1071–1089.

## Bibliographie

---

Solit, D.B., Garraway, L.A., Pratilas, C.A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., Ye, Q., Lobo, J.M., She, Y., Osman, I., et al. (2006). BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* *439*, 358–362.

Song, D., Sakamoto, S., and Taniguchi, T. (2002). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity by Bcl-2 in association with the ribosomal protein S3a. *Biochemistry* *41*, 929–934.

Song, J.-Y., Ryu, S.-H., Cho, Y.M., Kim, Y.S., Lee, B.-M., Lee, S.-W., and Choi, J. (2013). Wip1 suppresses apoptotic cell death through direct dephosphorylation of BAX in response to  $\gamma$ -radiation. *Cell Death Dis* *4*, e744.

Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., et al. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* *19*, 202–208.

Steinbach, J.P., Wolburg, H., Klumpp, A., Probst, H., and Weller, M. (2003). Hypoxia-induced cell death in human malignant glioma cells: energy deprivation promotes decoupling of mitochondrial cytochrome c release from caspase processing and necrotic cell death. *Cell Death Differ* *10*, 823–832.

Stornaiuolo, M., La Regina, G., Passacantilli, S., Grassia, G., Coluccia, A., La Pietra, V., Giustiniano, M., Cassese, H., Di Maro, S., Brancaccio, D., et al. (2015). Structure-Based Lead Optimization and Biological Evaluation of BAX Direct Activators as Novel Potential Anticancer Agents. *J. Med. Chem.* *58*, 2135–2148.

Subburaj, Y., Cosentino, K., Axmann, M., Pedrueza-Villalmanzo, E., Hermann, E., Bleicken, S., Spatz, J., and García-Sáez, A.J. (2015). Bax monomers form dimer units in the membrane that further self-assemble into multiple oligomeric species. *Nat Commun* *6*.

Sung, P.J., Tsai, F.D., Vais, H., Court, H., Yang, J., Fehrenbacher, N., Foskett, J.K., and Philips, M.R. (2013). Phosphorylated K-Ras limits cell survival by blocking Bcl-xL sensitization of inositol trisphosphate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 20593–20598.

Tagscherer, K.E., Fassl, A., Campos, B., Farhadi, M., Kraemer, A., Böck, B.C., Macher-Goeppinger, S., Radlwimmer, B., Wiestler, O.D., Herold-Mende, C., et al. (2008). Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene* *27*, 6646–6656.

Tahir, S.K., Wass, J., Joseph, M.K., Devanarayan, V., Hessler, P., Zhang, H., Elmore, S.W., Kroeger, P.E., Tse, C., Rosenberg, S.H., et al. (2010). Identification of expression signatures predictive of sensitivity to the Bcl-2 family member inhibitor ABT-263 in small cell lung carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines. *Mol. Cancer Ther.* *9*, 545–557.

Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2013). Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *5*.

Tait, S.W.G., Parsons, M.J., Llambi, F., Bouchier-Hayes, L., Connell, S., Muñoz-Pinedo, C., and Green, D.R. (2010). Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Dev. Cell* *18*, 802–813.

Tampio, M., Markkanen, P., Puttonen, K.A., Hagelberg, E., Heikkinen, H., Huhtinen, K., Loikkanen, J., Hirvonen, M.-R., and Vähäkangas, K.H. (2009). Induction of PUMA- $\alpha$  and down-regulation of PUMA- $\beta$  expression is associated with benzo(a)pyrene-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Toxicology Letters* *188*, 214–222.

Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Emschermann, F., Lauterwasser, J., Kaiser, A., Ichim, G., Tait, S.W.G., Frank, S., Langer, H.F., et al. (2015). Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. *EMBO J.* *34*, 67–80.

Trudel, S., Stewart, A.K., Li, Z., Shu, Y., Liang, S.-B., Trieu, Y., Reece, D., Paterson, J., Wang, D., and Wen, X.-Y. (2007). The Bcl-2 family protein inhibitor, ABT-737, has substantial antimyeloma activity and shows synergistic effect with dexamethasone and melphalan. *Clin. Cancer Res.* *13*, 621–629.

Tsai, F.D., Lopes, M.S., Zhou, M., Court, H., Ponce, O., Fiordalisi, J.J., Gierut, J.J., Cox, A.D., Haigis, K.M., and Philips, M.R. (2015). K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif. *PNAS* *112*, 779–784.

Tse, C., Shoemaker, A.R., Adickes, J., Anderson, M.G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E.F., Marsh, K.C., Mitten, M.J., Nimmer, P., et al. (2008). ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* 68, 3421–3428.

Tsujimoto, Y. (1989). Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene* 4, 1331–1336.

Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440–1443.

Utz, P.J., and Anderson, P. (2000). Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death Differ.* 7, 589–602.

Vakkila, J., and Lotze, M.T. (2004). Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol* 4, 641–648.

Valero, J.G., Sancey, L., Kucharczak, J., Guillemin, Y., Gimenez, D., Prudent, J., Gillet, G., Salgado, J., Coll, J.-L., and Aouacheria, A. (2011). Bax-derived membrane-active peptides act as potent and direct inducers of apoptosis in cancer cells. *J. Cell. Sci.* 124, 556–564.

Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 135–147.

Verma, S., Zhao, L., and Chinnadurai, G. (2001). Phosphorylation of the Pro-apoptotic Protein BIK MAPPING OF PHOSPHORYLATION SITES AND EFFECT ON APOPTOSIS. *J. Biol. Chem.* 276, 4671–4676.

Vervliet, T., Decrock, E., Molgó, J., Sorrentino, V., Missiaen, L., Leybaert, L., De Smedt, H., Kasri, N.N., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2014). Bcl-2 binds to and inhibits ryanodine receptors. *J. Cell. Sci.* 127, 2782–2792.

Villedieu, M., Louis, M.-H., Dutoit, S., Brotin, E., Lincet, H., Duigou, F., Staedel, C., Gauduchon, P., and Poulain, L. (2007). Absence of Bcl-xL down-regulation in response to cisplatin is associated with chemoresistance in ovarian carcinoma cells. *Gynecologic Oncology* 105, 31–44.

Vogler, M., Butterworth, M., Majid, A., Walewska, R.J., Sun, X.-M., Dyer, M.J.S., and Cohen, G.M. (2009). Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 113, 4403–4413.

Wang, H.G., Miyashita, T., Takayama, S., Sato, T., Torigoe, T., Krajewski, S., Tanaka, S., Hovey, L., Troppmair, J., and Rapp, U.R. (1994). Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene* 9, 2751–2756.

Wang, H.G., Rapp, U.R., and Reed, J.C. (1996). Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 87, 629–638.

Wang, P., Lindsay, J., Owens, T.W., Mularczyk, E.J., Warwood, S., Foster, F., Streuli, C.H., Brennan, K., and Gilmore, A.P. (2014). Phosphorylation of the proapoptotic BH3-only protein bid primes mitochondria for apoptosis during mitotic arrest. *Cell Rep* 7, 661–671.

Wang, Q., Sun, S.-Y., Khuri, F., Curran, W.J., and Deng, X. (2010). Mono- or double-site phosphorylation distinctly regulates the proapoptotic function of Bax. *PLoS ONE* 5, e13393.

Wang, X., Belguise, K., O'Neill, C.F., Sánchez-Morgan, N., Romagnoli, M., Eddy, S.F., Mineva, N.D., Yu, Z., Min, C., Trinkaus-Randall, V., et al. (2009). RelB NF-kappaB represses estrogen receptor alpha expression via induction of the zinc finger protein Blimp1. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3832–3844.

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

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., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727–730.

Weiler, M., Bähr, O., Hohlweg, U., Naumann, U., Rieger, J., Huang, H., Tabatabai, G., Krell, H.W., Ohgaki, H., Weller, M., et al. (2006). BCL-xL: time-dependent dissociation between modulation of apoptosis and invasiveness in human malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* 13, 1156–1169.

White, C., Li, C., Yang, J., Petrenko, N.B., Madesh, M., Thompson, C.B., and Foskett, J.K. (2005). The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R. *Nat. Cell Biol.* 7, 1021–1028.

Whyte, D.B., Kirschmeier, P., Hockenberry, T.N., Nunez-Oliva, I., James, L., Catino, J.J., Bishop, W.R., and Pai, J.K. (1997). K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 272, 14459–14464.

Wilfling, F., Weber, A., Potthoff, S., Vögtle, F.-N., Meisinger, C., Paschen, S.A., and Häcker, G. (2012). BH3-only proteins are tail-anchored in the outer mitochondrial membrane and can initiate the activation of Bax. *Cell Death Differ.* 19, 1328–1336.

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

Winter-Vann, A.M., and Casey, P.J. (2005). Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 5, 405–412.

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

Wright, L.P., and Philips, M.R. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J. Lipid Res.* 47, 883–891.

Xiao, Y., Nimmer, P., Sheppard, G.S., Bruncko, M., Hessler, P., Lu, X., Roberts-Rapp, L., Pappano, W.N., Elmore, S.W., Souers, A.J., et al. (2015). MCL-1 is a key determinant of breast cancer cell survival: Validation of MCL-1 dependency utilizing a highly selective small molecule inhibitor. *Mol. Cancer Ther.*

Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A., and Hancock, J.F. (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 24052–24056.

Yang, G., Thompson, J.A., Fang, B., and Liu, J. (2003). Silencing of H-ras gene expression by retrovirus-mediated siRNA decreases transformation efficiency and tumorgrowth in a model of human ovarian cancer. *Oncogene* 22, 5694–5701.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47–59.

Youn, C.-K., Cho, H.-J., Kim, S.-H., Kim, H.-B., Kim, M.-H., Chang, I.-Y., Lee, J.-S., Chung, M.-H., Hahm, K.-S., and You, H.J. (2005). Bcl-2 expression suppresses mismatch repair activity through inhibition of E2F transcriptional activity. *Nat. Cell Biol.* 7, 137–147.

Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Zhang, L. (2003). PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1931–1936.

Yuan, Z., Cao, K., Lin, C., Li, L., Liu, H., Zhao, X., Liu, L., Deng, H., Li, J., Nie, C., et al. (2011). The p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) chemosensitizes intrinsically resistant ovarian cancer cells to cisplatin by lowering the threshold set by Bcl-x(L) and Mcl-1. *Mol. Med.* 17, 1262–1274.

Zha, H., Aimé-Sempé, C., Sato, T., and Reed, J.C. (1996). Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J. Biol. Chem.* 271, 7440–7444.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274, 11549–11556.

## **Matériel et méthodes**

### **Culture cellulaire**

Les différentes lignées isogéniques HCT116, issues de cancer colorectal (p21<sup>-/-</sup> et p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup>), ont été fournies par le Professeur Vogelstein (John Hopkins University, Baltimore). Elles sont cultivées en conditions adhérentes en monocouche en milieu complet Mc Coy's 5A avec glutamine (Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal et 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine (Invitrogen), à 37°C dans une atmosphère à 10 % de CO<sub>2</sub>. La lignée de cancer du sein MCF7 issue de l'ATCC est cultivée en monocouche adhérente en milieu complet RPMI (Gibco) supplémenté de 10 % de sérum de veau foetal, 100 unités/mL de glutamine (Invitrogen) et 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine (Invitrogen). La lignée DLD1 PUMA inductible, issue de cancer colorectal a été fournie par le Professeur Vogelstein (John Hopkins University, Baltimore). Elle est cultivée en conditions adhérentes en monocouche en milieu complet Mc Coy's 5A avec glutamone (Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal et 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine (Invitrogen), en présence de 400 µg/ml de G418, 250 µg/ml d'hygromycin B et 20 ng/ml de doxycycline à 37°C dans une atmosphère à 10 % de CO<sub>2</sub>. L'expression de PUMA est induite dans ces cellules par privation de doxycycline. Les cellules ont été régulièrement testées pour confirmer l'absence de contamination par des mycoplasmes.

Les cellules surexprimant BCL-xL ont été obtenues selon les protocoles suivants :

Lignées MCF-7-YFP et -YFP-BCL-xL : les cellules MCF-7 sont transfectées par un plasmide codant pEYFP-C1 (Clontech) portant la séquence humaine du gène BCL-xL fusionnée à celle de l'eYFP, en utilisant la Lipofectamine 2000 comme agent de transfection. Une lignée contrôle est générée en parallèle avec des cellules transfectées par le vecteur pEYFP-C1 vide. 48 h après la transfection, les cellules ayant intégré l'ADN plasmidique de façon stable sont sélectionnées pendant plusieurs semaines dans du milieu RPMI1640 (Gibco) contenant 1 mg/mL de G418.

Lignées HCT116 p21<sup>-/-</sup>, HCT116 p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup> et DLD1 PUMA inductibles, pLVX et pLVX(BCL-xL) : les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup>, HCT116 p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup> et DLD1 PUMA inductibles sont infectées avec des particules lentivirales préparées en utilisant un vecteur pLVX-Puro (Clontech) portant la séquence humaine du gène BCL-xL. Une lignée contrôle est générée en parallèle en infectant des cellules avec le vecteur vide pLVX-Puro. 48 h après l'infection, les cellules exprimant les vecteurs de façon stable sont sélectionnées pendant une semaine dans du milieu McCoy's 5A (Gibco) contenant 1 µg/mL de puromycine.

Les traitements utilisés sont les suivants : ABT-737 (Selleck), ABT-199 (Selleck), WEHI-539 (ApexBio), Etoposide (Mylan), Doxorubicine (G GAM), Q-VD-OPh (R&D).

### **BH3-profiling sur cellules entières**

Les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> pLVX et pLVX(BCL-xL) ainsi que les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup> pLVX et pLVX(BCL-xL) à une densité de 1×10<sup>4</sup> cellules/puits sont incubées avec 15 µL de peptides BH3 (BH3-BIM, BH3-BAD, BH3-HRK) dans un tampon T-EB (300 mM Trehalose, 10 mM hepes-KOH pH 7.7, 80 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1% BSA, 5 mM succinate) puis déposées dans une plaque noire 384 puits (BD Falcon no. 353285). Les suspensions cellulaires sont ensuite lavées dans du tampon T-EB avant d'être resuspendues à une densité quatre fois supérieure à la densité finale. Un volume de cette suspension cellulaire 4X est ajoutée à un volume d'une solution de marquage (4 µM JC-1, 40 µg/mL oligomycin, 0.02% digitonin, 20 mM 2-mercaptoethanol dans du T-EB). Cette solution cellule/solution de marquage est incubée 5-10 minutes à température ambiante, ce qui

permet la perméabilisation cellulaire ainsi que l'entrée et l'équilibrage intra-cellulaire du JC-1. 15 µL de la solution cellule/marqueur sont ajoutés à 15 µl de T-EB dans la plaque noire 384, agités pendant 15 s avant mesure de la fluorescence à 590 nm à température ambiante pendant 5 min.

### PCR quantitative

Les ARN totaux sont extraits des cellules en utilisant le kit Nucleospin® RNA (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. La rétro-transcription est effectuée avec 500 ng d'ARN à l'aide du kit Maxima First strand cDNA Synthesis kit for RT-qPCR (Fisher Scientifique). La PCR quantitative est réalisée en utilisant le kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fisher Scientifique) ainsi que l'équipement MX4000 (Strata-gene, Basel, Switzerland), selon les recommandations des fabricants. Les données sont analysées par la méthode Pfaffl avec trois genes de reference. Les primers utilisés sont les suivants :

BCL2L1_for	TTCAGTGACCTGACATCCCA
BCL2L1_rev	TCCACAAAAGTATCCCAGCC
BCL2_for	CCTTCTTTGAGTTCGGTGGG
BCL2_rev	TCTTCAGAGACAGCCAGGAG
BAX_for	ACCGTGACCATCTTTGTG
BAX_rev	AAAACACAGTCCAAGGCA
MCL1_for	TCGGTACCTTCGGGAGCAGGC
MCL1_rev	CCCAGTTTGTACGCCGTCGCT
BBC3_v123 For	ACCTCAACGCACAGTACGA
BBC3_v123 Rev	GCACCTAATTGGGCTCCATC
BAK1_for	GCCCACGGCAGAGAATGCCT
BAK1_rev	AGGGCCAGACGGTAGCCGAA
QSBIM2	GCCTTCAACCACTATCTCAG
QASBIM2	TAAGCGTTAAACTCGTCTCC

### Plasmides

Les plasmides utilisés pour les essais BRET ont été obtenus par clonage des séquences humaines codantes pour les protéines d'intérêt BCL-xL, BAX, PUMA, K-RAS-4A, K-RAS-4B dans les vecteurs d'expression eucaryotes pRLuc-C2 (BioSignal Packard) et pEYFP-C1 (BD Biosciences).

### Essais de saturation BRET

Les cellules sontensemencées en plaques 12 puits afin d'obtenir une densité de 80% de confluence lors de leur transfection. La Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) est utilisée selon les recommandations du fabricant afin de transférer 50 ng par puits de plasmide codant pour un donneur BRET (RLuc-K-RAS, RLuc-BAX etc.) et des quantités croissantes de plasmides codant pour l'accepteur BRET (eYFP-BCL-xL, eYFP-BAX etc.) (0 à 1,5 µg par puits) ou 1 µg de plasmide contrôle, ne comprenant pas la séquence de l'eYFP. L'efficacité de transfection par l'accepteur est vérifiée au microscope à fluorescence. 24 heures après la transfection, les cellules sont transférées en plaques blanches 96 puits, en quadruplicate, à 40000 cellules par puits. Un lavage avec 100 µl de PBS par puits est effectué 48 heures après le transfert en plaque blanche, puis 25 µl de PBS sont déposés dans chaque puits. La solution mère de Coelentérazine h (Uptima) (= substrat de la luciférase) a été préparée à 1 mM dans de l'éthanol pur puis diluée dans du PBS afin d'être utilisée à 5 µM dans les puits contenant les cellules. L'équipement Mithras LB 940

(Berthold) procède à l'injection de Coelentérazine h dans chacun des puits puis mesure successivement la luminescence associée à l'activité Luciférase (émise à 480 nm) et la fluorescence associée à la eYFP (émise à 540 nm). Des cellules exprimant le donneur BRET en présence de 1 µg de plasmide codant pour une protéine non taguée par l'eYFP sont utilisées pour la détermination du bruit de fond de BRET. 6 lectures successives sont réalisées. Pour les analyses, les données obtenues lors des mesures 4, 5 et 6 sont utilisées. Les données sont recueillies via le logiciel MicroWin 2000 puis exportées vers Microsoft Office Excel 2007 afin d'être analysées. Les courbes de saturation présentées ont été tracées grâce au logiciel Graph Pad Prism.

Les ratios BRET sont calculés de la manière suivante :

$$\text{BRET} = (\text{Ratio BRET}(\text{interaction}) - \text{Ratio BRET}(\text{bruit de fond}))$$

Avec Ratio BRET = Lumière émise à 540 nm / Lumière émise à 480 nm

Interaction = condition où le donneur et l'accepteur son co-exprimés.

Bruit de fond = condition où le donneur est exprimé en présence d'un « accepteur » non fusionné à la eYFP.

Mesure eYFP pour le calcul du ratio eYFP/RLuc :

L'équipement Mithras LB 940 (Berthold) expose les cellules à une source lumière émise à 480 nm. Il mesure en parallèle la fluorescence émise à 540 nm associée à la quantité totale d'accepteur exprimée dans les cellules.

Signal eYFP = Mesure eYFP – bruit de fond de fluorescence

Bruit de fond de fluorescence = mesure eYFP effectuée dans des conditions où l'accepteur eYFP n'est pas exprimé dans les cellules.

Les données montrent les valeurs moyennes obtenues de quadruplicats de 3 mesures successives. Ce type de protocole a été utilisé pour toutes les études de saturation BRET figurant dans cette thèse.

## **Essais de concentration/réponse BRET**

Les cellules sontensemencées en plaques 6 puits afin d'obtenir une densité de 80% de confluence lors de leur transfection. La Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) est utilisée selon les recommandations du fabricant afin de transférer 150 ng par puits de plasmide codant pour un donneur BRET (RLuc-K-RAS, RLuc-BAX etc.) et 1,5 µg de plasmide codant pour l'accepteur BRET (eYFP-BCL-xL, eYFP-BAX etc.) ou 1,5 µg de plasmide contrôle, ne comprenant pas la séquence de l'eYFP. L'efficacité de transfection par l'accepteur est vérifiée au microscope à fluorescence. 24 heures après la transfection, les cellules sont transférées en plaques blanches 96 puits (en duplicate pour chaque concentration de traitement à tester), à 40000 cellules par puits et cultivées. 24 h plus tard, les cellules sont traitées avec des concentrations croissantes de BH3-mimétiques (ABT-737 ou WEHI-539) durant 16 h. Un lavage avec 100 µl de PBS par puits est ensuite effectué, puis 25 µl de PBS sont déposés dans chaque puits. La solution mère de Coelentérazine h (Uptima) (= substrat de la luciférase) est préparée à 1 mM dans de l'éthanol pur puis diluée dans du PBS afin d'être utilisée à 5 µM dans les puits contenant les cellules. L'équipement Mithras LB 940 (Berthold) procède à l'injection de Coelentérazine h dans chacun des puits puis mesure successivement la luminescence associée à l'activité Luciférase (émise à 480 nm) et la fluorescence associée à la eYFP (émise à 540 nm). Des cellules exprimant le donneur BRET en présence de 1 µg de plasmide codant pour une protéine non taguée par l'eYFP et traitées par des concentrations croissantes de BH3-mimétiques (ABT-737 ou WEHI-539) sont utilisées pour la détermination du bruit de fond de BRET de chaque condition de traitement. 6 lectures successives sont réalisées. Pour les analyses, les



données obtenues lors des mesures 4, 5 et 6 sont utilisées. Les données sont recueillies via le logiciel MicroWin 2000 puis exportées vers Microsoft Office Excel 2007 afin d'être analysées. Les courbes concentration/réponse présentées ont été tracées grâce au logiciel Graph Pad Prism.

### Criblage de la Chimiothèque Nationale Essentielle (CNE)

640 molécules chimiques fournies par la Chimiothèque Nationale Essentielle en 8 plaques 96 puits à 10 mM ont été diluées dans du milieu RPMI 1640 pour être utilisées à 10 µM dans le milieu de culture des cellules. La correspondance puits/structure des molécules est inconnue des expérimentateurs au moment du criblage.

Le protocole suivant a été mis en œuvre pour chacune des 8 plaques de molécules à tester. Les cellules HeLa sontensemencées en boîtes de 10 cm de diamètre pour obtenir une densité de 80% de confluence lors de leur transfection. La Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) est utilisée selon les recommandations du fabricant afin de cotransfecter 3 µg par boîte de plasmide codant pour le donneur BRET RLuc-K-RAS et 6 µg de plasmide codant pour l'accepteur BRET eYFP-BCL-xL ou 6 µg de plasmide contrôle BCL-xL CMV. L'efficacité des transfections par eYFP-BCL-xL est estimée à 80 % en microscopie à fluorescence. 48 heures après la transfection, les cellules sont transférées en 4 plaques blanches 96 puits (40000 cellules par puits). 24 heures après ce transfert 40 molécules de la chimiothèque sont testées par plaque, en duplicate, selon le plan suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12										
A	Non traité	40 molécules testées à 10 µM					40 molécules testées à 10 µM					Non traité										
B																						
C	ABT 737																					ABT 737
D	0,1µM																					0,1µM
E	ABT 737																					ABT 737
F	1µM																					1µM
G	ABT 737																					ABT 737
H	10µM																					10µM
	Cellules exprimant K-RAS RLuc/BCL-xL CMV						Cellules exprimant K-RAS RLuc/BCL-xL EYFP															

Les cellules transfectées avec RLuc-K-RAS et BCL-xL CMV permettent de déterminer le bruit de fond BRET pour chaque molécule testée.

La durée du traitement est de 16 heures. L'ABT-737 est utilisé comme molécule contrôle connue pour lier le domaine de liaison aux BH3 de BCL-xL. Les cellules exprimant le donneur BRET en présence de BCL-xL non tagué par la eYFP permettent de déterminer le BRET bruit de fond pour chaque molécule testée. Les procédures de mesure et de calcul du BRET employées sont identiques à celles décrites dans le protocole d'essais de saturation. Les figures montrent les valeurs moyennes obtenues de duplicates sur 3 mesures successives.

### Contre-criblage

27 molécules diminuant le signal BRET RLuc-KRAS/eYFP-BCL-xL de plus de 20 % sont testées sur l'interaction RLuc-BAX/eYFP-BCL-xL dans le but d'écartier les molécules qui auraient une action non sélective sur le couple K-RAS/BCL-xL. 2 µg de plasmide codant pour le donneur BRET RLuc-BAX et 6 µg de plasmide codant pour l'accepteur BRET eYFP-BCL-xL ou 6 µg de plasmide codant pour BCL-xL CMV sont co-transfectés par boîte de

HeLa de 10 cm de diamètre. Le protocole utilisé est ensuite semblable à celui du criblage précédemment décrit.

## Western Blot

Les lysats protéiques pour analyses western-blot sont obtenus en additionnant aux cellules trypsinées du tampon ChIP (SDS 1%, EDTA 10nM, Tris-HCl pH 8,1 50mM, inhibiteurs de phosphatases et protéases Pierce), et en soniquant jusqu'à 3 fois 15min sur glace. Les protéines obtenues sont isolées après dénaturation par électrophorèse sur gel SDS/polyacrylamide, et transférées sur membrane polyvinylidifluorène activée par transfert liquide. Les protéines d'intérêt sont détectées via un complexe anticorps primaire/anticorps secondaire couplé à la HRP (Horse Radish Peroxydase), mis en évidence par l'ajout de substrat de la HRP donnant un produit chemoluminescent (kit Clarity™ western ECL Biorad). L'acquisition numérique est réalisée avec un appareil Chemidoc™ Biorad.

## Anticorps

Les anticorps primaires utilisés en western blot sont les suivants : BCL-xL (1018-1, Abcam), BAX (A3533, Dako), PUMA (D30C10, Cell signaling), BCL-2 (M0887, Dako), BIM (Abcam), BID (AF860, R&D), GFP (Ab290, Abcam), RLuc (GTX47953, GeneTex), K-RAS (05-516, Millipore), pan-RAS (sc-14022, Santa Cruz), ERK1/2 (9102, Cell Signaling), Phospho ERK1/2 (4377, Cell Signaling), AKT (9272, Cell Signaling), Phospho-AKT (4058, Cell Signaling), ACTIN (MAB1501, Millipore), Tubulin- $\beta$  (Sigma-Aldrich), Flag (F1804, Sigma-Aldrich).

Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants : Horseradish peroxidase-conjugated antibodies souris-HRP et lapin-HRP (Jackson IR), Clean-Blot™ IP Detection Reagent (21223, Thermo Scientific)

## Immuno-précipitations

Les cellules sont lysées en tampon doux 1% Chaps + inhibiteurs protéases et phosphatases puis les lysats sont soniqués 3 fois 15 min sur glace. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 15 min à 13 000 g. 500  $\mu$ g de protéines sont utilisés pour l'immuno-précipitation, en utilisant les quantités d'anticorps détaillées ci-dessous, précipités par 30  $\mu$ l de billes magnétiques couplées aux protéines A/G (PureProteome™ Millipore) selon les indications du fabricant. L'élution est réalisée en tampon de dépôt, par chauffage 10 min à 90°C avant western-blot. La révélation se fait en utilisant le clean-blot IP reagent (Pierce) lorsque les isotopes des anticorps primaires sont compatibles.

Anticorps utilisés pour les immuno-précipitations : Flag (F1804, Sigma Aldrich), GFP (Ab290, Abcam), BCL-xL (1018-1, Abcam)

## FACS, double marquage intra-cellulaire

Les cellules HCT116 p21-/- pLVX ou pLVX(BCL-xL) et HCT116 p21-/-PUMA-/- pLVX ou pLVX(BCL-xL) sont cultivées dans du milieu McCoy's 5A (+ glutamine, 10 % de SVF, pénicilline et streptomycine) puis traitées 24 h avec du WEHI-539 (1  $\mu$ M) avant trypsination, lavage au PBS, fixation dans du PBS+formaldéhyde 1% pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées et perméabilisées dans du Méthanol 100 %, 30 min sur glace. Après lavage, les cellules sont incubées dans du PBS 0,5 % BSA pendant 10 min sur glace puis marquées avec les anticorps suivants pendant 1 h sur glace :

- . IgG Rabbit Alexa-488 (#4340S) 1,6 µl de dilution au 16<sup>e</sup> (= 10 ng)
- . IgG Bcl-xL-Alexa-488 (#2767S) 1,6 µl (= 10 ng)
  
- . IgG Mouse Alexa 647 (sc-24636) 1 µl de dilution au 1,5<sup>e</sup> (= 50 ng)
- . IgG Bax-647 (sc-20067) 1 µl (= 50 ng)
  
- . IgG Rabbit Alexa-647 (USBio I1903-93) 1 µl
- . IgG Caspase 3 Alexa-647 (Cell Signaling 9602) 1 µl
  
- . IgG Mouse Alexa 488 (BioLegend 400129) 1 µl
- . IgG Bax Alexa 488 (NBP233092) 1 µl

Les cellules sont ensuite lavées 3 fois dans du PBS 0,5 % BSA puis l'analyse au FACS est effectuée extemporanément.

### **Prolifération cellulaire**

Des cellules HeLa sontensemencées en plaque 96 puits selon une gamme de concentrations (3, 5, 12.5, 25\*10<sup>3</sup> cellules par puits). A h-24 h, les cellules sont privées d'EGF. A h-16 h, les cellules sont traitées par M14 (1 µM) en présence ou en absence d'EGF (20 ng/ml). A h0, le réactif Uptiblue (Uptima) est ajouté au 1/10<sup>e</sup> dans les puits. Les cellules sont incubées 30 min à 37°C avant lecture au fluo-scanner Typhoon (excitation à 530 nm, émission à 590 nm).

### **Pull-down de RAS**

Les cellules sont infectées avec un lentivirus contenant un shBCL-xL 72 h avant leur lyse et la réalisation du pull-down de RAS actif selon le protocole décrit dans le kit « Active Ras Pull-Down and Detection Kit » (Thermo Scientific).

### **Formation de sphères en condition de faible adhérence**

Le milieu de culture utilisé est composé de MEMM (Lonza, réf. CC-3151), MEGM (Lonza, Réf. CC-4136), B27 (Life Technologies, Réf. 17504-044). Les cellules MCF10A KRASV12 sont trypsinées puis tamisées (tamis 40 µm) avant d'êtreensemencées dans des plaques 96 puits low adherence (Corning, ref. 3474) à 4 cellules par puits. Elles sont ensuite traitées extemporanément par 100 nM ou 1 µM de molécule 14 (CNE). Les sphères formées sont comptées une semaine après ensemencement. Des cellules sontensemencées en parallèle dans des plaques 24 puits afin de réaliser des tests de mort en bleu trypan sur des pools de sphères.

### **Culture ex-vivo d'échantillons tumoraux mammaires**

Des échantillons frais de carcinomes mammaires ont été obtenus après résection chirurgicale à l'ICO (Institut de Cancérologie de l'Ouest – Centre René Gauducheau, Nantes). Un consentement a été obtenu de la part des patientes en vue de l'utilisation des échantillons chirurgicaux dans le cadre d'activités de recherche. Les échantillons ainsi obtenus ont été découpés en fines tranches de 250 µm grâce à l'utilisation d'un vibratome (HM650V, Microm Microtech, ThermoFischer Scientific, Illkirch, France). Ces tranches ont ensuite été cultivées 48 h dans un milieu optimisé défini, en présence de la molécule 14 issue de la Chimiothèque Nationale Essentielle. Les échantillons sont ensuite fixés et

marqués à l'aide d'anticorps reconnaissant la CASPASE 3 clivée. Enfin, une analyse immuno-histochimique est réalisée par le Dr Delphine Loussouarn.

### **Pep-Scan**

Des peptides de 12 acides aminés, chevauchants de 2 acides aminés et recouvrant la séquence de BCL-xL ou de K-RAS, sont synthétisés sur une membrane de cellulose. Ces membranes sont ensuite incubées dans une solution de blocage contenant 3 % de BSA et 3 % de lait, à température ambiante pendant 4 h. L'incubation au contact des protéines recombinantes K-RAS, K-RAS-V12 ou BCL-xL se fait à 4°C pendant 16 h dans une solution contenant 3 µg / ml de protéines. Ces protéines recombinantes ont été produites chez E. Coli. Les membranes sont ensuite incubées avec un anticorps primaire anti-K-RAS (2 h à température ambiante) puis avec un anticorps secondaire (1 h à température ambiante) avant révélation.

### **Analyses statistiques**

Les analyses statistiques sont réalisées à partir d'un minimum de trois expériences indépendantes sur le logiciel Prism. Selon les cas, il s'agit de tests t-test, Mann Whitney, ANOVA une voie ou Kruskal Wallis (avec : \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,005$ ).

# Thèse de Doctorat

Jessie PÉCOT

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Biologie Cellulaire

Spécialité : Cancérologie

Unité de recherche : CRCNA - U892

Soutenue le 26 octobre 2015

Thèse N° :

## Dépendance des cellules cancéreuses à BCL-xL

Ciblage thérapeutique du réseau d'interactions PUMA, BAX et BCL-xL  
Effets oncogéniques non canoniques de l'interaction RAS / BCL-xL

### JURY

Rapporteurs :	<b>Stephen MANON</b> , Directeur de recherche, Université de Bordeaux 2 <b>Laurent POULAIN</b> , Directeur de recherche, Université de Caen Basse-Normandie
Examineur :	<b>Pierre Germain GILLET</b> , Professeur des universités, Université Claude Bernard Lyon 1
Directeur de Thèse :	<b>Philippe JUIN</b> , Directeur de recherche INSERM, Université de Nantes
Co-directeur de Thèse :	<b>Fabien GAUTIER</b> , Chargé de recherche, Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO) – Université de Nantes

# Thèse de Doctorat

Jessie PÉCOT

## Dépendance des cellules cancéreuses à BCL-xL

Ciblage thérapeutique du réseau d'interactions BCL-xL/PUMA/BAX  
Effets oncogéniques non canoniques de l'interaction RAS/BCL-xL

### BCL-xL dependence of cancer cells

Targeting of the dynamic BCL-xL/PUMA/BAX network

Oncogenic pathways regulated by the non-canonical RAS/BCL-xL interaction

#### Résumé

La protéine BCL-xL fréquemment surexprimée dans les cancers est impliquée dans la résistance aux chimiothérapies. De nouvelles molécules ciblant cette protéine ont ainsi été développées. Le travail présenté dans le cadre de cette thèse montre que, malgré une spécificité de plus en plus grande de ces molécules, elles restent inefficaces à antagoniser certaines interactions impliquant BCL-xL. Ainsi un traitement au WEHI-539 (ciblant spécifiquement BCL-xL) ne sensibilise pas des cellules surexprimant BCL-xL à une mort dépendante de PUMA, une protéine interagissant avec BCL-xL qui joue un rôle essentiel dans le déclenchement de l'apoptose. Alors que les interactions BAX/BCL-xL répondent au WEHI-539, nos résultats montrent que les interactions PUMA/BCL-xL n'y sont sensibles qu'en dessous d'un certain seuil d'expression de BCL-xL, au-delà duquel la survie des cellules est maintenue par des complexes PUMA/BCL-xL résistants aux BH3-mimétiques.

Ces données soulignent l'importance de la compréhension du rôle joué par ce réseau d'interactions impliquant les membres de la famille de BCL-2, en particulier BCL-xL, dans le contexte du développement tumoral. L'autre partie de ce travail est ainsi consacrée à l'étude des conséquences fonctionnelles de l'interaction entre BCL-xL et l'oncogène RAS qui demeurent largement inconnues bien que des travaux lui attribuent des effets oncogéniques. Pour ce faire, nous avons développé des approches de BRET et de pep-scan en vue de mieux caractériser cette interaction d'un point de vue structurel et fonctionnel.

#### Mots clés

Famille BCL-2, Apoptose, BH3-mimétiques, RAS

#### Abstract

BCL-xL plays a role in chemoresistance that needs to be overcome. We show here that currently available BH3-mimetics do not efficiently derepress BCL-xL inhibition of BAX-mediated cell death induced by PUMA, a major pro-apoptotic effector of chemotherapy. Live cell measurements of protein-protein interactions reveal that BH3-mimetics readily inhibit BAX interactions with BCL-xL and the effects of BCL-xL on BAX oligomerization but that PUMA interactions with BCL-xL are highly resistant. Thus, PUMA only favors BAX oligomerization/activation and induction of cell death in response to BH3-mimetics when BCL-xL expression is limiting. Mutagenesis studies show that the robustness of PUMA/BCL-xL interactions is due to the avidity of the PUMA BH3 domain for mitochondrial BCL-xL. This has important consequences for the design of strategies combining PUMA-inducing genotoxics and BCL-xL inhibitors, and argues that mitochondrial membranes *per se* influence treatment outcome.

BCL-xL does not only function as guardian of mitochondrial permeability. Non-canonical effects and functions of this protein have been described, as its interaction with the RAS oncogene. Some studies suggest the oncogenic effects of the BCL-xL/RAS interaction. However, its functional consequences remain unknown. So we have used BRET and pep-scan assays in order to structurally and functionally characterize this interaction.

#### Key Words

BCL-2 family, Apoptosis, BH3-mimetics, RAS