

Thèse de Doctorat

Maëva GUILLONNEAU

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

École doctorale : Biologie Santé – ED502

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Unité de recherche : Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers - UMR U892
Centre de recherche du CHU de Québec

Soutenue le 15 décembre 2015

Etude de la nucléophosmine, nouvelle protéine associée à p38 MAPK, dans la réponse des cellules endothéliales à un stress oxydant aigu

JURY

Rapporteurs :	Corinne DUPUY , Directeur de Recherche CNRS, Institut Gustave Roussy, UMR CNRS 8200 Laurent MOREL , Professeur, Université de Clermont, GReD, UMR CNRS 6293 – INSERM U1103
Examineurs :	Béatrice CHARREAU , Docteur, Université de Nantes, CRTI, UMR INSERM 1064 Jean-Yves MASSON , Professeur, Université Laval, Centre de Recherche du CHU de Québec
Directeurs de Thèse :	François PARIS , Directeur de Recherche INSERM, CRCNA, UMR INSERM 892 – CNRS 6299 Jacques HUOT , Professeur, Université Laval, Centre de Recherche du CHU de Québec
Co-directeur de Thèse :	Isabelle CORRE , Chargé de Recherche CNRS, CRCNA, UMR INSERM 892 – CNRS 6299

Résumé

Le compartiment microvasculaire est une cible importante du stress oxydant qui est un facteur majeur de la dysfonction endothéliale, notamment au cours d'exposition aux rayonnements ionisants. L'altération de l'endothélium induite par le stress oxydant est impliquée dans la toxicité radio-induite des tissus sains. Limiter les dysfonctions endothéliales est donc un enjeu important des traitements radiothérapeutiques actuels. Cet objectif nécessite une meilleure caractérisation de la signalisation du stress oxydant dans les cellules endothéliales. La voie p38 MAPK est incontournable dans la réponse au stress oxydant mais reste encore insuffisamment caractérisée. Par une approche protéomique, nous avons identifié la nucléophosmine (NPM) comme nouveau partenaire de p38 dans le cytoplasme des cellules endothéliales. La phosphatase PP2a est aussi associée à ce complexe NPM/p38. Nos travaux montrent que le stress oxydant (H_2O_2 , 500 μ M) régule la déphosphorylation de NPM via PP2a, entraîne sa dissociation rapide du complexe et favorise sa translocation vers le noyau. De plus, nous montrons que la présence de NPM déphosphorylée au noyau altère la réponse des cellules aux dommages à l'ADN induits par le stress oxydant. Le céramide sphingolipide membranaire est également un facteur important des voies de stress, particulièrement dans les cellules endothéliales. Notre étude aborde donc l'implication de ce sphingolipide dans la régulation de la voie NPM/p38. Une meilleure caractérisation de la voie p38 et de ses acteurs permettra d'identifier de potentielles cibles afin de limiter les dysfonctions endothéliales et leurs conséquences délétères sur les tissus environnants.

Mots clés

Endothélium – stress oxydant – p38 MAPK – nucléophosmine – PP2a - céramide

Abstract

The microvascular compartment is a significant target of oxidative stress that is a major factor in endothelial dysfunction, especially during exposure to ionizing radiation. The alteration of endothelium induced by oxidative stress is involved in radiation-induced toxicity of normal tissues. Limiting endothelial dysfunction is therefore an important issue of current radiotherapeutic treatments. This objective requires a better characterization of oxidative stress signaling in endothelial cells. p38 MAPK pathway is essential in oxidative stress response but still insufficiently characterized. By using a proteomic approach, we identified nucleophosmin (NPM) as a new partner of p38 in the cytoplasm of endothelial cells. PP2a phosphatase is also associated with the NPM/p38 complex. Our work shows that oxidative stress (H_2O_2 , 500 μM) regulates the NPM dephosphorylation via PP2a, causes a rapid dissociation of the complex, and promotes its translocation to the nucleus. In addition, we show that the presence of NPM dephosphorylated at T199 in the nucleus alters the cellular response to DNA damage induced by oxidative stress. The membrane sphingolipid ceramide is also an important factor in stress pathways, particularly in endothelial cells. Our study describes the involvement of this sphingolipid in the regulation of NPM/p38 pathway. A better characterization of the p38 pathway and its actors provided by our study will identify potential targets in order to limit endothelial dysfunction and its deleterious effect on surrounding tissues.

Key Words

Endothelium – oxidative stress – p38 MAPK – nucleophosmin – PP2a – ceramide

Remerciements

Je souhaite remercier en premier lieu les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie mes rapporteurs, le Dr Corinne Dupuy et le Dr Laurent Morel. Merci également au Dr Béatrice Charreau et au Dr Jean-Yves Masson d'avoir accepté d'être mes examinateurs.

Je remercie également mes directeurs de thèse, Dr François Paris et Dr Jacques Huot. Je les remercie de m'avoir accordée leur confiance pour la conduite de ce projet. Merci pour vos conseils, vos encouragements, votre gentillesse et merci de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse en cotutelle, ce qui a été pour moi une incroyable expérience.

Je souhaite aussi remercier très chaleureusement ma co-directrice de thèse, le Dr Isabelle Corre. Merci de m'avoir soutenue tout au long de ce travail de thèse et d'avoir cru en moi. Merci de m'avoir accompagnée dans toutes les difficultés que peut compter la thèse, pour ses précieux conseils, ses encouragements et merci de m'avoir aidé à surmonter mes doutes et mes angoisses. J'ai conscience de la grande chance que j'ai eu de l'avoir comme directrice de thèse. Merci et bonne chance pour tes futurs projets.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'unité et des plateformes. En particulier, merci à Stéphanie Desevedavy, Philippe Hulin, et Steven Nedellec. Merci pour votre expertise, votre disponibilité et votre bonne humeur. Merci également aux personnes avec qui j'ai partagé mes repas du midi, merci pour vos discussions qui ont agrémenté nos pauses du midi.

Je remercie également les personnes que j'ai pu côtoyer au sein de l'équipe 14 à Nantes. Un grand merci aux anciens et aux nouveaux membres de l'équipe 14 qui m'ont accompagnée, encouragée mais également supportée. Merci pour vos discussions, vos conseils mais surtout pour votre bonne humeur. C'était un réel plaisir de travailler avec vous.

Merci aux Dr Stéphane Supiot, Dr Stéphane Birklé et à Catherine. Merci à mes colloc de bureau, Audrey, Nolwenn, Rym, Vincent, Charlotte et Soizic. Merci de ne pas m'avoir oubliée à mon bureau, cachée derrière les blouses. Ça été une joie de partager ce module de travail avec vous. Merci pour les pauses café et pour les discussions qui les ont accompagnées. Merci également à la relève, Charlotte et Julien pour votre bonne humeur, bonne chance pour la suite de votre thèse. Merci tout particulièrement à Charlotte et Soizic pour avoir traversé avec moi les joies du western blot. Je remercie également Manon pour sa bonne humeur et Denis pour sa fameuse chanson qui reste dans la tête quand je venais dans son module. Un grand merci également à Elise pour son aide précieuse dans ce projet de thèse.

Je souhaite également remercier Sarah, Halla et Jérémy qui ont également contribué à ce projet. Merci d'avoir été des stagiaires d'exception, ça été un réel plaisir de travailler avec vous. Je vous souhaite bonne chance et bon courage dans vos études et la poursuite de vos projets.

Un grand merci également aux Québécois. Merci d'avoir fait de mon année passée avec vous une année exceptionnelle et inoubliable. Je remercie, les laboratoires du centre de recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec pour m'avoir permis l'accès à du matériel nécessaire à l'accomplissement de ce projet. Merci à Karl pour son expertise et sa disponibilité, ainsi que pour ses discussions pertinentes pour les pronostics lors de la coupe du monde de soccer. Merci également aux membres de l'équipe du Dr Jean-Yves Masson, en particulier merci à Yan Coulombe pour son aide et ses conseils précieux sur les techniques d'immunofluorescence. Je remercie également mes voisines de labo, Marine, Manu et Geneviève, je vous souhaite bonne chance et bon courage dans la suite de vos projets. Merci infiniment à Bryan pour sa bonne humeur communicative, sa disponibilité, son aide inconditionnelle. Merci également de m'avoir initiée à la chanson et au vocabulaire Québécois. Merci également à Liang alias « Michel Jones » pour son optimisme et sa bonne humeur. Je te souhaite beaucoup de réussite pour ta thèse. Je souhaite également remercier chaleureusement François Houle. Merci pour m'avoir énormément appris lors des mes stages chez Dr Huot, merci pour tous ses conseils avisés et ses discussions très enrichissantes.

Merci également à Nicolas. Cette année passée au Québec m'aura permis de faire de belles rencontres et de créer de nouveaux liens d'amitié. Merci Nico de nous avoir fait découvrir ton île, l'Isle aux Coudres, vos recettes et vos coutumes traditionnelles. J'espère qu'on aura l'occasion de se revoir.

Merci également à mes amis Montréalais d'adoption, Déborah et Vincent dont l'année passée au Québec nous aura permis de nous retrouver. Merci pour tous ces week-ends passés ensemble, grâce à vous on a pu découvrir des endroits magnifiques. Je pense que nos vacances de Noël resteront à jamais gravées dans nos mémoires avec « super Pontiac », ainsi que bien d'autres péripéties comme notre petit week-end avec Jessie et Sophie !

Je remercie également mes amis Nantais. Merci à tous les membres des thésards anonymes. Merci à Pierre, Charlotte, Kristell, Jessie et Leslie d'avoir ouvert le bal et de nous avoir démontré qu'on survit après la thèse. Bon courage à Cassie, Romain, Allan, Valentin, Carole et Sophie qui suivront. Merci à tous pour m'avoir soutenue, accompagnée, et encouragée tout au long de ce parcours. Je vous souhaite à tous bonheur et réussite dans vos projets personnels et professionnels. Malgré les embûches de la thèse, elle permet également de créer des liens forts et sincères d'amitié. J'espère que nous aurons l'occasion de nous retrouver.

Merci également à mes amis Vendéens. Merci pour votre soutien et vos encouragements. Merci d'avoir toujours été là, même quand nous étions à l'autre bout de l'océan atlantique. Un grand merci à Myriam, Benoit, Fabien et David d'être venus nous rendre visite au Québec. Nous avons passé des moments inoubliables.

Enfin, un immense merci à toute ma famille sans qui je ne serais pas qui je suis aujourd'hui. Un grand merci à mes parents d'avoir toujours été là, de m'avoir accompagnée dans tous mes choix, de m'avoir encouragée, soutenue. Merci pour m'avoir accueillie de nouveau chez vous lors de ma rédaction, de m'avoir préparé un petit coin rien que pour moi et de bons petits plats. Je vous serais éternellement reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci également à ma sœur, Elisa et son mari Jean-Pascal, ainsi qu'à mes petites nièces qui venaient me rendre visite quand « je faisais mes devoirs ».

Je remercie également chaleureusement mon conjoint, Jérôme pour m'avoir soutenue, pour ces encouragements et de toujours avoir été là pour me remonter le moral. Merci également de m'avoir suivie jusqu'au Québec afin de partager avec moi cette année inoubliable. Heureusement que tu as toujours été à mes côtés pour m'éviter de m'égarer dans mes périodes de doutes.

J'oublie sûrement des personnes, mais je vous remercie tous chaleureusement.

Je suis profondément reconnaissante envers toutes les personnes qui ont pu contribuer à l'accomplissement de ce projet.

Sommaire

Résumé	III
Abstract	IV
Remerciements.....	V
Sommaire	IX
Liste des figures	XIV
Figures	XIV
Figures supplémentaires	XV
Liste des abréviations	XVI
Préambule	XX
Partie 1 : Introduction	1
I- L'endothélium	1
1- Structure de l'endothélium	1
a- Les vaisseaux sanguins	1
b- Les cellules endothéliales	2
2- Les fonctions de l'endothélium	3
a- Le tonus vasculaire	3
b- La perméabilité.....	4
c- La thrombo-résistance et l'hémostase.....	5
d- L'inflammation.....	6
e- L'angiogénèse.....	6
II- Stress oxydant et radiations ionisantes	8
1- Le stress oxydant.....	8
a- Définition.....	8
b- Les espèces réactives de l'oxygène : ROS	9
c- Sources de production des ROS.....	9
- Sources endogènes	9
- Source exogène : les rayonnements ionisants	10
- Autres sources exogènes	12
d- Régulation du stress oxydant.....	12
- Antioxydants enzymatiques	13
- Antioxydants non-enzymatiques	14

e-	Rôle du stress oxydant dans la signalisation cellulaire.....	15
-	Les ROS comme messagers secondaires	15
-	Régulation des protéines de signalisation par les ROS	16
-	Régulation des facteurs de transcription par les ROS	19
-	Régulation de la dégradation des protéines.....	19
2-	Les rayonnements ionisants	20
a-	Généralités	20
b-	Effets biologiques des rayonnements ionisants.....	21
-	Effet direct / effet indirect	21
-	Effet sur les acides nucléiques : dommages à l'ADN	22
-	Effets sur les lipides et les protéines : dommages membranaires	24
-	Effet sur le métabolisme d'oxydation/réduction	26
c-	Réponses cellulaires.....	26
-	Effet sur le cycle cellulaire.....	26
-	Réparation des dommages à l'ADN.....	28
d-	La mort cellulaire radio-induite.....	32
-	L'apoptose.....	32
-	La nécrose	35
-	L'autophagie.....	35
-	La mort mitotique.....	36
e-	La sénescence radio-induite.....	36
f-	Utilisation des rayonnements ionisants en radiothérapie	37
-	Généralité sur la radiothérapie	37
-	Radiotoxicité aux tissus sains.....	38
	III- Réponse de l'endothélium au stress oxydant.....	40
1-	La cellule endothéliale participe à la production de ROS	40
a-	La NADPH oxydase endothéliale (NOX)	41
b-	La NO synthétase endothéliale (eNOS)	42
c-	La xanthine oxydase (XO).....	42
2-	Réponse au stress oxydant.....	43
a-	Effets délétères du stress oxydant sur la cellule endothéliale.....	43
-	Déséquilibre du tonus vasculaire.....	43
-	Augmentation de la perméabilité	43
-	Augmentation de l'adhésion.....	45

- L'apoptose	45
- La sénescence endothéliale	45
b- Conséquences tissulaires de la dysfonction endothéliale	46
- L'athérosclérose	46
- L'hypertension	47
- Processus métastatique	47
3- Cas particulier des fortes doses d'irradiation : rôle de l'endothélium.....	48
a- Les principales avancées de la radiothérapie externe	48
b- Radiosensibilité des cellules endothéliales.....	49
- L'activation de l'endothélium	49
- La mort radio-induite des cellules endothéliales.....	51
- La sénescence prématurée radio-induite des cellules endothéliales.....	52
c- Rôle de la dysfonction endothéliale dans le développement des dommages tissulaires radio-induits.....	53
IV- Les protéines p38 MAPK : protéines clés dans la réponse au stress oxydant ..	55
1- Généralités sur les MAPKs	55
2- La voie p38 MAPK	56
a- Les isoformes de la famille p38 MAPK	56
b- Régulation de la voie p38	57
- L'activation	57
- L'inactivation	59
- La localisation sub-cellulaire	60
c- Les principaux substrats de la voie p38	61
- Substrats nucléaires	61
- Substrats cytosoliques	61
3- Les fonctions biologiques de p38 : voie essentielle dans le maintien de l'homéostasie.....	62
a- Inflammation et réponse immunitaire.....	63
b- Croissance et différenciation cellulaire.....	64
c- Régulation de la migration cellulaire : réorganisation du cytosquelette.....	64
4- La voie p38 essentielle dans la réponse au stress oxydant.....	65
a- Activation de p38 par le stress oxydant (Figure 1-20)	65
b- Rôle de p38 dans l'apoptose.....	67
c- Rôle de p38 dans la sénescence	67

5- La spécificité de la voie p38.....	68
V- La Nucléophosmine.....	70
1- Généralités.....	70
a- Structure.....	70
b- Régulation	71
- La phosphorylation.....	71
- Interactions protéiques	72
2- Fonctions de NPM.....	73
a- Fonctions nucléaires	73
- Régulation de la transcription	73
- Régulation de la traduction	74
- Maintien de l'intégrité du génome via la réparation des dommages à l'ADN	74
b- Fonctions cytoplasmiques	75
- Régulation du cycle cellulaire via la duplication des centrosomes	75
- Rôle dans des voies de signalisation	75
3- Rôle de NPM dans la cellule endothéliale	76
4- NPM impliquée dans la réponse au stress.....	77
a- L'apoptose	77
b- La sénescence	78
Partie 2 : Problématiques et objectifs.....	79
Partie 3 : Article	81
La dissociation du complexe p38/NPM/PP2a induite par le stress oxydant conduit à la modulation la signalisation des dommages à l'ADN par NPM.....	81
I- Avant-propos	81
II- Résumé.....	82
III- Contexte et enjeux.....	83
IV- Article.....	84
V- Conclusion	127
Partie 4 : Résultats complémentaires	129
Implication du céramide dans la voie p38 activée par le stress oxydant dans les cellules endothéliales	129
I- Introduction.....	129
II- Matériels et méthodes	131

III- Résultats.....	133
1- Le stress oxydant induit la génération de céramide dans les cellules endothéliales	133
2- L'activation de p38 en réponse au stress oxydant est dépendante de la voie ASMase/céramide	135
3- La voie ASMase/céramide module l'interaction NPM/p38 dans les cellules endothéliales.....	135
IV- Discussion.....	138
Discussion générale.....	141
Conclusion générale	155
Perspectives.....	156
Références	157
Annexes.....	191
Listes des publications.....	191
Communications scientifiques.....	192
Revue : « Membrane Signaling Induced by High Doses of Ionizing Radiation in the Endothelial Compartment. Relevance in Radiation Toxicity »	193

Liste des figures

Figures :

- Figure 1-1** : La structure des vaisseaux sanguins et localisation de l'endothélium
- Figure 1-2** : Les principales fonctions physiologiques de l'endothélium
- Figure 1-3** : Le stress oxydant induit par un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants
- Figure 1-4** : La production exogène des ROS par radiolyse de l'eau
- Figure 1-5** : Les principaux mécanismes de régulation du stress oxydant
- Figure 1-6** : Les principaux mécanismes de régulation des voies de signalisation par les ROS
- Figure 1-7** : Les effets directs et indirects des rayonnements ionisants
- Figure 1-8** : Les principaux dommages à l'ADN et systèmes de réparation
- Figure 1-9** : La régulation du cycle cellulaire par les voies ATM, ATR et DNA-PK en réponse aux dommages à l'ADN
- Figure 1-10** : Les voies de réparations HR et NHEJ en réponse aux cassures double brin de l'ADN (DSB)
- Figure 1-11** : Les principales voies apoptotiques radio-induites
- Figure 1-12** : Les sources endothéliales de ROS
- Figure 1-13** : Le mécanisme de dérégulation de la perméabilité endothéliale en réponse au stress oxydant
- Figure 1-14** : Les enjeux de la radiothérapie
- Figure 1-15** : Les principaux effets des radiations ionisantes sur l'endothélium
- Figure 1-16** : La voie du céramide impliquée dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales
- Figure 1-17** : La voie canonique d'activation des MAPKs
- Figure 1-18** : La voie canonique d'activation de p38 MAPK
- Figure 1-19** : Les principales fonctions de la voie p38 MAPK
- Figure 1-20** : Les principaux mécanismes d'activation de la voie p38 par les ROS
- Figure 1-21** : La structure en multi-domaines de la nucléophosmine (NPM)
- Figure 1-22** : Les principaux résidus phosphorylés et leurs kinases potentielles, impliquées dans la régulation de NPM

Figure 3-1 : Identification of an interaction between NPM and p38 that is regulated by oxidative stress

Figure 3-2 : Activation of p38 induced by oxidative stress is not regulated by NPM

Figure 3-3 : Phosphorylation of NPM is not regulated by p38

Figure 3-4 : Dephosphorylation of NPM is dependent on PP2A in condition of oxidative stress

Figure 3-5 : NPM/p38 interaction depends on PP2a phosphatase activity

Figure 3-6 : NPM dephosphorylated at T199 translocates to the nucleus upon oxidative stress

Figure 3-7 : NPM dephosphorylated at T199 leads to impaired DDR signaling

Figure 3-8 : Proposed model of the regulation and role of NPM/p38 complex in endothelial cell signaling induced by oxidative stress

Figure 4-1 : Les cellules HUVEC expriment l'ASMase dans les fractions enrichies en membranes/cytosol

Figure 4-2 : Le traitement des cellules HUVEC par l'ASMase ou par H₂O₂ entraîne la production de céramides intracellulaires

Figure 4-3 : L'ASMase, comme le stress oxydant, induit la phosphorylation de p38. L'inhibition de l'ASMase diminue fortement l'activation de p38 par le stress oxydant

Figure 4-4 : Le complexe NPM/p38 présent dans les cellules HUVEC à l'état basal diminue rapidement en condition de stress oxydant. L'inhibition de l'ASMase bloque cette dissociation

Figure 6-1 : Modèle proposé pour la régulation de la voie p38/NPM/PP2a par le stress oxydant dans les cellules endothéliales

Figures supplémentaires :

Figure S3-1 : Quality control of fractionation

Figure S3-2 : Dephosphorylation of NPM in response to several stress stimuli

Figure S3-3 : Expression of NPM T199A and NPM T199D proteins in HUVECs

Liste des abréviations

4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
AMPc	Adénosine Mono-Phosphate cyclique
AMPK	<i>AMP-activated protein Kinase</i>
ASMase	Sphingomyélinase acide
ANG-II	Angiotensine II
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
APE1	<i>A-purinic/A-pyrimidic Endonuclease 1</i>
ARE	<i>AU-Rich Element</i>
Ask1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATF2	<i>AMP-dependent Transcription Factor 2</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated protein</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein</i>
ATRIP	<i>ATR-Interacting Protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BER	<i>Base Excision Repair</i>
BH4	Tetrahydrobiopterine
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BRCA	<i>Breast cancer</i>
CAPP	<i>Ceramide-Activated Protein Phosphatase</i>
Cdc2	<i>Cell division control 2</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependant Kinase</i>
Chk1/2	<i>Checkpoint kinase 1/2</i>
CHOP	<i>C/EBP homology protein</i>
CKII	Casein Kinase II
CMLV	Cellule Musculaire Lisse Vasculaire
COX-2	Cyclo-oxygenase 2
CREB	<i>cAMP Response Element Binding protein</i>
CRM1	<i>Chromosome Region Maintenance 1</i>
CtIP	<i>C-terminal binding protein-interacting protein</i>
CXCL12	<i>Chemokine (C-X-C Motif) ligand 12</i>
CXCR4	<i>Chemokine (C-X-C Motif) receptor 4</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent Protein Kinase</i>
DNA-PKcs	<i>DNA-PK catalytic subunit</i>
DR 4/5	<i>Death Receptor 4/5</i>
DSB	<i>Double Strand Break</i>
DUPS	<i>Dual specificity phosphatases</i>
EGCG	Epigallocatechine gallate
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGF-R	<i>Epidermal Growth Factor-Receptor</i>
eNOS	NO-synthase endothéliale
ERK1/2	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase 1 et 2</i>
ET-1	Endothéline 1
EXO1	Exonuclease 1
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factors</i>
GMPc	Guanosine Mono-Phosphate cyclique

GPx	Glutathione Peroxydase
GSH	Glutathion
GST	Glutathione-S-Transférase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HBP1	<i>HMG Box-containing Protein 1</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-Inducible Factor-1</i>
HMG	<i>High Mobility Group</i>
HR	<i>Homologous Recombination</i>
Hsp27	<i>Heat Shock Protein 27</i>
ICAM-1/2	<i>Intracellular adhesion molecule 1/2</i>
IFN γ	Interferon gamma
IGRT	<i>Image Guided Radiotherapy</i>
IL-1 β	Interleukine 1 beta
IMRT	<i>Intensity Modulated Radiotherapy</i>
JIP	<i>JNK-Interacting Proteins</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KSR	<i>Kinase Suppressor of Ras</i>
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LIG1/3	<i>DNA ligase 1/3</i>
LIMK-1	<i>LIM domain Kinase 1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MDA	Malondialdehyde
Mdm2	<i>Mouse double minute 2</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MK2	<i>MAPK-activated protein kinase 2</i>
MKK	MAPK kinase
MKKK	MAPK kinase kinase
MKP	MAPK phosphatase
MLC	<i>Myosin Light Chain</i>
MLCK	<i>Myosin Ligth Chain Kinase</i>
MNK	<i>MAPK interacting protein kinase</i>
MRN	Mre11, Rad50, NBS1
MSK	<i>Mitogen and Stress-activated Kinase</i>
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NBS1	<i>Nijmegen Breakage Syndrome 1</i>
NekA2	<i>Nuclear kinase A2</i>
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-kappaB</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
nm	Nanomètre
NO	Monoxyde d'azote
NO ₂	Dioxyde d'azote
NOS	NO-synthase
NOX	NADPH oxydase
NPM	Nucléophosmine
Nrf2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
NuLS	<i>Nucleolar Localization Signal</i>

O ₂	Oxygène moléculaire
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
OH [•]	Radical hydroxyle
ONOO ⁻	Peroxynitrite
OSM	<i>Osmosensing Scaffold for MKKK3</i>
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PARK	<i>p38-regulated/activated kinase</i>
PARP	<i>Poly-ADP Ribose Polymerase</i>
PCAM	<i>Platelet endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PGI ₂	Prostacycline
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI3KK	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase related kinase</i>
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
Plk1	Polo-like kinase 1
PNK	Polynucléotide kinase
PNKP	Polynucléotide kinase 3'-phosphate
RACK1	<i>Receptor for Activated C Kinase 1</i>
RANK	<i>Receptor Activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>RANK Ligand</i>
RB1	<i>Retinoblastoma-associated protein 1</i>
Redox	Oxydation/réduction
RIT	Radioimmunothérapie
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPA	<i>Replication Protein A</i>
S1P	Sphingosine-1 Phosphate
SAPK	<i>Stress Activated Protein Kinase</i>
SASP	<i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>
SBRT	<i>Stereotactic Body Radiation Therapy</i>
SOD	Superoxide dismutase
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAB1	<i>TAK1-binding protein 1</i>
TAK1	<i>TGFβ-activated kinase 1</i>
TF	<i>Tissue Factor</i>
TFIIH	<i>Transcription Factor II H</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNF-R1	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i>
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
tPA	<i>Tissue Plasminogen Activator</i>
TPL2	<i>Tumor Progression Loci 2</i>
TRAF6	<i>TNF Receptor Associated Factor 6</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRX	Thioredoxine
uPA	<i>Urokinase Plasminogen Activator</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>

VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGF-R	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor</i>
Wip1	<i>Wild-type p53 induced phosphatase 1</i>
XLF	<i>XCCR4 Like Factor</i>
XO	<i>Xanthine Oxydase</i>
XP	<i>Xeroderma Pigmentosum</i>
XRCC4	<i>X-ray Repair Cross-Complementing protein 4</i>
ZAP70	<i>ξ-chain-associated protein kinase of 70 kDa</i>

Préambule

L'environnement est une source exogène importante favorisant le stress oxydant (pollution, tabac, UV). Les radiothérapies utilisant les rayonnements ionisants sont une autre source majeure de stress oxydant. Ce dernier est impliqué dans le vieillissement et peut être à l'origine de nombreuses pathologies cardiovasculaires, comme l'hypertension et l'athérosclérose. L'endothélium qui constitue la paroi interne des vaisseaux sanguins est particulièrement sensible au stress oxydant. Il a pu être montré que, dans des conditions de stress oxydant radio-induit, le réseau vasculaire joue un rôle clé dans la réponse des tissus à l'irradiation.

L'irradiation permettant la destruction des cellules tumorales entraîne aussi des lésions du tissu sain avoisinant. Cette radio-toxicité du tissu sain péri-tumoral, constitue aujourd'hui la principale limite à l'amélioration de l'efficacité de la radiothérapie, dont bénéficie plus de la moitié des patients atteints de cancer. Aussi, un des enjeux majeurs de la radiothérapie actuelle est de cibler efficacement la tumeur tout en limitant la dose reçue au tissu sain avoisinant. De nombreuses avancées technologiques ont permis un meilleur ciblage de la tumeur et une meilleure distribution de la dose d'irradiation. Malgré cela, il reste néanmoins essentiel de comprendre la biologie des effets délétères de l'irradiation sur les tissus sains afin de pouvoir prévenir, maîtriser et/ou traiter cette toxicité radio-induite.

Il a pu être établi que la protection de l'endothélium des effets délétères de l'irradiation permet de prévenir cette radio-toxicité. Afin, donc de limiter les dommages de l'endothélium et ses conséquences sur les tissus sains, il est maintenant crucial de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant massif induit par l'irradiation. L'équipe de recherche « Radiobiologie et ciblage de l'endothélium » dirigée par le Dr François Paris au sein du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers s'intéresse plus particulièrement à comprendre cette implication du compartiment endothélial dans la réponse des tissus à la radiothérapie. L'équipe de recherche du Dr Jacques Huot, au sein du Centre de Recherche de l'Hôtel de Dieu de Québec, travaille depuis plusieurs années sur la caractérisation et l'implication des voies de réponse au stress dans les cellules endothéliales.

Mon travail de thèse, effectué dans le cadre d'une cotutelle entre l'université Laval et l'université de Nantes et les laboratoires du Dr François Paris et du Dr Jacques Huot, a donc eu pour objectif l'étude et la caractérisation de voies moléculaires impliquées dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant tel que celui observé dans le cadre des radiothérapies. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la voie p38 MAPK, voie de signalisation régulant d'importantes fonctions cellulaires liées au stress et plus particulièrement dans les cellules endothéliales.

Partie 1 : Introduction

I- L'endothélium

L'endothélium est un tissu ubiquitaire essentiel, tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguin de l'ensemble du réseau vasculaire. Il est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales située à l'interface du sang et des tissus. Ce tissu est impliqué dans l'homéostasie tissulaire et vasculaire dont toute dérégulation peut conduire à d'importantes dysfonctions (Vane et al., 1990).

1- Structure de l'endothélium

a- Les vaisseaux sanguins

Le réseau vasculaire permet l'apport des nutriments, des facteurs de croissance, le drainage des déchets métaboliques et les échanges gazeux entre le sang et les tissus irrigués. Ce réseau se divise en trois types de vaisseaux dont la structure diffère selon leurs fonctions : les artères et les veines, les macrovaisseaux assurant le transport du sang dans tout l'organisme et les capillaires, microvaisseaux assurant l'irrigation au sein des tissus (Figure 1-1) (Alberts et al., 2002).

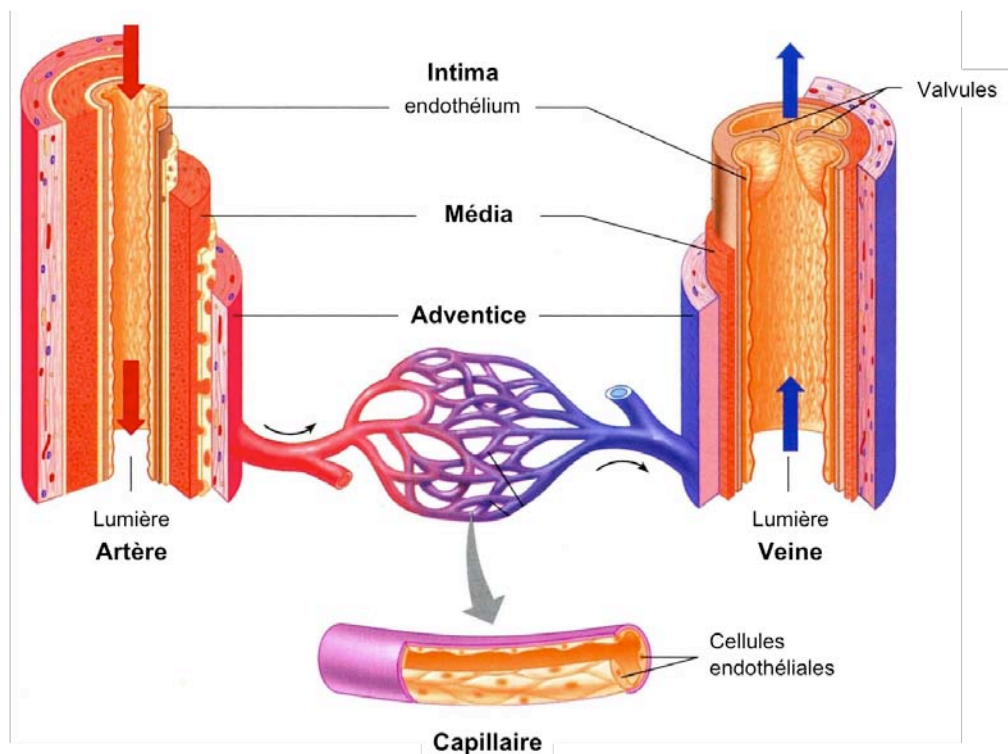


Figure 1-1 : La structure des vaisseaux sanguins et localisation de l'endothélium

Les artères, transportant le sang oxygéné vers les organes, sont soumises à des variations de débit et de pression. Elles sont donc élastiques afin de pouvoir se distendre et se contracter. Les artères sont composées de trois couches : l'intima, couche la plus interne constituée d'une monocouche de cellules endothéliales et d'une lame basale, la média composée de cellules musculaires lisses, de fibres élastiques et de matrice extracellulaire permettant de contrôler la vasodilatation et la vasoconstriction, et l'adventice, couche la plus externe composée principalement de collagènes et de fibroblastes.

Les veines, ramenant le sang désoxygéné vers le cœur, sont soumises à moins de pression. Elles sont donc beaucoup moins élastiques et présentent des valvules pour faciliter le retour veineux. Comme pour les artères, les veines sont constituées de 3 couches : l'intima, la média et l'adventice.

Les capillaires sont les plus petits vaisseaux du réseau vasculaire reliant le système artériel au système veineux. Ils sont le siège des échanges gazeux et de nutriments entre le sang et les cellules de l'organisme. Les capillaires, contrairement aux macrovaisseaux, sont composés uniquement d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale.

b- Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont des cellules très aplaties polarisées reliées entre elles par des jonctions inter-cellulaires. Elles dérivent des cellules du mésoderme qui se différencient rapidement en angioblastes lors de l'embryogénèse pour donner un réseau tubulaire primaire par le processus de vasculogénèse. Ce premier réseau se développe ultérieurement par angiogénèse pour former le réseau vasculaire mature et complexe de l'adulte (Risau, 1997).

Chez l'adulte, le réseau vasculaire est généralement stable et quiescent, les cellules endothéliales ont donc une fréquence de renouvellement faible, mais peuvent cependant être soumises à une prolifération physiologique lors du processus de cicatrisation ou pathologique telle que l'angiogénèse tumorale (Carmeliet and Jain, 2011). De plus, ces cellules sont soumises à un stress environnemental permanent dû au flux sanguin qui provoque des forces de cisaillement et aux molécules circulantes comme les facteurs de croissance, les molécules inflammatoires et thrombotiques. Du fait de l'expression à leur surface de nombreux récepteurs, les cellules endothéliales sont capables de répondre très rapidement à tous ces différents stimuli afin de maintenir

l'homéostasie tissulaire. Les cellules endothéliales ne forment donc pas uniquement une simple barrière inerte entre le sang et les tissus, mais elles ont de multiples fonctions (Pober et al., 2009).

2- Les fonctions de l'endothélium

En réponse à diverses molécules (hormones, cytokines) mais aussi aux cellules circulant dans le sang, ainsi qu'en réponse à divers stimuli physiques et chimiques (changements de pression, de pH, contrainte de cisaillement), les cellules endothéliales synthétisent et libèrent divers facteurs modulant le tonus vasculaire, la perméabilité, l'hémostase, la réponse inflammatoire, mais aussi l'angiogénèse afin de maintenir l'homéostasie vasculaire et tissulaire (Félétou and Vanhoutte, 2006) (Figure 1-2).

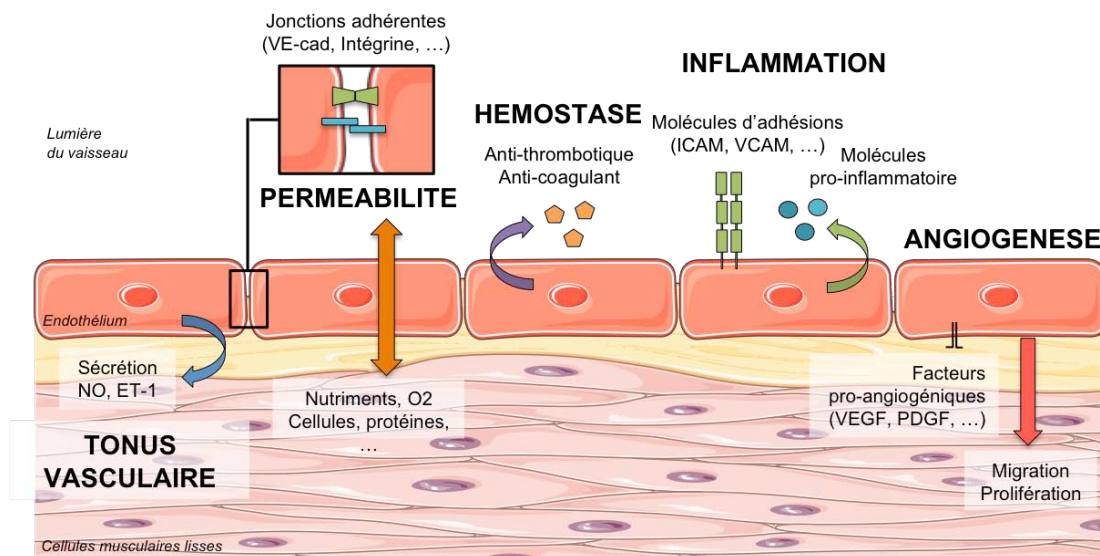


Figure 1-2 : Les principales fonctions physiologiques de l'endothélium

a- Le tonus vasculaire

Les cellules endothéliales participent au contrôle du tonus vasculaire en régulant la vasoconstriction et la vasodilatation des macrovaisseaux grâce à la sécrétion de facteurs de contraction ou de relaxation agissant sur les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

En condition normale, la cellule endothéliale va principalement sécréter des facteurs de vasodilatation, comme le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline (PGI₂). Le NO produit par la NO-synthase endothéliale (eNOS) provoque une relaxation des CMLV en induisant une augmentation du taux intracellulaire de GMPc (Guanosine

mono-phosphate cyclique). La PGI₂ va permettre la relaxation des CMLV en induisant une augmentation du taux d'AMPc (Adénosine mono-phosphate cyclique) intracellulaire (Shimokawa and Takeshita, 1995). La PGI₂ facilite également la libération de NO par la cellule endothéliale (Michiels, 2003).

Afin de maintenir un tonus vasculaire, la cellule endothéliale produit également des facteurs de vasoconstriction, dont l'endothéline-1 (ET-1), le thromboxane A2 et l'angiotensine II (ANG-II). L'ET-1 est le facteur de vasoconstriction le plus puissant libéré par les cellules endothéliales en réponse à l'hypoxie, aux contraintes de cisaillement ou à l'ischémie (Rubanyi and Botelho, 1991). L'ET-1, par fixation à son récepteur spécifique, le récepteur ET-A exprimé par les CMLV, va induire une augmentation du calcium intracellulaire provoquant la contraction des CMLV (Cines et al., 1998; Michiels, 2003).

b- La perméabilité

L'endothélium constitue une barrière physique continue et semi-perméable qui participe activement à la régulation des échanges de gaz, d'ions, de molécules, de protéines et de cellules entre le sang et les tissus. Cette barrière est plus ou moins perméable selon sa fonction et l'organe irrigué. Au niveau d'organes comme le foie et la rate, les capillaires sanguins sont dits sinusoides et présentent un endothélium discontinu perméable aux liquides et aux macromolécules. Dans les organes filtrants, comme les reins ou l'intestin grêle, les capillaires sont fenêtrés, les cellules endothéliales présentent des pores de taille variable permettant le passage de liquide et de certaines molécules (Cines et al., 1998; Clough, 1991). Cependant, la majorité des capillaires sont continus assurant la fonction de barrière. Cette fonction de barrière est d'autant plus importante au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) du système nerveux central. La BHE est constituée de cellules endothéliales cérébrales jointives reliées entre elles par des jonctions serrées empêchant tout échange passif entre le sang et le compartiment liquidien du système nerveux (Engelhardt and Sorokin, 2009). Ainsi, une régulation précise de la perméabilité est cruciale afin de maintenir l'homéostasie tissulaire. Les échanges à travers la barrière endothéliale peuvent s'effectuer par un passage entre les cellules endothéliales appelé voie para-cellulaire ou par le passage au travers de la cellule endothéliale par la voie dite trans-cellulaire (Stevens et al., 2000).

La perméabilité trans-cellulaire s'effectue soit par diffusion à travers les canaux (pompes à proton, aquaporines) présents à la surface de la membrane des cellules endothéliales, soit par le processus d'endocytose activé par la liaison du ligand à son récepteur ou par absorption en phase liquide des solutés extracellulaires dans des cavéoles (Lum and Malik, 1994; Stevens et al., 2000; Vandenbroucke et al., 2008). La perméabilité para-cellulaire est régulée par les jonctions intercellulaires : les jonctions serrées et les jonction adhérentes. Ces jonctions empêchent le passage de macromolécules dont le diamètre est supérieur ou égal à 3 nm, mais elles peuvent s'assembler et se désassembler pour permettre le passage de plus grosses molécules et de cellules, comme lors de l'extravasation des leucocytes. En effet, la stimulation des cellules endothéliales par diverses molécules comme la thrombine, le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) ou le lipopolysaccharide (LPS), déclenche une augmentation du calcium intracellulaire conduisant à l'activation de la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) ainsi que des petites protéines GTPase monomériques, RhoA, Rac et Cdc42 impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et permettant le désassemblage des jonctions intercellulaires (Lum and Malik, 1994; Stevens et al., 2000; Vandenbroucke et al., 2008).

c- La thrombo-résistance et l'hémostase

Une des fonctions importantes de l'endothélium est de faciliter le flux sanguin en présentant une surface anti-thrombotique. En absence de lésion, l'endothélium empêche l'agrégation plaquettaire et la coagulation. Le rôle anti-thrombotique de l'endothélium est dû à l'inhibition de l'attachement des cellules et des molécules circulantes grâce à la production de molécules anti-thrombotiques. Les cellules endothéliales vont sécréter des molécules comme, la PGI₂ et le NO inhibant l'activation des plaquettes, ainsi que la production d'anticoagulants comme la thrombomoduline et l'héparine. Les cellules endothéliales favorisent la fibrinolyse en synthétisant des molécules comme la thrombospondine et des activateurs du plasminogène (*tissue plasminogen activator* (tPA), *urokinase plasminogen activator* (uPA)) (Cines et al., 1998; Michiels, 2003).

Cependant, en cas de lésion de l'endothélium, la cellule endothéliale activée modifie son profil d'expression afin de favoriser l'activité pro-thrombotique et pro-coagulante. En réponse aux molécules pro-thrombotiques comme la thrombine, les cellules endothéliales expriment des facteurs pro-coagulant comme le TF (*Tissue factor*),

le PAF (*Platelet activating factor*), le facteur de Von Willebrand et des récepteurs aux facteurs de coagulation (IX, X, XII) afin de permettre l'hémostase (Cines et al., 1998; Sumpio et al., 2002).

d- L'inflammation

Les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhésion régulant la circulation des cellules présentes dans le sang. En réponse à un stimulus pro-inflammatoire, ces molécules d'adhésion permettent l'infiltration des cellules immunitaires présentes dans le sang vers le tissu au niveau du site inflammatoire. Ce recrutement des leucocytes aux sites inflammatoires nécessite l'expression coordonnée de ces molécules d'adhésion et une signalisation spécifique (Cines et al., 1998; Sumpio et al., 2002).

En condition normale, les leucocytes circulant interagissent avec les cellules endothéliales par l'intermédiaire de la L-sélectine, exprimée par tous les leucocytes, qui se lie aux récepteurs exprimés faiblement mais de façon constitutive à la surface des cellules endothéliales au repos (CD34, ICAM-2). Durant la réponse inflammatoire, les cellules endothéliales activées par les cytokines et autres molécules pro-inflammatoires (IL-6, IL-8) sécrètent des cytokines, des chimiokines et expriment la E-sélectine qui lie alors les oligosaccharides présents à la surface des leucocytes. Cette interaction faible et transitoire va permettre le ralentissement des leucocytes par le phénomène de *rolling*. Les leucocytes activés expriment des intégrines qui vont alors interagir avec les molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules endothéliales activées, comme ICAM-1 et 2 (*Intracellular adhesion molecule 1 et 2*), VCAM (*Vascular cell adhesion molecule*) et PCAM (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*). Cette interaction forte permet l'adhésion ferme des leucocytes à la surface des cellules endothéliales, étape nécessaire et préalable au passage transendothéliale (ou extravasation) des leucocytes vers le site inflammatoire. De plus, en réponse à l'inflammation les vaisseaux se dilatent et les cellules endothéliales activées se contractent afin de faciliter le passage des cellules immunitaires (Cines et al., 1998; Sumpio et al., 2002).

e- L'angiogénèse

L'angiogénèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants pour répondre principalement à un besoin accru des tissus en oxygène. Ce processus se déroule en plusieurs étapes successives. Tout

d'abord, la dégradation de la MEC (Matrice extracellulaire) par les protéases produites par les cellules endothéliales ainsi que l'augmentation de la perméabilité facilitent la prolifération et la migration des cellules endothéliales à travers le tissu. Puis, le recrutement des péricytes va permettre la maturation des vaisseaux néo-formés. L'angiogénèse est finement régulée par l'équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques (VEGF, PDGF) et anti-angiogéniques (Endostatine, thrombospondine 1 et 2). Lorsqu'un tissu est en condition d'hypoxie, le manque d'oxygène induit l'augmentation de la forme active du facteur de transcription HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor 1*). Le gène codant pour le VEGF étant une cible transcriptionnelle d'HIF-1, l'expression de ce facteur de croissance est augmentée en condition hypoxique. Le VEGF sécrété diffuse dans le tissu et se fixe sur ses récepteurs exprimés à la surface des cellules endothéliales présentes à proximité. Les cellules endothéliales stimulées par ce facteur de croissance prolifèrent et permettent la formation d'un nouveau vaisseau (Alberts et al., 2002; Carmeliet and Jain, 2011; Cines et al., 1998).

Le réseau vasculaire de l'adulte étant mature et quiescent, le processus d'angiogénèse physiologique n'intervient que dans certains cas particuliers comme la cicatrisation ou les menstruations. Cependant, dans le cas du développement tumoral, la tumeur solide nécessite un apport en oxygène et en nutriment pour croître. Les cellules tumorales induisent une angiogénèse dite pathologique afin de détourner le réseau vasculaire normal et favoriser l'angiogénèse tumorale. Les cellules tumorales en condition d'hypoxie synthétisent des facteurs pro-angiogéniques, des chimiokines, des enzymes de dégradation de la MEC, favorisant la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Michiels, 2003).

La cellule endothéliale joue donc un rôle fondamental dans la régulation du tonus vasculaire, des échanges entre le sang et les tissus et des interactions avec les cellules et molécules présentes dans le sang. Située à l'interface du sang et des tissus, elle permet donc de répondre à tout changement environnemental afin de maintenir l'homéostasie vasculaire et tissulaire.

II- Stress oxydant et radiations ionisantes

1- Le stress oxydant

a- Définition

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre du métabolisme d'oxydation/réduction (redox) de la cellule. En effet, lorsque la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : *Reactive oxygen species*) dépasse les capacités du système antioxydant de la cellule, il y a donc un déséquilibre entre les molécules pro-oxydantes et antioxydantes, induisant un stress oxydant pouvant conduire à d'importantes dysfonctions cellulaires (Birben et al., 2012) (Figure 1-3).

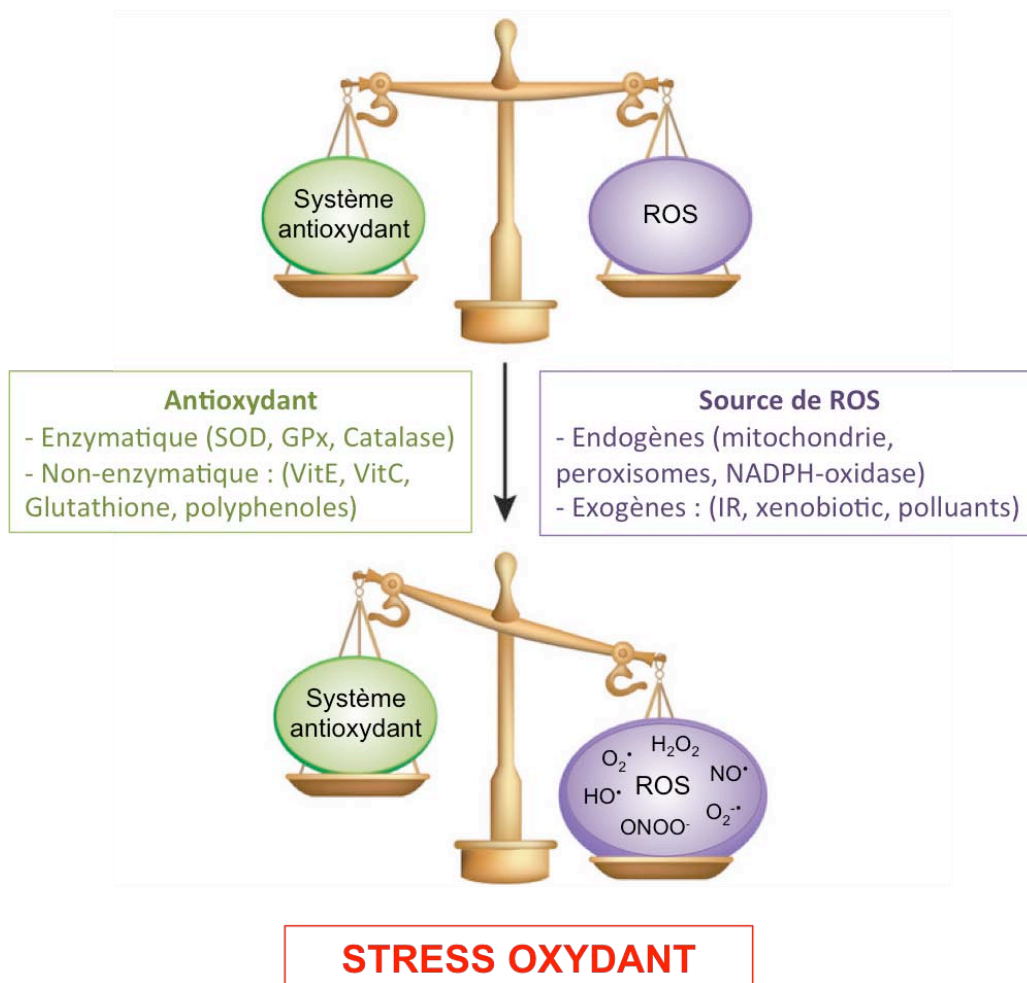


Figure 1-3 : Le stress oxydant induit par un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants

b- Les espèces réactives de l'oxygène : ROS

Les ROS sont produits à partir de l'oxygène moléculaire O_2 . Ce sont des molécules très réactives ayant un fort potentiel oxydant et une durée de vie faible. Ils peuvent être divisés en deux catégories : les radicaux libres (ou espèces radicalaires) et les espèces non radicalaires. Les radicaux libres sont des atomes ou molécules, ayant un ou plusieurs électrons non appariés. Lorsque deux radicaux libres s'assemblent, ils forment alors une espèce non radicalaire. Les trois principaux ROS produits de manière accrue lors du déséquilibre redox et particulièrement impliqués dans les dommages oxydatifs sont l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ayant la réactivité la plus faible, mais la plus haute stabilité (Birben et al., 2012; Giorgio et al., 2007).

D'autres molécules dérivées du métabolisme de l'oxygène, les espèces réactives de l'azote (RNS : *Reactive nitrogen species*), participent également à l'induction et aux effets délétères du stress oxydant. Il s'agit principalement du NO et de ses dérivés : le dioxyde d'azote (NO_2) et le peroxydinitrite ($ONOO^{\bullet}$). Le NO synthétisé par l'enzyme NOS (NO synthase) peut interagir avec l' $O_2^{\bullet-}$ pour former du peroxydinitrite $ONOO^{\bullet}$, composé très réactif, réagissant avec de nombreuses molécules, notamment par nitration (Mikkelsen and Wardman, 2003).

c- Sources de production des ROS

Les ROS peuvent provenir soit de sources endogènes (mitochondrie, peroxisome, NADPH-oxydase), soit de sources exogènes (rayonnements ionisants, xénobiotiques, polluants) (Sauer et al., 2001). La production de ROS par les rayonnements ionisants sera plus particulièrement détaillée ici. En effet, le principal objectif de ce travail de thèse est de comprendre la réponse des cellules endothéliales à un stress oxydant aigu tel que celui induit par l'irradiation.

- Sources endogènes

La mitochondrie est la source majeure de ROS endogène. Cet organite intracellulaire possède son propre ADN, l'ADN mitochondrial, codant pour certaines sous-unités des différents complexes (I, II, III, IV et V) de la chaîne respiratoire. Durant la respiration mitochondriale, les électrons échappant à la chaîne de transfert des électrons, principalement au niveau des complexes I et III, réagissent avec les molécules

d'oxygène O_2 pour former l'espèce radicalaire $O_2^{\bullet-}$ qui sera ensuite transformé en H_2O_2 (Giorgio et al., 2007; Klaunig et al., 2011; Spitz et al., 2004).

Le peroxysome est également une source importante de ROS endogène. C'est un organite intracellulaire impliqué dans la détoxification de la cellule. Il consomme de l'oxygène pour générer du $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 grâce aux nombreuses enzymes oxydases (Acyl-CoA oxydase, Xanthine oxydase) qu'il contient (Klaunig et al., 2011).

Les NADPH-oxydase (NOX : Nicotine adenine dinucleotide phosphate-oxydase) sont des isoenzymes membranaires permettant de catalyser la réduction de l'oxygène en $O_2^{\bullet-}$ qui sera rapidement transformé en H_2O_2 par la SOD (*Superoxide dismutase*) (Klaunig et al., 2011; Sauer et al., 2001). Initialement découvertes dans les neutrophiles, elles sont également exprimées par les cellules non phagocytaires, avec un profil d'expression tissulaire, une localisation sub-cellulaire et un mode de régulation propres à chaque isoforme. Il existe sept isoformes, NOX 1, 2, 3, 4 et 5 et DUOX 1 et 2. Les NOX sont des complexes enzymatiques composés de plusieurs sous-unités, dont les sous unités membranaires : la sous-unité catalytique et la sous-unité régulatrice $p22^{phox}$ pour les isoformes NOX 1, 2, 3 et 4 (Chuong Nguyen et al., 2015). L'activité des NOX est finement régulée par de nombreux facteurs cytosoliques d'activation permettant la stabilisation du complexe enzymatique, comme la petite protéine-G Rac qui participent à l'assemblage du complexe protéique NOX 1, 2 et 3. Ces facteurs cytosoliques d'activation sont eux même régulés par des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation de $p47^{phox}$ permettant sa liaison à $p22^{phox}$ lors de l'activation de NOX 2 (Brandes et al., 2014). L'activation de NOX 5 et des DUOX 1 et 2 est quant à elle dépendante de la liaison du calcium au niveau de leur domaine *EF-hand* en C terminal, permettant un changement conformationnelle de la protéine (Chuong Nguyen et al., 2015). Cependant, DUOX-1 et 2 requièrent tout de même pour leur activité catalytique des facteurs d'activation membranaire : DUOXA1 et DUOXA2 (Brandes et al., 2014). Enfin, la NOX 4 possède une activité constitutive et participe à la production basale de ROS (Ago et al., 2004).

- **Source exogène : les rayonnements ionisants**

Les rayonnements ionisants participent à la production exogène des ROS, responsables en grande partie de leurs effets toxiques. Cette production de ROS radio-induite résulte de deux mécanismes différents :

- *Production directe par radiolyse des molécules d'eau* qui correspond à l'absorption de l'énergie des rayonnements ionisants par les molécules d'eau conduisant à la production de molécules chargées extrêmement instables et d'électrons libres. Ces espèces très réactives vont diffuser et réagir très rapidement entre elles ou avec d'autres molécules d'eau ou des molécules intracellulaires. Les ROS principalement produits par la radiolyse de l'eau sont les radicaux superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyle ($\bullet OH$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Azzam et al., 2012) (Figure 1-4). Le H_2O_2 , ROS majoritairement produit est l'un des plus stable dans le temps (Giorgio et al., 2007) et il est maintenant admis que le H_2O_2 est un second messager intracellulaire très important impliqué dans de nombreuses voies de signalisation (Finkel, 1998; Rhee et al., 2003). H_2O_2 apparaît être un bon agent mimétique du stress oxydant radio-induit et sera utilisé dans nos expériences *in-vitro*.

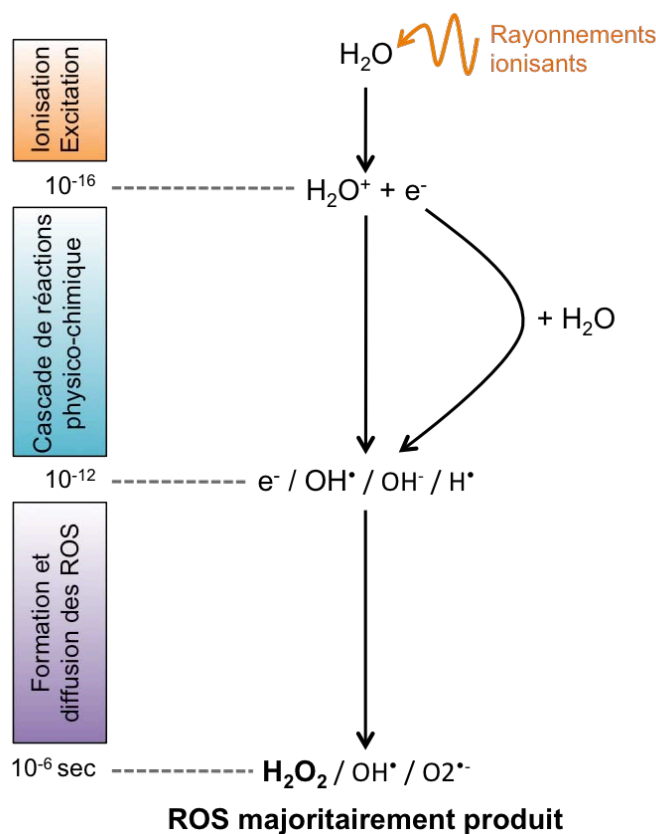


Figure 1-4 : La production exogène des ROS par radiolyse de l'eau

- *Production indirecte par la dérégulation du métabolisme redox* de la cellule, générant un stress oxydant persistant participant aux effets toxiques tardifs. La dérégulation du métabolisme redox en faveur de la production de molécules pro-oxydantes induit une production persistante de ROS. Les rayonnements ionisants peuvent provoquer une altération de la mitochondrie, des enzymes impliquées dans la régulation des ROS et des voies de signalisation (Spitz et al., 2004).

En effet, les rayonnements ionisants peuvent induire des dommages à l'ADN mitochondrial et ainsi altérer l'expression des protéines codées par cet ADN, comme les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. Ces altérations peuvent conduire à la dysfonction des complexes et participer à la production de ROS (Azzam et al., 2012; Leach et al., 2001; Lu et al., 1999; Spitz et al., 2004).

Une modification d'expression des enzymes pro-oxydantes a également été observée. Les rayonnements ionisants peuvent induire l'expression de la protéine NOS (Leach et al., 2002; Mikkelsen and Wardman, 2003). La NOS induit la production de NO qui peut réagir avec $O_2^{\bullet-}$ pour former l'anion peroxyde nitrite $ONOO^-$, RNS très réactif pouvant réagir avec l'ADN, les protéines et les lipides et ainsi participer aux effets toxiques des rayonnements ionisants (Mikkelsen and Wardman, 2003). L'irradiation peut également induire l'expression et l'activation de la NOX participant ainsi à l'augmentation de ROS intracellulaires (Collins-Underwood et al., 2008; Ameziane-El-Hassani et al., 2015).

- **Autres sources exogènes**

Les xénobiotiques et autres agents polluants (gaz, métaux lourds) produisent aussi des ROS au cours de leur dégradation par l'organisme ou en induisant une production endogène de ROS (Klaunig et al., 2011).

d- Régulation du stress oxydant

Le stress oxydant induit par l'augmentation massive de ROS intracellulaires provoque aussi l'activation de molécules antioxydantes endogènes, afin de réguler par une boucle de rétrocontrôle négative ce stress oxydant. Il existe deux classes d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques dont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathione peroxydase (GPx) et la thioredoxine (TRX) et les antioxydants non-enzymatiques incluant le glutathion (GSH), la vitamine C, la vitamine E, les

caroténoïdes et les polyphénols (les flavonoïdes, l'épigallocatechine gallate (EGCG) et le resvératrol) (Valko et al., 2006) (Figure 1-5).

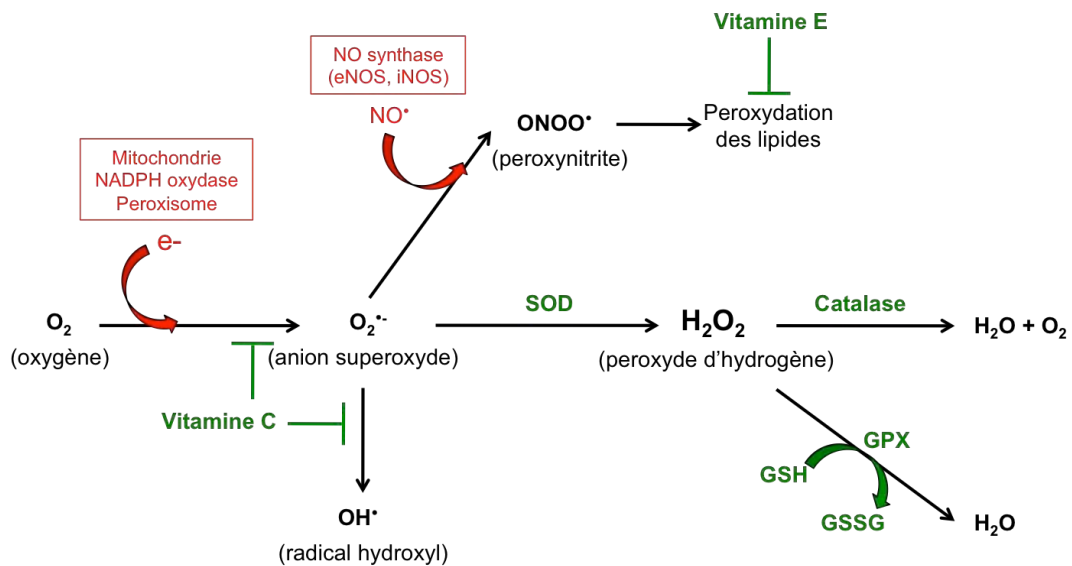


Figure 1-5 : Les principaux mécanismes de régulation du stress oxydant

- Antioxydants enzymatiques

La superoxyde dismutase (SOD) est l'une des enzymes antioxydantes les plus importantes. L'absence de cette enzyme est létale et sa surexpression durant un stress oxydant entraîne une production excessive de H_2O_2 , toxique pour la cellule. La SOD régule le niveau d'ion superoxyde en catalysant la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et O_2 . Cette métalloprotéine existe sous plusieurs isoformes qui diffèrent selon la nature de l'ion métallique du site actif et leur localisation cellulaire : la SOD1 cytosolique contenant un atome de cuivre ou de zinc (Cu/Zn-SOD), la SOD2 mitochondriale contenant un atome de manganèse (Mn-SOD) et la SOD3 extracellulaire contenant un atome de cuivre ou de zinc (EC-SOD) (Holley et al., 2014; Landis and Tower, 2005; Valko et al., 2006).

La catalase est une enzyme intracellulaire principalement localisée dans les peroxysomes. Elle permet la conversion efficace du H_2O_2 en O_2 et H_2O . Cette enzyme est composée de quatre sous-unités liées à de la NADPH permettant la stabilisation de l'enzyme. La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydant est élevé et elle joue un rôle significatif dans le développement d'une tolérance au stress oxydant dans la réponse adaptative des cellules (Robbins and Zhao, 2004; Valko et al., 2006).

Les glutathiones peroxydases (GPx) jouent un rôle majeur dans la régulation de l'état redox intracellulaire des cellules vasculaires. Ce sont des enzymes cytoplasmiques dépendantes du sélénium, sauf la glutathione-S-transférase (GST) qui est indépendante du sélénium. Il existe différentes isoformes de GPx selon leur localisation tissulaire, mais deux sont ubiquitaires, la GPx1 localisée au niveau du cytosol et de la mitochondrie, elle est la plus abondante et la GPx4 localisée au niveau du cytosol et de la membrane plasmique ayant pour substrat les phospholipides hydroxylés. Les GPx permettent la dégradation du H₂O₂ et des peroxydes organiques en H₂O et en alcool en utilisant le GSH comme donneur d'électrons. Elles jouent un rôle très important dans la dégradation du H₂O₂ surtout lorsque le niveau de stress oxydant est bas (Robbins and Zhao, 2004; Valko et al., 2006; Wassmann et al., 2004).

La thioredoxine (TRX) est une petite protéine ubiquitaire présentant un site actif dithiol. C'est une enzyme à activité oxydoréductase intrinsèque. La TRX existe sous forme réduite et oxydée. La forme oxydée inactive est réduite par la thioredoxine réductase afin de régénérer la forme réduite active. La TRX permet l'échange de deux électrons. Elle peut également interagir directement avec les radicaux O₂•⁻ et •OH (Valko et al., 2006).

- **Antioxydants non-enzymatiques**

Le glutathion (GSH), très abondant dans le cytosol, le noyau et la mitochondrie, est un antioxydant majeur. Il existe sous forme réduite et oxydée, il est donneur d'électrons lors des processus de dégradation des peroxydes. Le GSH a donc de multiples rôles dans la régulation du stress oxydant. Il participe notamment à la réduction des vitamines C et E en formes actives antioxydantes et il est également un co-facteur des GPx. (Jones, 2008; Mikkelsen and Wardman, 2003; Valko et al., 2006).

Les vitamines C et E sont d'importants antioxydants. La vitamine C, antioxydant hydrosoluble, piège directement du O₂•⁻ et •OH et réduit du H₂O₂ en H₂O. La vitamine E, antioxydant liposoluble, se localise au niveau des membranes et protège la cellule contre la peroxydation des lipides (Valko et al., 2006).

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles. Ce sont des antioxydants exogènes dont la chaîne carbonée contient de nombreuses doubles liaisons, capables de

piéger les $O_2\cdot^-$, $\cdot OH$ et autre radicaux libres. Ils permettent également de protéger la cellule contre la peroxydation des lipides (Valko et al., 2006).

Les composés phénoliques comme les flavonoïdes, l'épigallocatechine gallate (EGCG) et le resvératrol sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques dans leur structure. Ces antioxydants ont la capacité de piéger les radicaux libres et de chélater les ions métalliques (Valko et al., 2006).

e- Rôle du stress oxydant dans la signalisation cellulaire

Le stress oxydant régule de nombreux processus cellulaires : la croissance, la différenciation (Sauer et al., 2001), la mort (Leal et al., 2009), mais aussi la sénescence (Barascu et al., 2012). Les ROS jouent un rôle très important dans la régulation des nombreuses voies de signalisation impliquées dans ces processus cellulaires (Ray et al., 2012). Les ROS peuvent agir comme messagers secondaires (Sauer et al., 2001). Ils peuvent également activer ou inhiber des protéines de signalisation et les facteurs de transcription (Klaunig et al., 2011; Ray et al., 2012). Il régulent aussi la stabilité des protéines (Pajares et al., 2015),

- Les ROS comme messagers secondaires

L'activation des récepteurs aux cytokines ($TNF\alpha$, $IFN\gamma$ et $IL-1\beta$), des récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGF-R) et des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase ($TGF-\beta$) induit la génération de ROS permettant la transduction de signaux intracellulaires impliqués dans diverses fonctions cellulaires (Sauer et al., 2001).

L'activation des récepteurs à cytokines, comme les récepteurs aux $TNF\alpha$ (*Tumor necrosis factor- α*), $IFN\gamma$ (*Interferon- γ*) et $IL-1\beta$ (*Interleukine-1 β*), conduit à la production de ROS qui va induire l'activation des voies apoptotiques. La production des ROS en réponse à ces cytokines s'effectue par la régulation de la NADPH oxydase (Babu et al., 2015; Choi et al., 2015) et par la mitochondrie (Babu et al., 2015; Kim et al., 2010). Il a été plus particulièrement démontré que la voie du $TNF\alpha$ peut potentialiser l'activité de NOX2 et de NOX1, entre autres, par l'activation de voies de signalisation telles que PKC et p38 MAPK (Morgan et al., 2008; Yazdanpanah et al., 2009).

L'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase, tels que les récepteurs à l'EGF (*Epidermal growth factor*), au PDGF (*Platelet-derived growth factor*) ou au VEGF impliqués dans la prolifération cellulaire et l'angiogénèse, induit également la production de ROS (Sauer et al., 2001). De récentes études ont montré en réponse au VEGF une augmentation de ROS produits par les NADPH-oxydases NOX2 et NOX4 (Maraldi et al., 2010) et par la mitochondrie (Wang et al., 2011). Ces ROS produits vont participer à la transduction du signal mais également à l'autophosphorylation du récepteur au VEGF et à l'activation des voies qui en découlent telles que les voies MAPK (Evangelista et al., 2012; Oshikawa et al., 2012; Ushio-Fukai et al., 2002).

L'activation des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase, dont le récepteur au TGF- β (*Transforming growth factor β*), est corrélée à une augmentation des ROS intracellulaires et induit une inhibition de la croissance cellulaire et l'apoptose (Sauer et al., 2001). Cette augmentation de ROS par le TGF- β est provoquée par une inhibition de l'expression des enzymes antioxydantes SOD et catalase et de la molécule GSH (Franklin et al., 2003), mais également par une augmentation de l'expression de NOX4 (Caja et al., 2009; Carmona-Cuenca et al., 2008; Sancho et al., 2009). Les ROS produits vont jouer le rôle de seconds messagers (Hiraga et al., 2013) et plus particulièrement participer à l'apoptose et à la dysfonction endothéliale (Hu et al., 2005; Yan et al., 2014).

- Régulation des protéines de signalisation par les ROS

Les protéines impliquées dans les voies de signalisation engagées par ces récepteurs peuvent également être régulées par les ROS. En effet, les ROS peuvent interagir directement avec les protéines conduisant à l'altération de leur activité (cf. paragraphe II-2-b). Les cibles des ROS sont nombreuses et variées : protéines kinases de la famille des MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), protéines phosphatases, petites protéines G et canaux ioniques (Valko et al., 2006).

Régulation des protéines MAPK par les ROS (Figure 1-6) : les ROS induisent l'activation de la voie JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), de la voie p38 MAPK et de la voie ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase 1/2*) (Son et al., 2013). Les voies JNK et p38 MAPK sont toutes les deux activées par la protéine Ask1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*), MAP3K activée par divers stress. L'activation de p38 MAPK par les ROS sera plus particulièrement développée dans le paragraphe IV dédié à p38. La voie ERK est principalement activée par les facteurs de croissance et de survie. Comme

nous avons pu le voir précédemment, les ROS favorisent l'autophosphorylation des récepteurs aux facteurs de croissance, comme le récepteur au VEGF, et par conséquent favorise l'activation des cibles qui sont en aval comme les protéines kinase ERK1/2 (Sauer et al., 2001; Truong and Carroll, 2013). De plus, de nombreuses protéines en amont de JNK, p38 MAPK et ERK1/2, impliquées dans leur activation, peuvent être des cibles directes des ROS, complexifiant l'implication des ROS dans l'activation des voies MAPK (Ray et al., 2012).

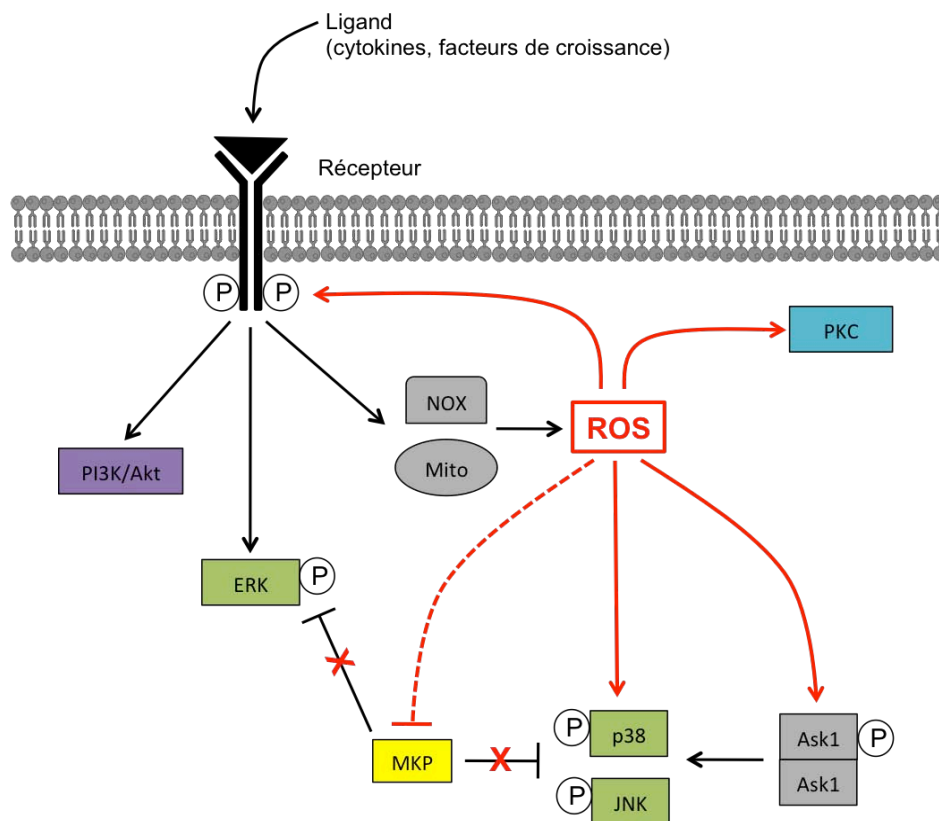


Figure 1-6 : Les principaux mécanismes de régulation des voies de signalisation par les ROS

Régulation des voies PI3K et PKC par les ROS (Figure 1-6) : la voie de la PI3K permet le recrutement à la membrane et l'activation de la protéine Akt stimulant la prolifération cellulaire et inhibant l'apoptose. La voie PI3K/Akt peut être recrutée par les ROS après activation du récepteur au VEGF (Ray et al., 2012; Valko et al., 2006). La voie de la PKC (*Protein kinase C*) impliquée dans diverses fonctions cellulaires (prolifération, différenciation, migration, apoptose) peut être directement ou indirectement activée par les ROS. La PKC possède au niveau de son domaine

catalytique des régions riches en cystéines pouvant être oxydées par les ROS et conduisant à l'activation de la PKC (Klaunig et al., 2011; Ray et al., 2012; Valko et al., 2006). Les ROS peuvent également induire une entrée de calcium dans la cellule via les canaux calciques. Cet influx calcique peut alors induire l'activation de la PKC (Ermak and Davies, 2002).

Régulation des protéines phosphatases : un autre moyen de régulation des voies de signalisation est le ciblage des phosphatases par les ROS. Les ROS peuvent induire une oxydation des cystéines présentes au niveau du site catalytique des phosphatases provoquant leur inhibition (Valko et al., 2006). Les tyrosines phosphatases et les sérine/thréonine phosphatases permettent l'inactivation des protéines kinases par leur déphosphorylation. L'inhibition des phosphatases par les ROS induit une augmentation du taux de protéines phosphorylées et favorise l'activation des protéines kinases (Ray et al., 2012). Il a été montré que l'oxydation des phosphatases MKP (*MAPK phosphatase*) par les ROS permet la régulation des voies p38 MAPK (Liu et al., 2010), JNK (Kamata et al., 2005) et ERK (Wentworth et al., 2011). La PP2a, sérine/thréonine phosphatase peut également être inhibée par les ROS et conduire à l'activation des voies MAPK (Chen et al., 2009). La PP2a est une phosphatase clé dans la régulation de multiples fonctions cellulaires (croissance, différenciation, apoptose) (Janssens and Goris, 2001). Son inhibition par les ROS est impliquée dans l'apoptose et la dégénérescence neuronale (Chen et al., 2009; Levinthal and Defranco, 2005).

Cependant, d'autres études démontrent que le stress oxydant peut également être un activateur des phosphatase (Herman et al., 2002). Il a été mis en évidence une augmentation de l'expression et une activation de la protéine phosphatase MKP-1 en réponse aux UV, au H₂O₂ et au choc thermique (Li et al., 2001; Racz et al., 2010; Zhou et al., 2006). De même pour la phosphatase PP2a, qui est activée en réponse à divers stress (Arora et al., 2014; Grethe and Pörn-Ares, 2006), dont par H₂O₂, dans différentes lignées cellulaires (Maalouf and Rho, 2008; Yan et al., 2012), et plus particulièrement dans les cellules endothéliales (Cicchillitti et al., 2003). De plus, il pu être démontré que cette activation de PP2a par le stress oxydant régule négativement les voies pro-survie ERK et Akt (Liu and Hofmann, 2004; Zuluaga et al., 2007) . Le stress oxydant apparaît comme un inhibiteur mais également un activateur des phosphatases.

Activation des protéines ATM et DNAPK : ATM et DNAPK peuvent être activées en réponse aux dommages à l'ADN induits par le stress oxydant (Chen et al., 2012). Les voies ATM et DNAPK permettent l'activation de multiples effecteurs comme les facteurs de transcription p53, NF-κB (*Nuclear factor-kappa B*) et HIF-1 qui vont induire l'expression de gènes participant au maintien de l'homéostasie redox ainsi qu'à l'activation des voies de réparation de l'ADN (Chen et al., 2012; Okuno et al., 2012).

- **Régulation des facteurs de transcription par les ROS**

Les ROS peuvent également affecter l'expression des gènes en régulant directement l'activité de facteurs de transcription comme AP-1 (*Activator protein 1*), NF-κB, p53 et HIF-1 dont l'activité transcriptionnelle est sensible à l'oxydation/réduction (Valko et al., 2006). L'oxydation de ces facteurs altère leur capacité de liaison à l'ADN ou à leurs co-facteurs. Par conséquent, les ROS peuvent favoriser l'expression de certains gènes favorables à la mort ou à la survie de la cellule (Klaunig et al., 2011; Sauer et al., 2001).

- **Régulation de la dégradation des protéines**

La dégradation des protéines oxydées est essentielle pour la survie de la cellule. La voie ubiquitine-protéasome est l'une des principales voies protéolytiques impliquées dans la dégradation des protéines oxydées (Davies, 2001). Les protéines destinées à la dégradation doivent être ubiquitinylées pour être reconnues et dégradées par le protéasome. Ce complexe de dégradation est constitué d'un noyau protéolytique 20S et de sous-unités régulatrices 19S qui permettent le recrutement des protéines ubiquitinylées (DeMartino and Slaughter, 1999). L'ajout des ubiquitines est un processus essentiel grâce à l'activation séquentielle de trois enzymes : l'ubiquitine E1, l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2 et l'enzyme de transfert de l'ubiquitine, l'ubiquitine-ligase E3 (Glickman and Ciechanover, 2002).

Une exposition à un stress oxydant modéré favorise l'expression des protéines protéolytiques et des enzymes d'ubiquitination (Kwak et al., 2012), favorisant ainsi la dégradation des protéines oxydées. Le facteur de transcription Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) impliqué dans l'expression de protéines protéolytiques est normalement dégradé. En condition de stress oxydant, Nrf2 est relocalisé au niveau du noyau et favorise l'expression des gènes des protéines protéolytiques (Pajares et al.,

2015; Ray et al., 2012). Cependant, l'exposition prolongée à un stress oxydant aigu altère le fonctionnement du protéasome. Les sous-unités du protéasome sont des cibles des ROS, qui vont induire l'oxydation de cystéines au niveau de leur site catalytique, induisant une diminution de l'activité protéolytique (Pajares et al., 2015). Les enzymes d'ubiquitination possèdent également une cystéine au niveau de leur site catalytique régulée par oxydation/réduction (Obin et al., 1998). Le dysfonctionnement de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome favorise donc l'accumulation des protéines oxydées, délétère pour la cellule (Davies, 2001).

En condition physiologique, les cellules ont besoin d'un niveau basal de ROS nécessaire au maintien des fonctions cellulaires normales (régulation de l'expression de gènes, régulation des échanges ioniques, régulation de la transduction de signaux). L'augmentation du niveau de ces ROS intracellulaires par des facteurs exogènes ou endogènes peut engendrer l'activation des mécanismes antioxydants afin de maintenir un seuil acceptable de ROS pour la cellule. Un maintien élevé du niveau de ROS induit un état de stress oxydant pouvant être délétère pour la cellule. En effet, le stress oxydant engendre de nombreux effets cellulaires : induction de dommages à l'ADN, activation de voies de signalisation, induction de l'expression de gènes qui vont influencer le devenir de la cellule, pouvant conduire à la mort cellulaire. Il est donc important de limiter cette augmentation de ROS pour préserver le tissu sain.

2- Les rayonnements ionisants

a- Généralités

Un rayonnement correspond à l'émission d'énergie ou de particules libérées lors de la désintégration d'un atome instable (radionucléide) afin d'acquérir une configuration stable. La nature du rayonnement émis dépend de la nature de l'atome. Certains rayonnements sont dits ionisants lorsqu'ils sont susceptibles d'arracher des électrons à la matière traversée, modifiant ainsi les atomes qui la composent.

On distingue deux types de rayonnements ionisants, les rayonnements directement ou indirectement ionisants. Les rayonnements directement ionisants sont constitués de particules chargées dont l'énergie est suffisante pour arracher les électrons de la matière traversée. C'est le cas des rayonnements de type α (noyau d'hélium chargé positivement) et β (électron). Les rayonnements indirectement ionisants sont

constitués de particules neutres (photons ou neutrons). Ces rayonnements provoquent l'ionisation par transfert indirect de leur énergie aux électrons de la matière traversée. C'est le cas des rayonnements X et γ . Ces rayonnements, utilisés en radiothérapie pour leur grande capacité de pénétration dans la matière, sont des ondes électromagnétiques qui transportent leur énergie sous forme de photons. Les rayonnements γ sont d'origine nucléaire, émis par la désintégration d'un radionucléide (Cobalt 60, Iridium 192 ou Césium 137). Les rayonnements X proviennent d'un réarrangement du cortège électronique de l'atome. Ils peuvent être produits par accélération d'électrons dans un tube sous vide. Le faisceau d'électrons est dirigé vers une cible métallique (anode). L'impact sur la cible induit une décélération rapide des électrons provoquant un transfert d'énergie sous la forme de photons X.

Les rayonnements ionisants vont donc, par leurs propriétés physiques, induire des altérations directes et indirectes à l'échelle cellulaire et moléculaire, pouvant aboutir à plus ou moins long terme, à la dysfonction de la cellule, du tissu ou de l'organisme irradié. La dose reçue par la matière se mesure en Gray (Gy), ce qui correspond à l'énergie transférée (en joule) par unité de masse (en kilogramme), soit $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J.kg}^{-1}$.

b- Effets biologiques des rayonnements ionisants

- Effet direct / effet indirect

Les rayonnements ionisants peuvent avoir un effet direct par ionisation des différents composés cellulaires : acides nucléiques, lipides, protéines, organelles. Cette ionisation induit alors une altération des processus biologiques plus ou moins délétères pour la cellule.

Les rayonnements ionisants peuvent également avoir un effet indirect par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS). Les cellules animales étant principalement composées d'eau, les ROS générés par les rayonnements ionisants sont en grande majorité issus de la radiolyse des molécules d'eau (cf. paragraphe II-1-c). Les rayonnements ionisants vont ioniser les molécules d'eau (H_2O) conduisant rapidement à la formation d'espèces radicalaires, les radicaux superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et hydroxyle (OH^{\cdot} , $\cdot\text{OH}$) et d'espèces réactives non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) relativement stable et persistant (Robbins and Zhao, 2004) (Figure 1-4). Ce niveau anormalement élevé de ROS crée un stress oxydant dans la cellule induisant l'oxydation des constituants cellulaires (acides nucléiques, lipides, protéines) et l'activation de voies de signalisation (Azzam et al., 2012; Nathan

and Ding, 2010). Les rayonnements ionisants et les ROS induisent également une dérégulation des processus d'oxydation/réduction intracellulaire en altérant, entre autres, la mitochondrie, principale source endogène de ROS (cf. paragraphe II-1-c). Cette dérégulation du métabolisme d'oxydation/réduction va contribuer à la production de ROS. Cette production persistante et prolongée de ROS induit alors un stress oxydant chronique conduisant à l'apparition d'effets toxiques et délétères à long terme (Figure 1-7) (Azzam et al., 2012; Robbins and Zhao, 2004; Spitz et al., 2004).

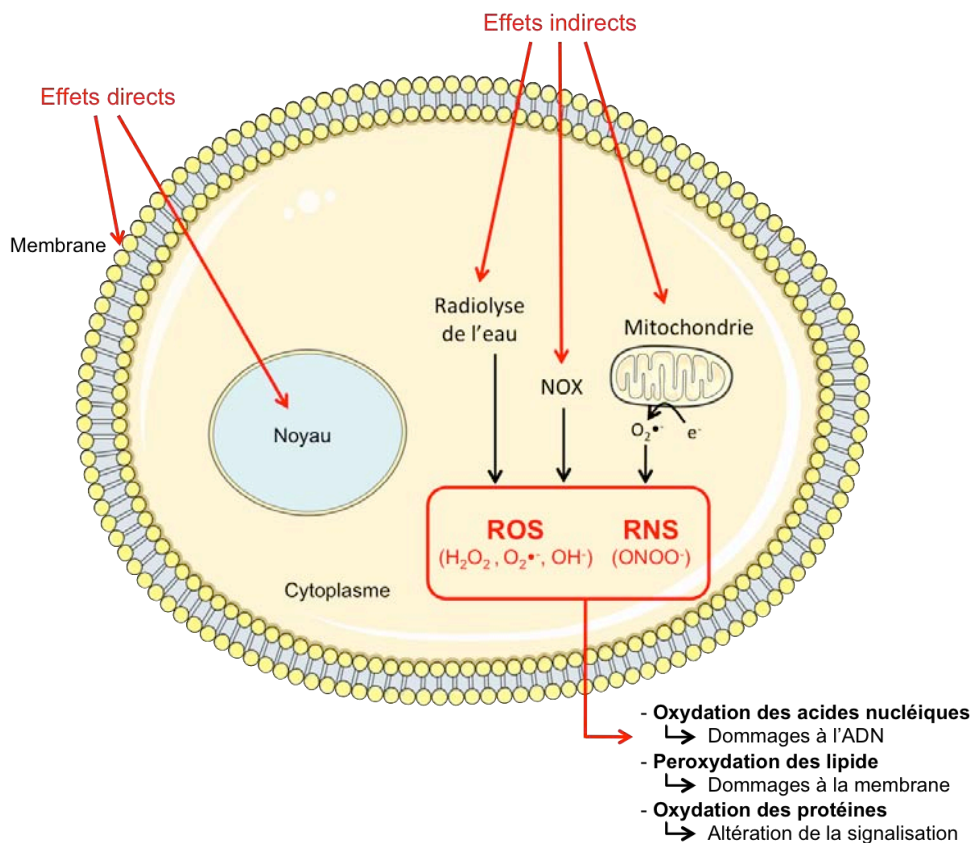


Figure 1-7 : Effets directs et indirects des rayonnements ionisants

- Effet sur les acides nucléiques : dommages à l'ADN

Les rayonnements ionisants sont capables d'altérer la structure de l'ADN. Les lésions de l'ADN peuvent être de différentes natures en fonction de l'énergie déposée par le rayonnement ionisant : l'altération de base, la cassure simple brin et la cassure double brin (Figure 1-8) (Azzam et al., 2012).

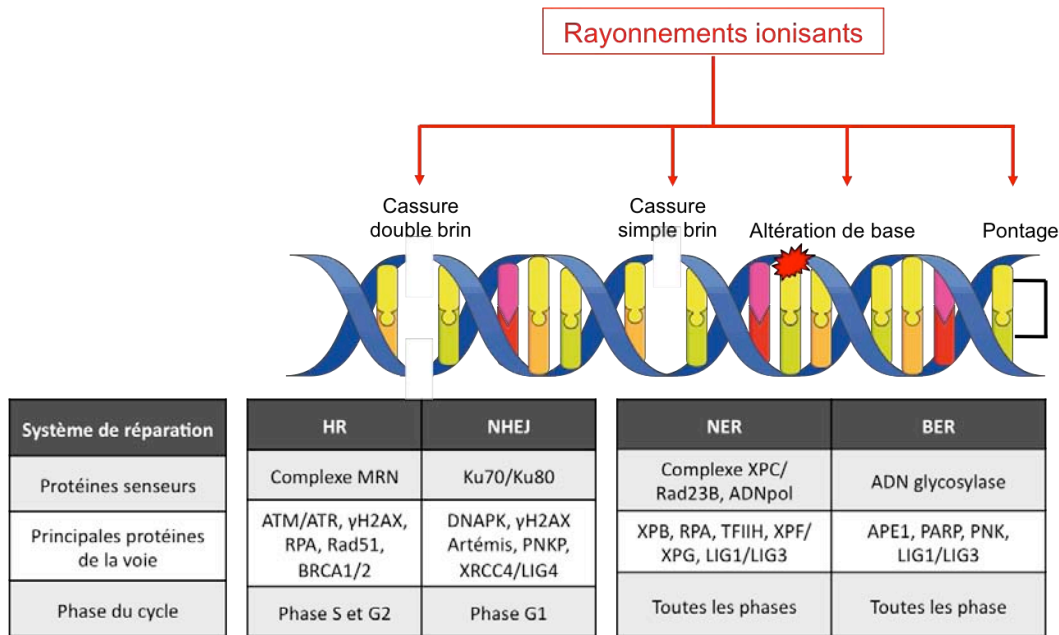


Figure 1-8 : Les principaux dommages à l'ADN et systèmes de réparation

L'altération de base peut se traduire par la perte de nucléotides, la modification (oxydation, déamination) d'une base ou encore le pontage entre deux bases (*cross-link*). Les ROS vont réagir avec les bases hétérocycliques de l'ADN et également avec les sucres altérant la structure des nucléotides (Dizdaroglu and Jaruga, 2012). La réparation de ces dommages s'effectue généralement rapidement par l'excision-resynthèse d'une base (BER : *Base Excision Repair*) ou d'un nucléotide (NER : *Nucléotide Excision Repair*) (Azzam et al., 2012; Guo et al., 2010; Hoeijmakers, 2001; Lindahl and Wood, 1999).

Les cassures simple brin ne concernent qu'un seul des deux brins complémentaires d'ADN et elles sont très rapidement réparées par le processus de BER. Le peroxyde d'hydrogène produit après irradiation peut également induire des cassures simple brin amplifiant les effets directs des rayonnements ionisants (Driessens et al., 2009). Un défaut de réparation d'une cassure simple brin peut aboutir après réplication à la formation d'une cassure double brin (Hoeijmakers, 2001; Lindahl and Wood, 1999).

Les cassures double brin correspondent à deux cassures en opposition éloignées de 10 à 20 paires de bases sur les brins d'ADN. Elles sont considérées comme les lésions de l'ADN les plus cytotoxiques et délétères. Ces cassures sont le plus souvent réparées, mais le système de réparation des cellules tumorales étant fréquemment altéré, ce type de dommage peut persister. Un défaut de réparation des cassures double brin

entraîne des aberrations chromosomiques et la perte définitive d'information génétique. La non-réparation de ces cassures peut causer la mort cellulaire (Mahaney et al., 2009). Il existe deux systèmes de réparation des cassures double brin. La recombinaison homologue (HR : *Homologous Recombination*) s'effectue durant la phase S et G2 du cycle cellulaire et permet une réparation fidèle en utilisant la chromatide sœur. La recombinaison non-homologue (NHEJ : *Non-Homologous End Joining*) est la principale voie de réparation intervenant durant la phase G1, elle permet la ligature des deux brins d'ADN afin d'assurer la continuité de la molécule d'ADN. Ce mécanisme non conservatif peut être à l'origine de perte d'informations génétiques pouvant aboutir à des mutations (Hoeijmakers, 2001; Lindahl and Wood, 1999; Lomax et al., 2013).

- **Effets sur les lipides et les protéines : dommages membranaires**

Pendant longtemps, l'ADN était considéré comme la cible majeure des rayonnements ionisants. Cependant, d'autres composants cellulaires notamment les membranes sont affectées par les rayonnements ionisants et principalement par les ROS (Benderitter et al., 1999). La membrane plasmique est une bicouche lipidique composée de phospholipides (phosphoglycérides, sphingolipides, phosphatidyle-inositol), de cholestérol, de glycolipides (sphingomyélines, gangliosides) et de protéines membranaires. Les rayonnements ionisants perturbent cette structure de la membrane en induisant des altérations structurales (peroxydation des lipides, réorganisation des plateformes lipidiques) et fonctionnelles (modification de la perméabilité, de l'activité de nombreuses enzymes, des fonctions de nombreux récepteurs et de la fluidité membranaire) (Benderitter et al., 1999; Shadyro et al., 2002).

La peroxydation des lipides est principalement due à l'oxydation des acides gras polyinsaturés des lipides par les ROS. Une fois que le processus de peroxydation lipidique est initié, il se déroule comme une réaction en chaîne, les lipides peroxydés formés vont réagir avec les molécules de lipides voisines et générer de nouveaux radicaux libres. Cette peroxydation conduit à la production d'aldéhydes réactifs (malondialdéhyde, MDA ; 4-hydroxy-2-nonenal, 4-HNE), qui altèrent la fluidité et la perméabilité membranaire pouvant conduire à la fragmentation de la membrane. Ces composés peuvent également participer aux dommages à l'ADN (Klaunig et al., 2011).

Les rayonnements ionisants vont donc altérer la signalisation membranaire en modifiant la structure des plateformes lipidiques. Les plateformes lipidiques sont des

structures dynamiques de la membrane plasmique, zones riches en sphingomyélines, cholestérol et surtout en sphingolipides (Simons and Ikonen, 1997). Elles jouent un rôle essentiel dans la transduction du signal en servant de zone d'ancrage pour de nombreuses protéines membranaires (récepteurs, enzymes) (Simons and Toomre, 2000). Les sphingolipides, dérivés de la sphingosine, sont des constituants essentiels de la membrane plasmique participant à sa rigidité et sa stabilité. Ces lipides bioactifs, comme le céramide et la sphingosine-1 phosphate (S1P), sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques (mort cellulaire, différenciation, prolifération, migration) et dans la régulation des voies de transduction du signal (Cremesti et al., 2002). En réponse aux rayonnements ionisants la sphingomyélinase acide (ASMase) transloque à la membrane plasmique où elle hydrolyse la sphingomyéline membranaire pour générer du céramide (Charruyer et al., 2005; Grassme et al., 2001; Haimovitz-Friedman et al., 1994; Milhas et al., 2010). Ces céramides s'accumulent au niveau de micro-domaines fusionnant avec les plateformes lipidiques pour former de grandes plateformes enrichies en céramides où ils vont pouvoir interagir avec diverses molécules transmembranaires et intracellulaires, et ainsi induire la transduction de signaux (Cremesti et al., 2002; Haimovitz-Friedman et al., 1994; Mathias et al., 1998). Ces céramides jouent alors le rôle de seconds messagers impliqués, entre autres, dans l'apoptose. Ils ont également un rôle majeur dans la mort radio-induite des cellules endothéliales (Garcia-Barros et al., 2003; Peña et al., 2000).

Altération des protéines : les rayonnements ionisants et principalement les ROS induisent une altération des protéines au niveau des liaisons peptidiques ou au niveau de la chaîne carbonée. Les dommages oxydatifs des acides aminés mènent à des modifications de la structure secondaire et tertiaire des protéines : dénaturation, fragmentation, formation d'agrégats (Davies and Delsignore, 1987; Davies et al., 1987). Ces altérations peuvent induire l'inactivation ou l'activation de récepteurs et d'enzymes conduisant à l'activation de voies de signalisation spécifiques comme la voie de l'EGF-R (*EGF-Receptor*), PI3K/Akt et Ras/Raf/MAPK (Valerie et al., 2007). Il peut y avoir aussi une destruction des canaux ioniques perturbant l'homéostasie cellulaire. Les protéines de jonctions peuvent également être altérées et conduire à l'augmentation de la perméabilité intercellulaire dérégulant l'équilibre osmotique entre les compartiments tissulaires (Klaunig et al., 2011).

- Effet sur le métabolisme d'oxydation/réduction

L'effet indirect majeur des rayonnements ionisants est la production de ROS qui augmente fortement la quantité de ROS intracellulaires, comme nous avons pu le voir dans le paragraphe II-1-c. Les ROS vont également interagir avec les molécules de régulation du métabolisme redox et altérer les fonctions mitochondriales, contribuant ainsi aux effets délétères des rayonnements ionisants en induisant un stress oxydant chronique (Spitz et al., 2004).

c- Réponses cellulaires

Les rayonnements ionisants et les ROS, via les dommages à l'ADN et l'altération de la membrane plasmique et des protéines, vont induire des voies de signalisation impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN, la sénescence et la mort cellulaire.

- Effet sur le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire comprend quatre phases successives : la phase G1, la phase S, la phase G2 et la phase M. Ces quatre phases s'enchaînent de façon coordonnée grâce à de nombreux mécanismes de contrôle : les *check points*. Les *check points* bloquent le cycle cellulaire lors d'une anomalie, comme la lésion de l'ADN, et veillent au maintien de l'intégrité du génome. Il y a trois principaux *check points* : à la transition G1/S, durant la phase S et à la transition G2/M. Une des principales familles de protéines impliquée dans la régulation du cycle cellulaire est la famille des kinases dépendantes des cyclines (*Cyclin-dependant kinase*, CDK). Les CDK ne sont actives que sous la forme complexée avec les cyclines. L'expression des cyclines variant au cours du cycle cellulaire, les complexes CDK/cycline ne se forment que transitoirement, permettant une activation transitoire des CDK selon la phase du cycle cellulaire. L'activité des CDK peut également être régulée par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, déphosphorylation) par les kinases (Wee1, Myt1) et par les phosphatases (Cdc25) ou par leur complexation avec des inhibiteurs (p16, p21, p27) (Meijer, 2006).

Le cycle cellulaire est un facteur important dans la sensibilité des cellules aux rayonnements ionisants. En effet, des cellules non-différenciées comme les cellules progénitrices du système hématopoïétique qui se divisent rapidement, sont plus radiosensibles que des cellules qui ne se divisent pas, comme les neurones du système

nerveux central. Ceci s'explique par une différence de disponibilité des systèmes de réparation des dommages à l'ADN en fonction des phases du cycle cellulaire (Panganiban et al., 2013). Les dommages de l'ADN radio-induits vont être rapidement détectés par des protéines senseurs, des sérine/thréonine kinases de la famille des PI3KK (*Phosphatidylinositol 3-kinase related kinase*) : ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related*), ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) et DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) qui vont induire un arrêt du cycle cellulaire nécessaire pour laisser le temps à la cellule de réparer (Figure 1-9).

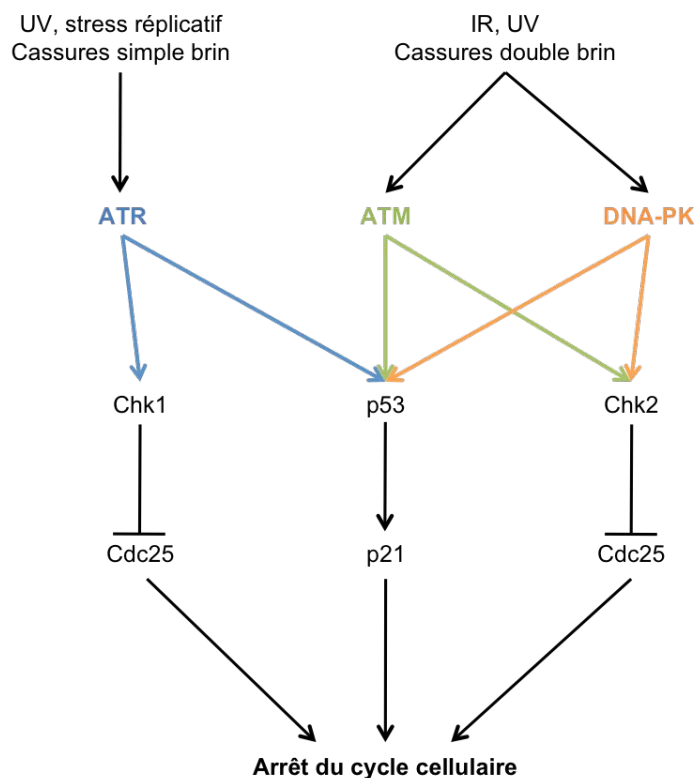


Figure 1-9 : La régulation du cycle cellulaire par les voies ATM, ATR et DNA-PK en réponse aux dommages à l'ADN

ATR est principalement activée par les dommages à l'ADN causés par les UV ou le stress réplcatif (fourches de réplcation bloquées). L'activation de la protéine ATR s'effectue par son recrutement au site de dommage par le facteur ATRIP (*ATR-Interacting Protein*) et sa phosphorylation. ATR activée va permettre, entre autres, l'activation par phosphorylation de la protéine Chk1 (*Checkpoint kinase 1*) et de la protéine p53. L'activation de Chk1 permet l'inhibition par phosphorylation des protéines Cdc25A et C conduisant à l'inhibition des complexes CDK/cycline

provoquant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S et G2/M. L'activation de p53 induit l'expression de la protéine p21, inhibiteur des complexes CDK/cycline conduisant à un arrêt du cycle cellulaire principalement en phase G1 (Branzei and Foiani, 2008; Lapenna and Giordano, 2009; Smith et al., 2010; Yang et al., 2003).

ATM est principalement activée par les cassures double brin de l'ADN. L'activation de la protéine ATM s'effectue par son recrutement au site de dommages par le complexe MRN (constitué des protéines Mre11, Rad50 et NBS1 (*Nijmegen Breakage Syndrom 1*)), suivie de son autophosphorylation permettant la dissociation du dimère ATM/ATM formant des monomères actifs. ATM a de nombreux substrats, dont la protéine Chk2 (*Checkpoint kinase 2*), et la protéine p53 (Canman et al., 1998), ainsi que de nombreuses autres protéines impliquées dans le processus de réparation de l'ADN. Chk2 activé va alors phosphoryler les protéines Cdc25A et C conduisant à l'inhibition de celle-ci et par conséquent à l'inhibition des complexes CDK/cycline provoquant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S et G2/M. De même pour l'activation de p53, conduisant à l'expression de p21 et à l'arrêt du cycle en phase G1 (Branzei and Foiani, 2008; Lapenna and Giordano, 2009; Smith et al., 2010; Yang et al., 2003).

DNA-PK est également activée par les cassures double brin de l'ADN. L'activation de la protéine DNA-PK s'effectue par son recrutement au site de dommages par les protéines Ku70 et Ku80, suivi de son autophosphorylation (Branzei and Foiani, 2008; Jette and Lees-Miller, 2015). DNA-PK active va se dissocier de l'ADN et phosphoryler de nombreux substrats impliqués notamment dans l'arrêt du cycle cellulaire, dont la protéine Chk2 (Shang et al., 2014, 2010) induisant un arrêt du cycle en phase G1/S et G2/M et la protéine p53 (Woo et al., 1998) principalement impliquée dans l'arrêt du cycle en phase G1.

- **Réparation des dommages à l'ADN**

Afin de maintenir l'intégrité de son génome et d'assurer sa survie, la cellule possède différents systèmes de réparation de l'ADN, dont les principaux sont la NER et la BER pour la réparation des altérations de bases et des cassures simple brin, la HR et la NHEJ pour la réparation des cassures double brin (Figure 1-8).

La NER est principalement impliquée dans la réparation de dommages impliquant la modification de bases provoquant une distorsion de la double hélice d'ADN. Le mécanisme de réparation s'effectue en cinq étapes : (i) la reconnaissance du dommage, (ii) la formation du complexe de réparation, (iii) la double incision de chaque côté du dommage, (iv) la synthèse du morceau d'ADN manquant et (v) la ligation du brin d'ADN néo-synthétisé. La reconnaissance du dommage, par le complexe XPC/Rad23B ou par le blocage de l'ARN polymérase qui va être reconnu par les protéines CSA et CSB, permet le recrutement du complexe de réparation composé, entre d'autres, d'hélicases (XPB), de protéines de réplication (RPA), de facteurs de transcription (TFIIH), ainsi que d'endonucléases (XPF et XPG) qui vont permettre la double incision de l'ADN au niveau du dommage. L'ADN polymérase en présence de co-facteurs va synthétiser le fragment manquant. Puis les ADN-ligases (LIG1 et LIG3) vont réaliser la ligature du brin néo-synthétisé (Guo et al., 2010; Hoeijmakers, 2001; Iyama and Wilson, 2013).

La BER est un système de réparation permettant le maintien de l'intégrité du génome, actif durant toutes les phases du cycle cellulaire. Il est le principal système de réparation pour les cassures simple brin et les dommages impliquant l'altération des bases par les ROS. La voie de réparation se déroule en cinq étapes majeures : (i) la reconnaissance et l'excision de la base altérée créant un site abasique, (ii) la formation d'une extrémité 5'-deoxyribose phosphate (iii) le remplacement de la base manquante, et (iv) la ligature de la brèche. L'ADN glycosylase initie la réparation en clivant la base altérée, créant un site abasique. Ce site est reconnu par l'endonucléase APE1 (*A-purinic/A-pyrimidic endonuclease 1*) qui clive l'ADN en hydrolysant la liaison sucre-phosphate, créant une cassure simple brin avec une extrémité 5'-deoxyribose phosphate. Cette cassure est alors reconnue par les protéines PARP (*Poly-ADP ribose polymerase*) et PNK (*Polynucleotide kinase*) permettant le recrutement de l'ADN polymérase. L'ADN polymérase va combler la cassure en insérant un (*Short Patch BER*) ou plusieurs (*Long Patch BER*) nucléotides, suivit de la ligature de la brèche par les ADN-ligases LIG3 ou LIG1 (Hoeijmakers, 2001; Iyama and Wilson, 2013; Maynard et al., 2009).

La HR permet la réparation des cassures double brin durant la phase S et G2 du cycle cellulaire car ce système nécessite la présence de la chromatide sœur pour une réplication fidèle, permettant ainsi un maintien de l'information génétique. La HR se

décompose en cinq étapes principales : (i) la détection du dommages, (ii) la résection des extrémité 5', (iii) la stabilisation du simple brin d'ADN, (iv) l'invasion de la région homologue par le simple brin d'ADN, et (v) la résolution de la brèche. La HR est initiée par la détection du dommage par le complexe MRN composé des protéines Mre11, Rad50 et NBS1 qui se lient directement à l'ADN. NBS1 permet le recrutement d'ATM au niveau du site de dommage, induisant son activation par autophosphorylation. ATM va rapidement phosphoryler l'histone H2AX (γ -H2AX) permettant l'amplification du signal de réparation. Le mécanisme de réparation se poursuit par la résection des extrémités 5' par les endonucléases Mre11, CtIP (*C-terminal binding protein-interacting protein*) et EXO1 (*Exonuclease 1*) formant des simples brins d'ADN à l'extrémité 3'. Ces simples brins d'ADN vont être stabilisés par la fixation des protéines RPA remplacées par le recrutement des protéines Rad51, induit par des protéines Rad52 et BRCA2 (*Breast cancer 2*). Rad51 permet la recherche et l'invasion du simple brin dans la région homologue située sur la chromatide sœur, formant alors une D-loop stabilisée par des jonctions inter-brins, les jonctions de Holliday. Les ADN polymérases vont combler la brèche par synthèse de l'ADN manquant à partir du brin complémentaire. Enfin, les jonctions inter-brins se dissolvent, ou elles sont clivées, pouvant alors engendrer un échange d'information génétique entre les chromatides sœurs (*cross-over*) (Aparicio et al., 2014; Iyama and Wilson, 2013; Mazón et al., 2010; Shibata and Jeggo, 2014) (Figure 1-10).

La NHEJ contrairement à la HR ne nécessite pas la présence de la chromatide sœur et peut donc normalement se dérouler durant toutes les phases du cycle cellulaire. C'est le système de réparation majoritaire dans la réparation des cassures double brin induites par les rayonnements ionisants, surtout pendant la phase G1 où la HR n'est pas possible. La NHEJ se décompose en plusieurs étapes successives : (i) la reconnaissance du dommage et la formation du complexe de réparation, (ii) la transformation des extrémités non ligaturables, et (iii) la jonction des deux extrémités induisant une perte partielle de l'information génétique. Lors de la reconnaissance, l'hétérodimère Ku70/Ku80 se fixe directement sur les extrémités libres induites par la cassure et permet le recrutement des facteurs de réparations, dont la sous-unité catalytique de la DNA-PK (DNA-PKcs). Ce recrutement au site de dommage va permettre la stabilisation des extrémités libres mais également l'homodimérisation et l'activation de la DNA-PK par autophosphorylation. Afin de former des extrémités ligaturables, l'exonucléase 5'-3'

Artémis forme un simple brin d'ADN, la PNKP (*Polynucleotide kinase 3'-phosphate*) retire tous les groupements 3'-P et ajoute des résidus 5'-P, et les ADN polymérases μ et λ synthétisent les petits ségments d'ADN manquant. Enfin, le complexe XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*) – Ligase IV et XLF (*XCCR4 like factor*) permettent la ligation des deux extrémités d'ADN (Davis and Chen, 2013; Iyama and Wilson, 2013; Mahaney et al., 2009) (Figure 1-10).

Il est également important de noter que, comme pour ATM, DNA-PK est capable de phosphoryler l'histone H2AX à proximité de la cassure double brin (An et al., 2010; Stiff et al., 2004). γ -H2AX participe à la signalisation du dommage et à l'accumulation stable des protéines de réparation sur le site du dommage (Scully and Xie, 2013; Urushihara et al., 2012).

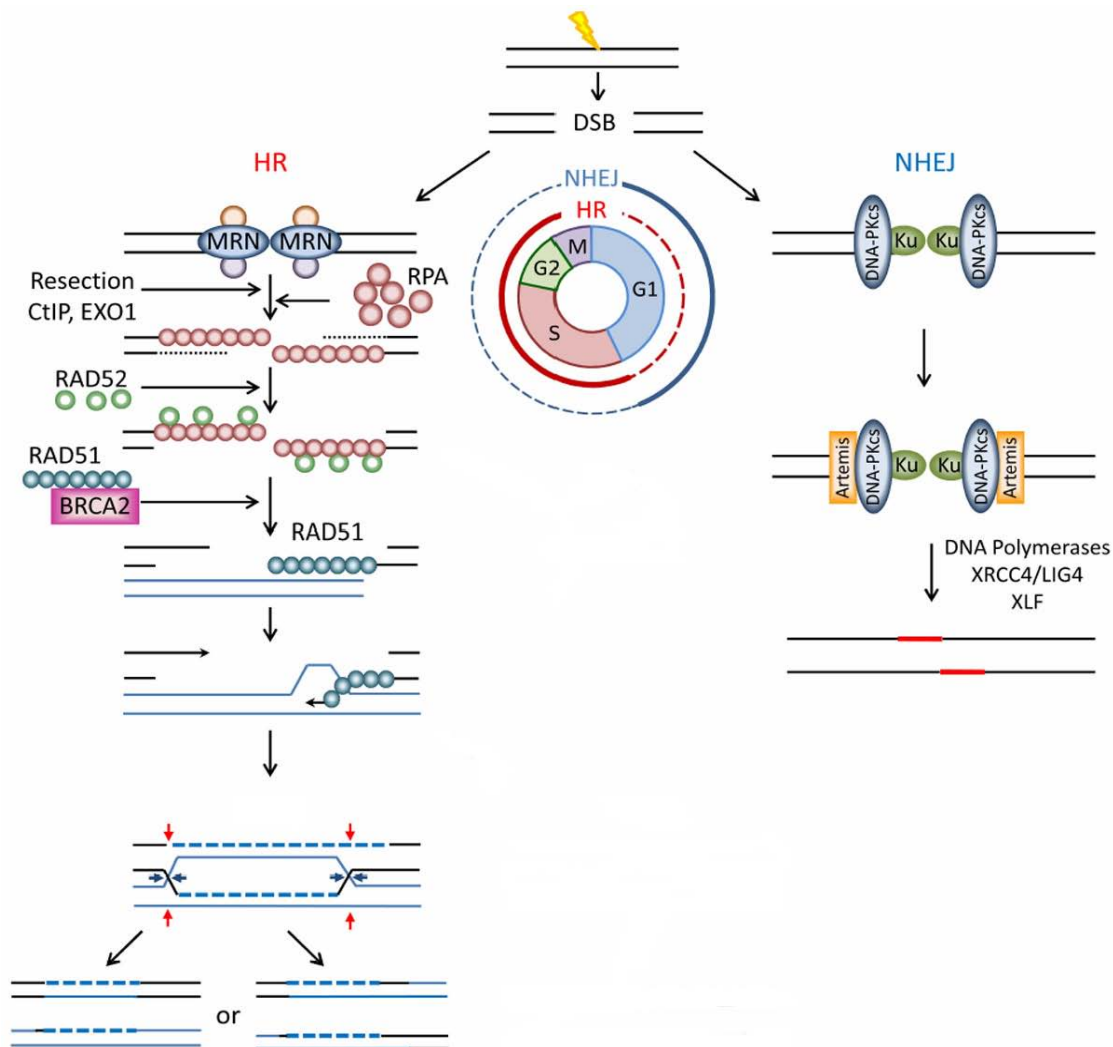


Figure 1-10 : Les voies de réparations HR et NHEJ en réponse aux cassures double brin de l'ADN (DSB) (Iyama and Wilson, 2013)

ATM et DNA-PK sont activées par le même type de dommages à l'ADN et ont de nombreux substrats en commun (Chk2, p53, Artemis et H2AX). Il existe donc une certaine redondance dans leurs fonctions : signalisation des cassures double brin par la phosphorylation de l'histone H2AX (Stiff et al., 2004), activation de p53 et arrêt du cycle cellulaire. ATM et DNA-PK sont également des protéines complémentaires dans la réparation des dommages à l'ADN du fait de leur co-régulation, ATM pouvant phosphoryler DNA-PK (Chen et al., 2007) et DNA-PK pouvant réguler la transcription d'ATM (Peng et al., 2005). Ceci augmente encore la complexité de la régulation de la voie de réparation des cassures double brin. Ces deux protéines sont donc toutes deux nécessaires pour avoir une réparation des cassures double brin complète et efficace. Cependant l'action croisée de ces deux protéines nécessite encore d'être clarifiée (Martín et al., 2012; Shrivastav et al., 2008).

d- La mort cellulaire radio-induite

Les rayonnements ionisants induisent donc de nombreux effets délétères pour la cellule : production d'un stress oxydant massif, dommages à l'ADN et altération des membranes. Si, malgré de nombreux mécanismes de défense, la cellule ne parvient pas à réparer ces dommages, ces altérations irréparables vont aboutir à la mort de la cellule. Il existe quatre types de mort radio-induite : l'apoptose, la nécrose, l'autophagie et la mort mitotique (Panganiban et al., 2013).

- L'apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire programmée. Elle est caractérisée par une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN et du noyau, une rétractation de la cellule, suivie du bourgeonnement de la membrane (*blebbing*) aboutissant à la formation de vacuoles apoptotiques (corps apoptotiques). Il existe différentes voies de mort dont l'activation dépend de la nature et de l'origine du signal, les voies « intrinsèques » initiées par une signalisation mitochondriale intra-cellulaire ou « extrinsèques » activées par un signal extracellulaire provenant des récepteurs de mort transmembranaires (Panganiban et al., 2013) (Figure 1-11).

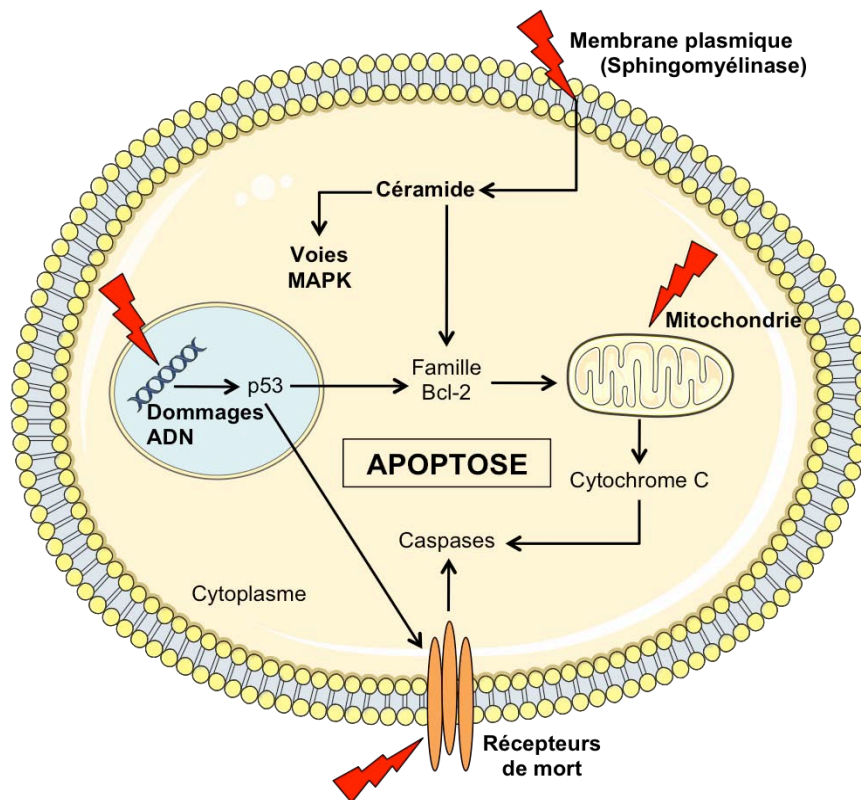


Figure 1-11 : Les principales voies apoptotiques radio-induites (Prise et al., 2005)

Voies intrinsèques induites par les rayonnements ionisants

- voie dépendante des dommages à l'ADN : un des effets directs des rayonnements ionisants est l'induction de dommages à l'ADN qui, comme nous l'avons vu précédemment, initie des voies de signalisation intracellulaire régulant, entre autres, le cycle cellulaire et la réparation. Ces dommages peuvent également induire un signal d'apoptose via la stabilisation et l'activation du facteur de transcription p53. Cette activation de p53 par les dommages à l'ADN est induite par la phosphorylation de p53 ou l'inhibition de Mdm2 (inhibiteur de p53) par les protéines ATR, ATM et DNA-PK (Canman et al., 1998; Panganiban et al., 2013). L'activité de p53 régule l'expression des facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) et induit l'expression du récepteur de mort CD95/Fas (Prise et al., 2005).

- voie dépendante des mitochondries : la voie apoptotique mitochondriale est caractérisée par une perméabilisation de la membrane mitochondriale conduisant au relargage du cytochrome c dans le cytosol. Le cytochrome c induit l'activation de protéases, les caspases, qui clivent alors un grand nombre de protéines conduisant à la destruction de la cellule. Comme précisé ci-dessus, p53 peut réguler l'expression des

protéines pro- et anti-apoptotiques. p53 permet l'augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques, comme Bax et Puma, dérégulant l'équilibre pro- et anti-apoptotiques et favorisant l'oligomérisation des protéines pro-apoptotiques. L'oligomérisation de Bax et Bak permet la formation de canaux à la surface de la membrane mitochondriale induisant la perméabilisation et le relargage de cytochrome c (Gogvadze et al., 2008; Karpinich et al., 2002; Vaseva and Moll, 2009).

- voie dépendante du céramide membranaire : la voie de l'ASMase induite par l'irradiation, indépendante des dommages à l'ADN et de p53, conduit à la génération de céramide (cf. paragraphe II-2-b). Par ailleurs, l'irradiation peut également induire une génération plus tardive de céramide par synthèse *de novo* via la réponse aux dommages à l'ADN induisant l'activation de la céramide synthase (Liao et al., 1999; Vit and Rosselli, 2003). Le céramide généré va jouer le rôle de second messenger et induire des voies de signalisation intracellulaire conduisant à l'apoptose de la cellule (Kolesnick and Fuks, 2003). La voie de mort dépendante du céramide devient une des voies majoritaires de l'apoptose dans les cellules ayant une forte activité ASMase, comme les cellules endothéliales (Marathe et al., 1998) qui sont protégées de l'apoptose radio-induite chez des souris *asm^{-/-}* (Garcia-Barros et al., 2003). Le céramide peut directement stimuler l'intégration de Bax à la membrane mitochondriale favorisant la perméabilisation et le relargage de cytochrome c (Lee et al., 2011). Il peut également induire directement l'activation de kinase, telles que la PKC et la KSR (*Kinase Suppressor of Ras*), ainsi que l'activation de phosphatases, comme PP1 et PP2a. Ces protéines contribuent au dysfonctionnement mitochondrial, à l'activation des caspases et à la génération de ROS (Mathias et al., 1998). De plus, le céramide peut également induire l'activation de la voie p38 MAPK (Kim et al., 2008; Mondal et al., 2010) et de la voie JNK (Verheij et al., 1996), ainsi que l'inhibition de la voie PI3K/Akt, favorable à une signalisation pro-apoptotique (Kolesnick and Fuks, 2003). Les plateformes riches en céramide permettent également le regroupement et l'activation des récepteurs de mort FAS/CD95 (Grassme et al., 2001).

Voies extrinsèques induites par les rayonnements ionisants

La voie extrinsèque est induite par un signal apoptotique initié par l'activation, par un signal extracellulaire, des récepteurs de mort CD95/Fas, TNF-R1 (*Tumor necrosis factor receptor 1*), TRAIL (*Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), DR4 et DR5 (*Death receptor 4/5*). Après fixation de leurs ligands, ces

récepteurs vont s'oligomériser et induire un signal pro-apoptotique intracellulaire via l'activation de la caspase 8. L'irradiation peut induire directement l'activation du récepteur CD95/Fas, mais aussi favoriser son expression via p53 (Dent et al., 2003a; Niemöller and Belka, 2009; Panganiban et al., 2013a).

- **La nécrose**

La nécrose est considérée généralement comme un processus passif et est caractérisée morphologiquement par une augmentation du volume cellulaire, une dilatation des organites, une rupture de la membrane cellulaire et un relargage du contenu intracellulaire (Golstein and Kroemer, 2007). Considéré pendant longtemps comme un processus non contrôlé, la nécrose est également induite par différentes voies de signalisation telles que celles impliquées dans l'apoptose, comme les voies des récepteurs de mort CD95/Fas, TNF-R1 et TRAIL pouvant induire la formation du « nécrosome », complexe protéique capable de médier la nécrose ou l'apoptose (Hitomi et al., 2008; Panganiban et al., 2013). La nécrose radio-induite conduit à une augmentation de l'inflammation pouvant favoriser la réponse immunitaire anti-tumorale, mais également provoquer des effets délétères pour le tissu sain avoisinant (Kaczmarek et al., 2013).

- **L'autophagie**

L'autophagie est un processus indépendant des caspases qui est caractérisée par une dégradation des constituants de la cellule par ses propres enzymes, induisant la formation de grosses vacuoles à deux membranes. L'autophagie est principalement régulée par le métabolisme du glucose, mais elle peut également être activée par un dysfonctionnement mitochondriale et le stress oxydant, induit par les rayonnements ionisants (Dodson et al., 2013). L'autophagie est régulée par les voies PI3K/Akt, de l'AMPK (AMP-activated Protein Kinase), des pentoses phosphates, ERK et JNK. L'autophagie peut favoriser la survie de la cellule en permettant la dégradation des agrégats protéiques et des organelles dysfonctionnels, mais elle peut être également délétère pour la cellule en induisant la mort (Dodson et al., 2013; Panganiban et al., 2013).

- **La mort mitotique**

La mort mitotique est caractérisée par la formation de micro-noyaux ou des cellules multinucléées. Ce type de mort, fortement dépendante des dommages à l'ADN persistants et non réparés durant l'arrêt du cycle cellulaire, n'est possible que pour des cellules cyclantes car elle est induite pendant ou après une mitose défectueuse. La mort mitotique a largement été décrite dans les cellules mutées pour p53, cellules étant résistantes à l'apoptose radio-induite. En effet, les cellules mutées pour p53 échappent très rapidement à l'arrêt du cycle cellulaire provoqué par les dommages à l'ADN radio-induits. Cette reprise de cycle en absence de réparation des dommages à l'ADN va induire une mauvaise ségrégation des chromosomes conduisant à une division cellulaire imparfaite, des aberrations chromosomiques et à la mort de la cellule (Eriksson et al., 2007; Maalouf et al., 2009; Mirzayans et al., 2013).

e- **La sénescence radio-induite**

Les cellules sénescents s'accumulent au cours du vieillissement naturel des organismes. Ces cellules sont viables et métaboliquement actives, mais cependant elles sont caractérisées par un arrêt irréversible de la prolifération, il s'agit de la sénescence répllicative. A la différence des cellules quiescentes, les cellules sénescents présentant un arrêt du cycle cellulaire et une absence de prolifération irréversible se caractérisent par une expression permanente des protéines de régulation du cycle cellulaire, comme p21 et p16. Les cellules sénescents présentes de nombreuses modifications de leur profil d'expression caractérisé par un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SAPS). Elles présentent une augmentation d'expression des cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, de facteurs de croissance, de protéases et de molécules d'adhésion qui peuvent conduire à l'induction d'une réponse inflammatoire chronique (Tchkonia et al., 2013).

La sénescence peut également être induite par divers stimuli, comme le stress oxydant et l'irradiation pouvant induire une sénescence prématurée des cellules (Barascu et al., 2012; Dimozi et al., 2015). Cette sénescence permet d'empêcher la transmission des dommages cellulaires aux cellules filles, elle est donc favorable à la survie du tissu endommagé. Cependant cette sénescence induite conduit également à un vieillissement prématuré des cellules ayant d'importantes altérations fonctionnelles et participe donc aux dommages tissulaires (Campisi, 2013).

f- Utilisation des rayonnements ionisants en radiothérapie

- Généralité sur la radiothérapie

La radiothérapie, avec la chimiothérapie et la chirurgie, est un des traitements les plus couramment utilisés pour traiter les cancers. Plus de la moitié des patients sont traités par radiothérapie seule ou en combinaison avec d'autres traitements. La radiothérapie consiste à utiliser les propriétés biologiques des rayonnements ionisants pour détruire les cellules tumorales et bloquer leur prolifération. L'objectif étant de maximiser le plus précisément possible la dose de rayonnement délivrée à la tumeur, tout en épargnant au mieux les tissus sains avoisinants. On distingue trois principales techniques de radiothérapies : la radiothérapie externe, la curiethérapie et la radiothérapie métabolique (irsn.fr ; e-cancer.fr ; curie.fr)

La radiothérapie externe (radiothérapie transcutanée) : la source de rayonnement utilisée est située à l'extérieur du patient. Le rayonnement est généré soit au moyen d'accélérateurs de particules produisant des faisceaux de photons ou d'électrons, soit à partir de source de cobalt 60 à radioactivité γ , source de moins en moins utilisée et progressivement remplacée par les accélérateurs de particules.

La curiethérapie : la source radioactive scellée (Iridium 192 ou Césium 137) est placée directement dans la tumeur. La dose d'irradiation délivrée peut ainsi être très élevée au niveau de la tumeur mais décroître au niveau des tissus sains avoisinants. L'action très localisée de la curiethérapie limite considérablement ses effets secondaires.

La radiothérapie métabolique (ou radiothérapie interne vectorisée) correspond à l'administration par voie orale ou par injection intraveineuse d'une substance radioactive (radio-pharmaceutiques), marquée par des radionucléides émetteurs de rayonnement β et dont les propriétés biologiques conduisent à un ciblage sélectif des cellules tumorales par leur métabolisme. La première application de cette technique a été pour le traitement des cancers de la thyroïde par l'administration d'iode 131, préférentiellement capté par les cellules de la thyroïde. Les divers radiopharmaceutiques maintenant utilisés ne cible pas toujours par un processus métabolique. Les radionucléides peuvent être vectorisés grâce au couplage à un vecteur tel que les anticorps monoclonaux qui confère la spécificité de la cible, on parle de radio-immunothérapie (RIT) (Vuillez, 2005).

- **Radiotoxicité aux tissus sains**

La radiothérapie est reconnue pour sa grande efficacité dans le traitement des cancers. Cependant elle n'épargne pas le tissu sain périphérique recevant inévitablement une dose d'irradiation plus ou moins élevée, induisant de ce fait des lésions du tissu sain. L'induction de dommages aux tissus sains est principalement responsable des effets secondaires de la radiothérapie. La gravité des effets secondaires varie en fonction du site et du volume irradié ainsi que de la dose délivrée. L'état du patient va également être un facteur important dans le développement ou non d'effet secondaire. En effet, des pathologies vasculaires telles que le diabète et l'hypertension peuvent augmenter le risque de développer des effets secondaires (Stone et al., 2003). Il existe également une prédisposition génétique de certains patients à développer des effets secondaires. En effet, des patients atteints de maladies génétiques, comme l'Ataxie téléangiectasia et l'anémie de Fanconi, où les gènes mutés sont impliqués dans les voies de réparation de l'ADN, ont une radiosensibilité des tissus sains augmentée (Barnett et al., 2009). La tolérance des tissus sains aux rayonnements ionisants va donc déterminer la dose de traitement délivrée afin d'avoir un effet acceptable sur les tissus sains et un effet suffisant pour traiter la tumeur. On distingue les effets secondaires précoces, qui peuvent se déclarer pendant ou quelques semaines après le traitement et les effets secondaires tardifs, qui peuvent apparaître plusieurs mois, voire des années après le traitement.

Les effets précoces vont être principalement observés dans les tissus où la prolifération cellulaire est importante : épithélium de la peau ou du système digestif, tissu hématopoïétique et gonades. Les effets secondaires précoces sont généralement caractérisés par une inflammation localisée au niveau de la zone irradiée et la mort des cellules. En effet, l'exposition aux radiations conduit à la mort des cellules par apoptose ou par mort mitotique, événement initiateur de la lésion précoce. La destruction de l'épithélium digestif se caractérise par une lésion des muqueuses pouvant provoquer des vomissements et des diarrhées. La mort des cellules hématopoïétiques va induire une aplasie médullaire partielle et celle des gamètes une infertilité (Stone et al., 2003).

Les effets tardifs peuvent être bénins ou graves et se développer progressivement ou soudainement. Ils sont donc difficilement prévisibles et traitables. Ils se produisent principalement dans les tissus avec un faible taux de renouvellement des cellules (tissu sous-cutané, tissu adipeux, muscle, cerveau, reins, foie). Les lésions tardives se

caractérisent par une fibrose, une nécrose et une atrophie des tissus ainsi que par des dommages vasculaires. L'induction des effets tardifs fait intervenir de nombreux processus cellulaires impliquant l'ensemble des compartiments du tissu. Outre la mort des cellules après irradiation, les cellules survivantes et activées par l'irradiation sécrètent des cytokines, conduisant à une réponse inflammatoire nécessaire au processus de cicatrisation. Cependant, la persistance de signaux pro-inflammatoire engendre un stress cellulaire chronique aboutissant au développement de dommages vasculaires et à la fibrose des tissus délétères au bon fonctionnement de l'organe (Milliat et al., 2008; Stone et al., 2003).

III- Réponse de l'endothélium au stress oxydant

Tel que déjà présenté dans le paragraphe I, l'endothélium régule d'importantes fonctions assurant l'homéostasie tissulaire et dont toute dérégulation peut conduire à la dysfonction endothéliale. Celle-ci se caractérise principalement par un endothélium pro-inflammatoire et pro-thrombotique, dû à l'augmentation de l'adhésion des cellules à la surface de l'endothélium, à l'activation de la coagulation, à l'altération du tonus vasculaire et à une augmentation de la perméabilité (Alom-Ruiz et al., 2008). Le stress oxydant est le principal facteur de la dysfonction endothéliale impliquée dans des pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension et l'athérosclérose (Féléto and Vanhoutte, 2006). En réponse au stress oxydant induit par les rayonnements ionisants, les cellules endothéliales subissent également de nombreuses modifications morphologiques et fonctionnelles participant à la dysfonction de l'endothélium. L'altération de ces fonctions aboutit inévitablement à la dysfonction de l'organe irrigué et joue un rôle majeur dans l'initiation et le maintien des dommages tissulaires radio-induits. Afin de limiter les dommages de l'endothélium induits par le stress oxydant et de préserver au mieux les tissus sains de la toxicité radio-induite, il est donc important de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les cellules endothéliales (Milliat et al., 2008).

1- La cellule endothéliale participe à la production de ROS

La cellule endothéliale produit des ROS en réponse à divers stimuli tels que la réoxygénation, l'hypercholestérolémie ou les forces de cisaillement (Boueiz and Hassoun, 2009). Les ROS régulent de nombreuses voies de signalisation impliquées dans l'activation des cellules endothéliales. Comme nous avons pu le voir dans le paragraphe I-2, les sources des ROS sont très variées. Ils peuvent être de source exogène ou endogène et plus particulièrement au niveau des cellules endothéliales, la NADPH oxydase endothéliale (NOX), la NO synthase endothéliale (eNOS) et la xanthine oxydase (XO) vont participer à l'augmentation des ROS intracellulaires et contribuer à la dysfonction endothéliale (Figure 1-12) (Cai and Harrison, 2000).

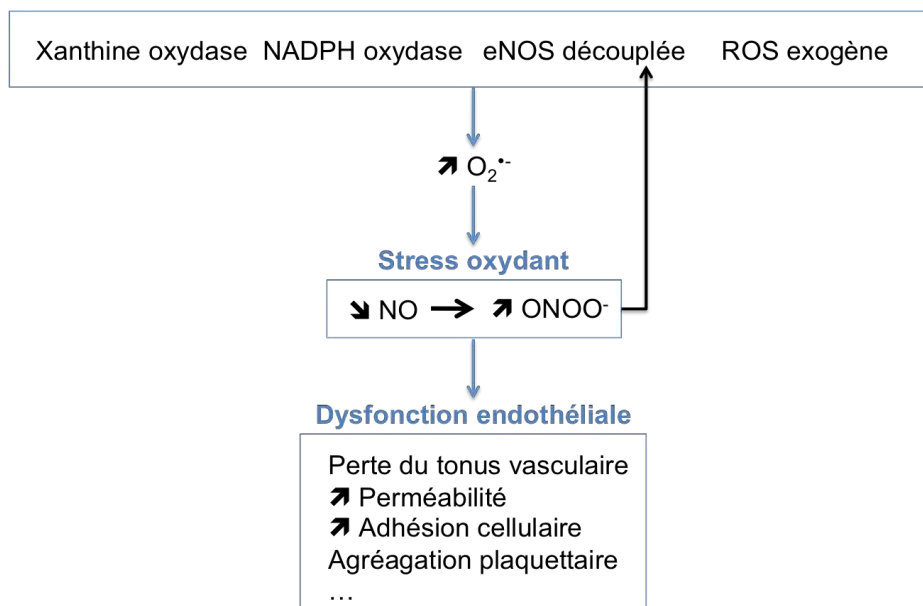


Figure 1-12 : Les sources endothéliales de ROS participant à l'état de stress oxydant et à la dysfonction endothéliale (Cai and Harrison, 2000)

a- La NADPH oxydase endothéliale (NOX)

Les cellules endothéliales expriment les isoformes NOX 1, 2, 4 et 5. Elles peuvent être activées par divers stimuli tels que, le stress mécanique, les facteurs de croissance (VEGF, PDGF) ou encore l'ANGII (Panieri and Santoro, 2015). La NOX2 est la première isoforme identifiée dans les cellules endothéliales. Elle est régulée, entre autre, dans les cellules endothéliales par le facteur $p47^{phox}$ qui est retrouvé associé au cytosquelette intracellulaire en absence de stimulation, mais qui est très rapidement transloquée à la membrane en réponse à divers stimuli (Alom-Ruiz et al., 2008a; Drummond and Sobey, 2014). L'activation de la NOX 2 va favoriser la prolifération et la migration endothéliale (Garrido-Urbani et al., 2014; Panieri and Santoro, 2015). La NOX 4, fortement exprimée dans les cellules endothéliales, est quant à elle constitutivement active (Ago et al., 2004), mais peut cependant être régulée en réponse aux hormones (ANGII, ET-1), aux facteurs de croissance (PDGF, TGF), ainsi qu'aux lipides oxydés (Briones and Touyz, 2010). Elle est principalement localisée au niveau des membranes du réticulum endoplasmique et périnucléaire (Alom-Ruiz et al., 2008a; Briones and Touyz, 2010). La NOX 4 peut favoriser le stress oxydant et elle est également impliquée dans le contrôle de la prolifération (Garrido-Urbani et al., 2014; Panieri and Santoro, 2015).

b- La NO synthétase endothéliale (eNOS)

La eNOS est une enzyme homodimérique nécessitant des co-substrats (O_2 , NADPH) et des co-facteurs (Heme, Ca^{2+} /Calmoduline, tetrahydrobiopterine (BH4)) permettant la stabilisation de l'enzyme et son bon fonctionnement. La eNOS induit l'oxydation de la L-arginine pour former de la L-citrulline et du NO. En condition basale, la eNOS liée à la membrane est inactive. Son expression peut être stimulée par le VEGF et inhibée par l'hypoxie. La eNOS est activée en réponse à l'activation des récepteurs à l'acétylcholine, la thrombine et l'histamine ainsi qu'en réponse au stress mécanique (force de cisaillement, déformation). Son activité peut également être régulée par sa phosphorylation par diverses kinases dont Akt, PKA (*Protein kinase A*), et AMPK (*AMP-activated protein kinase*). Le NO produit induit la vasodilatation, inhibe l'adhésion des leucocytes et l'agrégation plaquettaire et participe ainsi au maintien de l'homéostasie vasculaire (Cines et al., 1998; Förstermann, 2010; Michiels, 2003).

En condition de stress oxydant qui dérégule la biodisponibilité de ses co-facteurs, l'enzyme eNOS devient structurellement instable, son activité enzymatique est découplée conduisant à la production d' $O_2^{\bullet-}$ et non de NO. Cette production d' $O_2^{\bullet-}$ par la eNOS découplée favorise l'état de stress oxydant et participe donc à la dysfonction endothéliale et au développement de pathologies vasculaires comme l'athérosclérose et l'hypertension (Briones and Touyz, 2010; Förstermann, 2010; Sullivan and Pollock, 2006).

c- La xanthine oxydase (XO)

La XO générée par protéolyse de la xanthine déhydrogénase est une enzyme catalysant l'oxydation de l'hypoxanthine, conduisant à la production d' $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 . La XO est présente dans la circulation sanguine et dans les cellules endothéliales. Elle peut être activée par la NOX, l'ANG-II et l'IFN- γ (Cai and Harrison, 2000; Landmesser et al., 2007). De nombreuses études ont démontré une augmentation de ROS liée à l'augmentation d'activité de la XO. L'activation de la XO est également retrouvée associée à de nombreuses pathologies cardiovasculaire comme l'hypertension, l'athérosclérose et la sténose carotidienne (Briones and Touyz, 2010; Förstermann, 2010).

2- Réponse au stress oxydant

a- Effets délétères du stress oxydant sur la cellule endothéliale

Un stress oxydant aigu et chronique induit une activation exacerbée des cellules endothéliales pouvant conduire à la dysfonction endothéliale (Huet et al., 2011). Cette dysfonction endothéliale se caractérise par une dérégulation du tonus vasculaire généralement associée à l'altération des autres fonctions de l'endothélium telles que la perméabilité et l'adhésion cellulaire (Figure 1-12). Ces dysfonctions sont marquées par une altération des voies de signalisation, une activation de certains facteurs de transcription, une réorganisation du cytosquelette, une augmentation de l'expression des chimiokines et des molécules adhésion, conduisant inévitablement à l'altération de la barrière endothéliale (Boueiz and Hassoun, 2009).

- Déséquilibre du tonus vasculaire

La dysfonction endothéliale se caractérise initialement par une dérégulation de la balance vasodilatation/vasoconstriction des vaisseaux, due principalement à une diminution de la disponibilité du NO en faveur de la production de ROS (Cai and Harrison, 2000). En effet, les ROS vont interagir avec le NO pour générer du peroxy-nitrite ONOO^- . Ils vont également altérer la production de NO par la eNOS en favorisant le découplage de l'activité enzymatique de la eNOS (cf. paragraphe III-1-b). De plus, les ROS peuvent induire l'inactivation de la prostacycline synthase conduisant à une diminution de PGI_2 (Zou et al., 2004).

- Augmentation de la perméabilité

La perméabilité endothéliale est principalement régulée par les jonctions intercellulaires et la contractilité des cellules. Les ROS vont induire une altération de la distribution des molécules d'adhésion telles que la VE-cadhérine, l' α -caténine et les intégrines conduisant à une perte des jonctions intercellulaires et des points d'ancrage du cytosquelette (Lum and Roebuck, 2001). Les ROS induisent également une réorganisation du cytosquelette d'actine caractérisée par une augmentation de la polymérisation de l'actine, la formation de lamellipodes et de fibres de stress dues à l'altération des voies de signalisation impliquées (Houle and Huot, 2006). En effet, les protéines kinases au cœur de la régulation de la perméabilité sont altérées par les ROS. La voie de signalisation p38 MAPK activée en réponse au ROS induit la

phosphorylation de la protéine Hsp27 (*Heat Shock Protein 27*), via la kinase MK2 (*MAPK-activated protein kinase 2*), favorisant la formation des fibres de stress (Houle and Huot, 2006; Lum and Roebuck, 2001). De même, la MLCK, activée par une augmentation de Ca^{2+} induite par les ROS, va phosphoryler la MLC (*Myosin light chain*) et favoriser la contraction cellulaire (Lum and Malik, 1994; Lum and Roebuck, 2001). La PKC, également impliquée dans la régulation de la perméabilité, est activée par les ROS. L'activation de la PKC favorise la réorganisation du cytosquelette d'actine et le désassemblage des jonctions en phosphorylant la vinculine, la taline, la caldesmone et la vimentine, protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette (Lum and Malik, 1994; Lum and Roebuck, 2001). Les ROS vont également modifier l'activité des Rho-GTPases, protéines jouant un rôle majeur dans la réorganisation du cytosquelette. En effet, l'activation de RhoA favorise la contraction cellulaire via la phosphorylation de la MLC et le désassemblage des jonctions via la phosphorylation de la protéine de jonction, l'occludine, par la kinase ROCK (*Rho-associated protein kinase*) (Lum and Roebuck, 2001; Vandembroucke et al., 2008) (Figure 1-13).

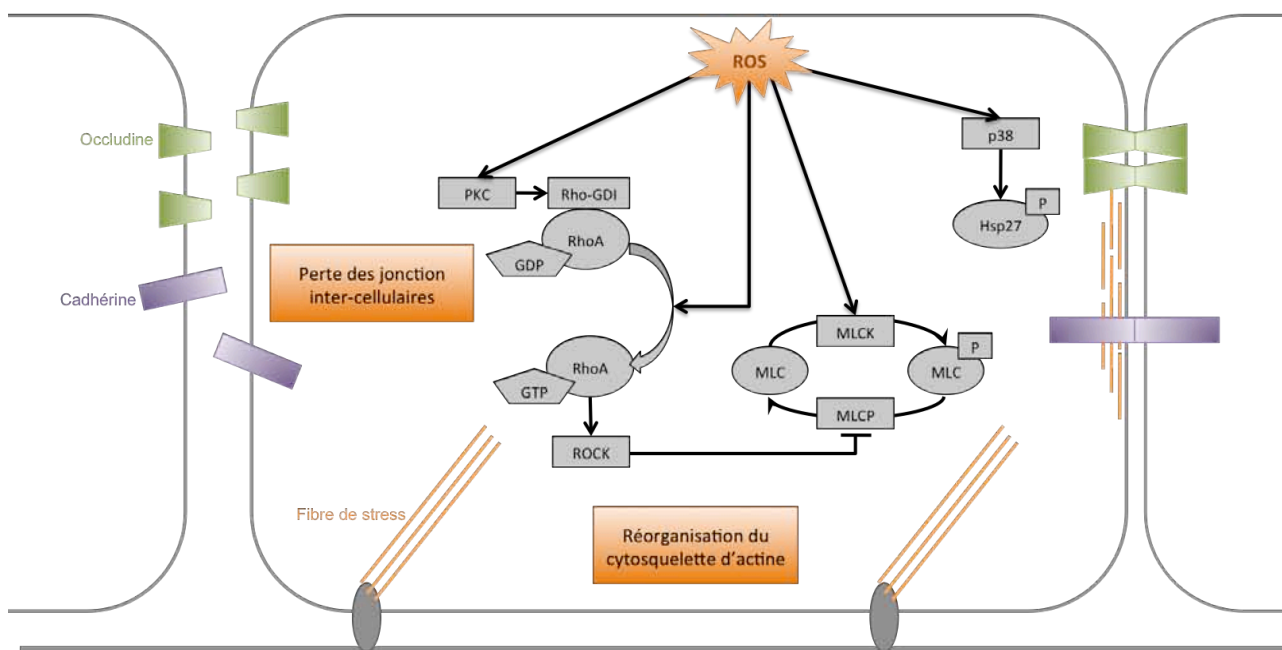


Figure 1-13 : Le mécanisme de dérégulation de la perméabilité endothéliale en réponse au stress oxydant

- **Augmentation de l'adhésion**

L'augmentation de l'adhésion des leucocytes à la surface des cellules endothéliales est principalement caractérisée par l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, telles que VCAM, ICAM, E-sélectine et P-sélectine, induites par le stress oxydant (Gaboury et al., 1994; Lo et al., 1993; Wagener et al., 1997). En effet, nous avons déjà pu voir que les ROS régulent l'activation de facteurs de transcription (cf. paragraphe II-1-e), comme AP-1 et NF κ -B permettant l'augmentation de l'expression des protéines d'adhésion (Lum and Roebuck, 2001). L'adhésion des leucocytes à la surface des cellules endothéliales permet leur transmigration facilitée par l'augmentation de perméabilité et la contraction des cellules endothéliales induites par les ROS (Boueiz and Hassoun, 2009; Lum and Roebuck, 2001).

- **L'apoptose**

Le stress oxydant peut également induire l'apoptose des cellules endothéliales (Leal et al., 2009; Lin et al., 2000). Comme nous avons pu le voir dans le paragraphe II-1-e, le stress oxydant régule de nombreuses voies de signalisation pouvant être impliquées dans l'apoptose des cellules endothéliales, comme la voie p38 MAPK (Yin et al., 2013), ainsi que d'autres voies activées en aval du TNF α (Xia et al., 2006). L'activité des caspases est également influencée par le stress oxydant (Hampton et al., 1998). Les ROS participent aussi à l'apoptose radio-induite détaillée plus précisément dans le paragraphe III-3-b.

- **La sénescence endothéliale**

La sénescence endothéliale peut être induite par de nombreux facteurs dont le stress oxydant qui joue un rôle majeur (Bhayadia et al., 2015). Le stress oxydant induit la sénescence endothéliale en agissant à plusieurs niveaux. Il peut induire directement des dommages à l'ADN et ainsi provoquer un raccourcissement des télomères favorisant la sénescence. Il peut aussi agir indirectement en inhibant l'activité de la télomérase (Erusalimsky, 2009). Le stress oxydant peut aussi provoquer des dommages à l'ADN non-téломérique permettant l'induction d'une signalisation dépendante des dommages à l'ADN, comme la voie ATM/Akt/p53/p21 favorisant la dysfonction endothéliale et la sénescence prématurée (Zhan et al., 2010). Ces dommages à l'ADN peuvent provoquer dans les cellules la formation de foyers de dommages à l'ADN persistants (Campisi, 2013). Les cellules sénescents peuvent également présenter un

niveau de ROS élevé dû à l'altération du réseau mitochondrial et/ou un défaut de régulation des ROS par les anti- et pro-oxydants favorisant ainsi l'état de stress oxydant (Muller, 2009). Le stress oxydant est donc à la fois une cause et une conséquence de la sénescence.

La sénescence prématurée des cellules endothéliales joue un rôle majeur dans l'induction des pathologies cardiovasculaires (Wang and Bennett, 2012), liées notamment à d'importantes altérations endothéliales (Erusalimsky, 2009).

b- Conséquences tissulaires de la dysfonction endothéliale

La dysfonction de l'endothélium est impliquée dans diverses maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose et l'hypertension (Madamanchi et al., 2005), ainsi que dans des processus pathologiques comme le processus métastatique (Simoneau et al., 2012).

- L'athérosclérose

L'athérosclérose correspond à l'inflammation chronique de la paroi artérielle qui s'accompagne de l'épaississement de celle-ci via la formation de plaques d'athérome qui conduit à la sténose (rétrécissement de la lumière artérielle), puis à la thrombose (obstruction totale de la lumière artérielle). La plaque d'athérome est essentiellement composée d'une couche fibreuse riche en cellules musculaires lisses et en collagène entourant un noyau nécrotique composé de macrophages spumeux, de débris cellulaires et de lipides (Wang and Bennett, 2012). La formation de la plaque d'athérome est initiée par la dysfonction endothéliale pouvant être provoquée par la présence de lipoprotéines oxydées (LDL-ox) par les ROS. Au niveau du compartiment endothélial, l'augmentation de la perméabilité, la surexpression des molécules d'adhésion, et la sécrétion de molécules pro-inflammatoires, permettent l'infiltration de lipides, de LDL-ox et de cellules immunitaires dans le tissu sous-jacent. Les monocytes recrutés vont se différencier en macrophages et phagocyter les LDL-ox aboutissant à la formation de macrophages spumeux qui sécrètent alors des cytokines pro-inflammatoires et qui participent aussi à la formation du noyau nécrotique et à la production de ROS. Cet environnement inflammatoire favorise la prolifération et la migration des CMLV de la média vers l'intima où elles vont synthétiser du collagène et ainsi former la couche fibreuse de la plaque d'athérome. Ces CMLV et les cellules endothéliales vont ensuite mourir par apoptose ce qui conduit à la rupture de la plaque créant une surface pro-

thrombotique. L'agrégation plaquettaire va induire la formation d'un thrombus pouvant provoquer l'occlusion de la lumière du vaisseau (Madamanchi et al., 2005; Wang and Bennett, 2012). Les ROS ont une place très importante dans ce processus pathologique en intervenant à plusieurs niveaux : dans l'initiation en induisant la dysfonction endothéliale, en oxydant les LDL et en favorisant la prolifération et la migration des CMLV, mais aussi dans la rupture de la plaque en participant à l'apoptose des cellules (Papaharalambus and Griendling, 2007).

- **L'hypertension**

Afin de répondre aux variations de pression du flux sanguin, les vaisseaux possèdent une certaine souplesse leur permettant de se dilater ou de se contracter en réponse aux vasoconstricteurs ou vasodilatateurs sécrétés. Dans l'hypertension, le système vasculaire subit des altérations fonctionnelles et structurales : dysfonction endothéliale et altération de la contractilité et du remodelage des vaisseaux, engendrant une mauvaise adaptation des vaisseaux aux variations hémodynamiques. Le stress oxydant est principalement impliqué dans l'altération de ces fonctions. Les ROS diminuent notamment la biodisponibilité du NO et augmentent la perméabilité endothéliale. Ils induisent aussi le remodelage vasculaire en favorisant la prolifération des CMLV et la synthèse de collagène, conduisant à l'hypertrophie de la paroi artérielle (Briones and Touyz, 2010). L'hypertension artérielle est impliquée dans de graves complications cardiovasculaires, comme l'infarctus du myocarde, l'insuffisance rénale, et l'insuffisance cardiaque.

- **Processus métastatique**

Lors du processus métastatique, les cellules endothéliales jouent un rôle très important dans l'intravasation des cellules tumorales afin qu'elles puissent passer du foyer tumoral primaire vers la circulation sanguine mais aussi dans l'extravasation qui permet la sortie des cellules tumorales du système vasculaire vers le tissu et ainsi permettre la formation d'un second site tumoral. Plusieurs études montrent que la perte de l'intégrité de la barrière endothéliale est favorable au processus métastatique (Gout et al., 2008; Sahni et al., 2009; Simoneau et al., 2012).

3- Cas particulier des fortes doses d'irradiation : rôle de l'endothélium

a- Les principales avancées de la radiothérapie externe

Tel que mentionné précédemment, la radio-toxicité du tissu sain péri-tumoral constitue aujourd'hui le principal facteur limitant à l'augmentation des doses délivrées en radiothérapie et donc limite l'utilisation de fortes doses d'irradiation, permettant une meilleure destruction des cellules tumorales. Un des enjeux majeurs de la radiothérapie est donc de cibler efficacement la tumeur tout en limitant la dose reçue aux tissus sains avoisinants. Ainsi l'optimisation de la radiothérapie repose sur l'amélioration de la balance bénéfice/risque (Milliat et al., 2008).

Ces dernières années, les effets secondaires liés à cette approche thérapeutique ont pu être limités grâce à de nombreuses avancées techniques permettant un meilleur ciblage de la zone à irradier et une meilleure distribution de la dose au volume tumoral. La radiothérapie guidée par imagerie (IGRT) permet de faire correspondre le plus précisément possible le volume irradié au volume de la tumeur grâce à l'imagerie. La radiothérapie à modulation d'intensité (IMRT) consiste à faire varier l'intensité du faisceau en cours d'irradiation, pour s'adapter au mieux au volume tumoral à irradier. La radiothérapie stéréotaxique (SBRT) est une technique de radiothérapie de haute précision utilisant des microfaisceaux de photons ou de protons qui convergent au centre de la tumeur permettant de déposer des fortes doses. De même, le développement de nouveaux appareils d'irradiation, comme la tomothérapie, permettant une distribution de la dose de manière hélicoïdale ou l'ajout de la robotisation intelligente au appareil d'irradiation (Cyberknife[®]), participent à l'émergence de ces nouvelles thérapies en permettant de contrôler le volume de la zone irradiée. Enfin, l'utilisation émergente de nouvelles sources d'irradiation (hadronthérapie), telles que l'utilisation de faisceaux d'ions carbone ou de protons (protonthérapie), déposant peu d'énergie sur leur parcours, contribuent également à augmenter la précision de la distribution de la dose d'irradiation tout en protégeant le tissu sain traversé par le faisceau (Bhide and Nutting, 2010).

Malgré toutes ces avancées, la toxicité aux tissus sains reste encore mal comprise. Comprendre les effets délétères de l'irradiation sur les tissus sains est aujourd'hui un enjeu important afin de prévenir, maîtriser et traiter cette toxicité radio-induite. Pour cela, il est nécessaire d'appréhender et de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse du tissu sain à l'irradiation (Figure 1-14).

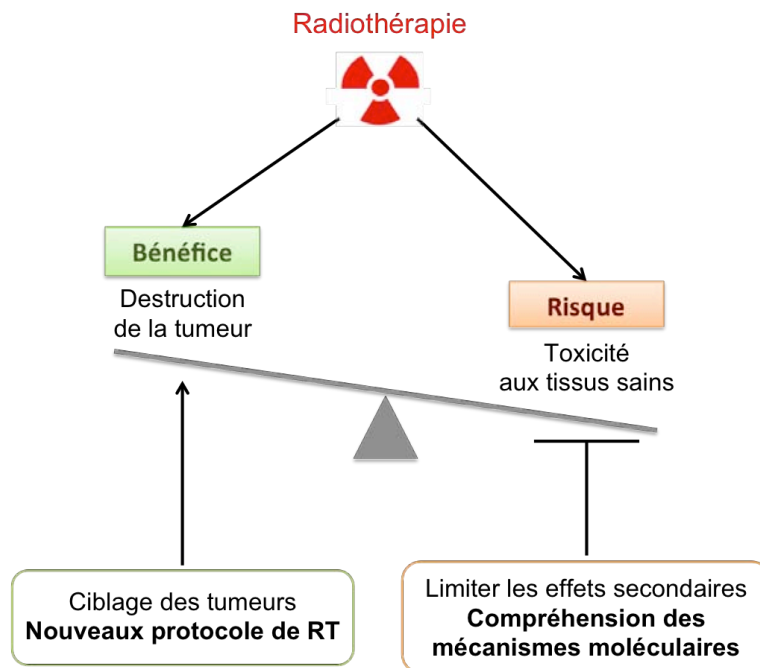


Figure 1-14 : Les enjeux de la radiothérapie (Milliat et al., 2008)

b- Radiosensibilité des cellules endothéliales

Il est admis depuis quelques années maintenant que le compartiment endothélial joue un rôle clé dans la réponse à la radiothérapie (Fuks and Kolesnick, 2005). Comme nous l'avons précédemment évoqué, ce compartiment est une cible importante des rayonnements ionisants qui induisent un ensemble d'altérations déjà décrites dans le paragraphe II-2. Ces altérations radio-induites de l'endothélium jouent un rôle clé dans l'initiation et la progression des dommages radio-induits aux tissus sains et participent ainsi aux effets secondaires précoces et tardifs (Milliat et al., 2008) (Figure 1-15).

- L'activation de l'endothélium

L'irradiation, avec la participation des ROS radio-induits, peut conduire à d'importantes dysfonctions endothéliales et favoriser les dommages tissulaires. En effet, l'irradiation induit une altération du tonus vasculaire dépendante de la diminution de NO et de la production de ROS (Hatoum et al., 2006; Hong et al., 2013; Soloviev et al., 2003). Cette altération radio-induite du tonus vasculaire caractérisée par une diminution de la vasodilatation, est également corrélée à l'altération de la barrière endothéliale. En effet, l'irradiation induit une augmentation de la perméabilité (Fauquette et al., 2012; Gabrys et al., 2007), une altération de l'adhésion et de la migration endothéliale (Rousseau et al., 2011) dépendantes de la réorganisation du cytosquelette.

En réponse à l'irradiation les cellules endothéliales acquièrent également un phénotype pro-inflammatoire et pro-thrombotique caractérisé *in vivo* (Halle et al., 2010; Mihaescu et al., 2011; Mouthon et al., 2003; Van der Meeren et al., 2003) et *in vitro* (Gaugler et al., 1997, 2004; Van Der Meeren et al., 1999). L'augmentation d'expression des molécules d'adhésion comme VCAM-1, PCAM-1, ICAM-1, E- et P-sélectines décrites *in vitro* permet le recrutement de cellules inflammatoires et favorise l'adhésion plaquettaire. De plus, l'utilisation des souris ICAM^{-/-} a permis de démontrer une diminution de l'adhésion des leucocytes après irradiation (Mollà et al., 2003), ainsi qu'une diminution de l'inflammation pulmonaire chez ces souris après irradiation du thorax (Hallahan and Virudachalam, 1997). Ces études confirment le rôle clé de l'activation de l'endothélium dans l'inflammation radio-induite des tissus irradiés.

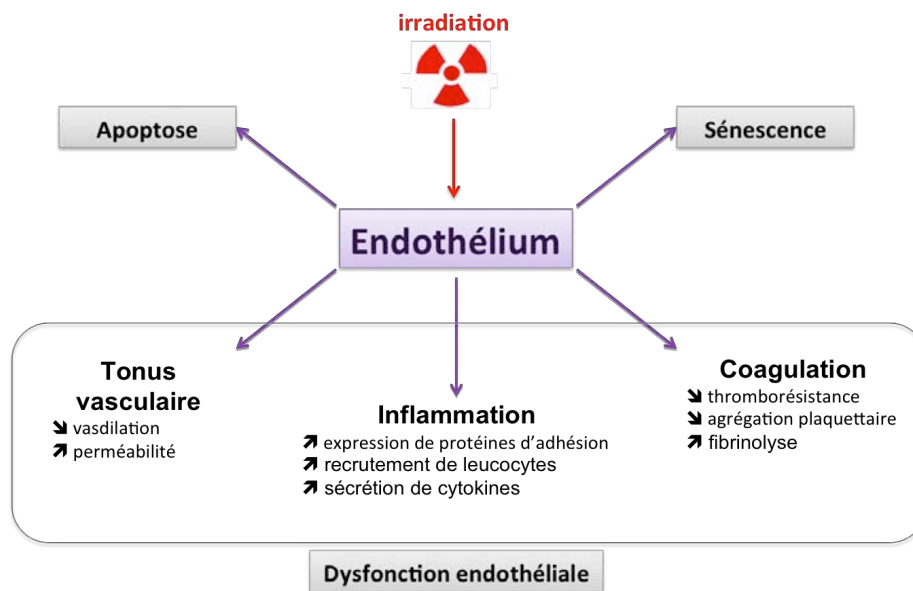


Figure 1-15 : Les principaux effets des radiations ionisantes sur l'endothélium

Une autre conséquence de l'irradiation de l'endothélium est l'activation de la coagulation. En effet, l'irradiation induit une perte de la thromborésistance en stimulant la fibrogenèse et en diminuant la fibrinolyse. L'inhibiteur des activateurs du plasminogène (PAI-1) est augmenté après irradiation (Halle et al., 2010) et limite la formation de plasmine responsable de la dégradation de la fibrine. L'irradiation induit également une modification du profil d'expression des protéines impliquées dans la coagulation (Chaudhry, 2008; Rithidech et al., 2009; Widlak et al., 2015). Quelques jours après irradiation, il a été démontré une augmentation des facteurs pro-coagulants comme le TF (Goldin-Lang et al., 2007; Van der Meeren et al., 2003) et une diminution

des facteurs anti-coagulants, comme la thrombomoduline (Van der Meeren et al., 2003; Zhou et al., 1992). Cette dérégulation du système de coagulation et la perte de thromborésistance sont à l'origine de fibroses radio-induites délétères pour les tissus.

- **La mort radio-induite des cellules endothéliales**

La mort des cellules endothéliales dépend de l'état prolifératif des cellules, mais également de la dose d'irradiation. Ces cellules peuvent mourir par mort mitotique, quand elles sont proliférantes et exposées à des rayonnements ionisants combinés à un traitement à l'angiotensine (Hari et al., 2000). Les cellules endothéliales progénitrices meurent par mort mitotique à des doses d'irradiation inférieures à 10Gy et par apoptose à des dose supérieures à 10Gy (Mendonca et al., 2011). Les cellules endothéliales microvasculaires (HMEC-1), après une irradiation à 15Gy, meurent précocement par apoptose dépendante de la voie du céramide, puis plus tardivement par mort mitotique dépendante des dommages à l'ADN (Bonnaud et al., 2007). Cette apoptose radio-induite des cellules endothéliales a également été confirmée dans des études *in vivo*. Chez des souris irradiées corps entier, il a été montré une apoptose des cellules endothéliales du système nerveux central (Peña et al., 2000), ainsi qu'une apoptose des cellules endothéliales du système intestinal participant aux dommages tissulaires radio-induits (Paris et al., 2001).

Des études *in vivo* ont mis en évidence l'implication de la voie du céramide dans cette apoptose radio-induite des cellules endothéliales. En effet, l'irradiation corps entier de souris *asm^{-/-}* protège les cellules endothéliales de l'apoptose radio-induite (Garcia-Barros et al., 2003; Peña et al., 2000). Tel que déjà présenté dans les paragraphes II-2-b, l'irradiation induit l'activation de la voie ASMase/céramide. Il a été plus particulièrement démontré dans les cellules endothéliales une implication du stress oxydant dans cette activation (Zhang et al., 2007a). L'utilisation d'antioxydants, inhibe l'activation et la translocation de l'ASMase dans les cellules endothéliales irradiées à 15Gy (Corre et al., 2013). Le céramide généré va jouer le rôle de second messager et induire diverses voies de signalisation (Mathias et al., 1998). Il va, entre autres, induire l'activation de plusieurs cascades de signalisation pro-apoptotique (cf. paragraphe II-2-d) (Figure 1-16). Les protéines impliquées dans ces voies de signalisation étant ubiquitaires, elles peuvent participer à l'apoptose des cellules endothéliales dépendantes du céramide. Cependant, la signalisation apoptotique induite par le céramide dans les cellules endothéliales reste encore peu caractérisée.

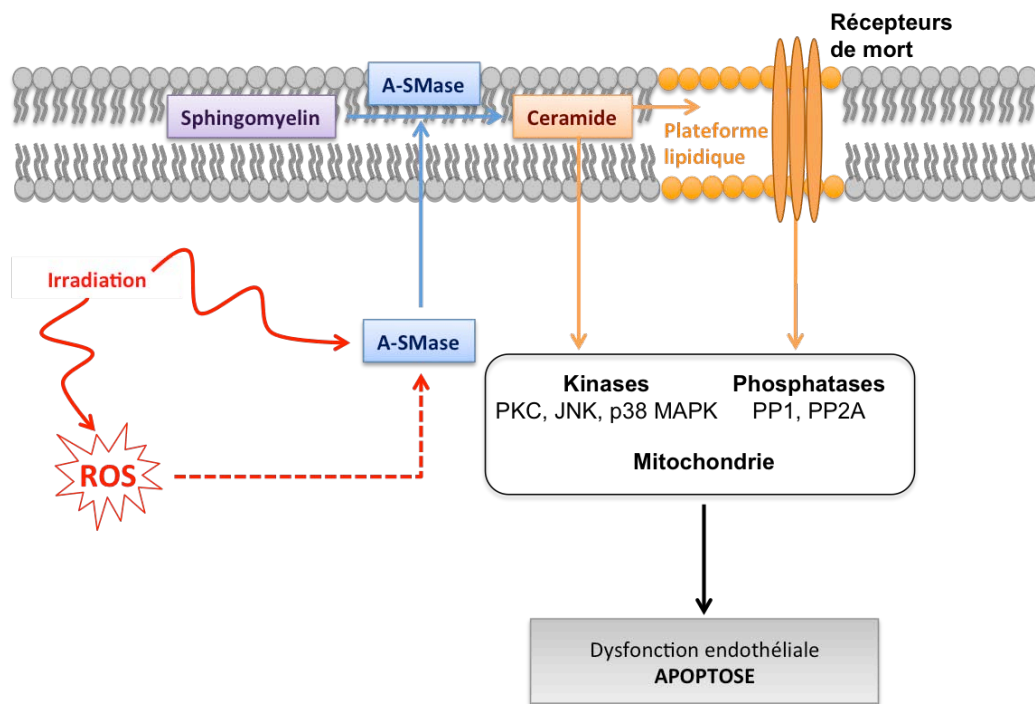


Figure 1-16 : La voie du céramide impliquée dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales

- La sénescence prématurée radio-induite des cellules endothéliales

La sénescence radio-induite a déjà pu être démontrée par de nombreuses études *in vitro* (Igarashi et al., 2007; Mendonca et al., 2011; Oh et al., 2001; Panganiban et al., 2013). Comme nous avons pu le voir précédemment dans le paragraphe III-2-a, les ROS jouent un rôle majeur dans l'induction de la sénescence. L'implication des ROS a été confirmée par une étude mettant en évidence une protection des cellules endothéliales de la sénescence radio-induite par l'inhibition des ROS radio-induits (Marampon et al., 2015). Cette sénescence endothéliale radio-induite implique les voies p38 MAPK (Marampon et al., 2015) et PI3K/Akt (Panganiban and Day, 2013), voies pouvant également être régulées par les ROS. La sénescence endothéliale se caractérise par une modification du profil sécrétoire et une altération de l'angiogénèse (Ungvari et al., 2013). L'accumulation radio-induite de cellules sénescents dans les tissus pourrait participer à certaines pathologies (Campisi, 2013; Muller, 2009). Cependant, l'implication de la sénescence endothéliale dans les lésions tissulaires radio-induites reste encore à éclaircir.

c- Rôle de la dysfonction endothéliale dans le développement des dommages tissulaires radio-induits

Il est maintenant admis, que l'initiation et la progression des dommages tissulaires radio-induits sont dues à la réponse de l'ensemble des compartiments cellulaires composant le tissu, et plus particulièrement l'endothélium (Milliat et al., 2008; Supiot and Paris, 2012). Les effets tissulaires précoces sont principalement dus à la mort radio-induite des cellules provoquant alors la dysfonction de l'organe, alors que les effets tardifs vont faire intervenir un ensemble de réponses cellulaires, dont la dysfonction endothéliale (Korpela and Liu, 2014). Cette dysfonction précède l'altération des tissus et participe donc à l'induction des dommages tardifs radio-induit en induisant l'ischémie, la nécrose et la fibrose des tissus irradiés (Milliat et al., 2008).

La fibrose radio-induite est un dommage tissulaire tardif décrit dans de nombreux tissus et organes irradiés : la peau, les poumons, le cœur, les reins, le rectum et également l'intestin. La fibrose peut dans les cas les moins sévères altérer la qualité de vie du patient mais elle peut également engager le pronostic vital dans les cas les plus graves. La fibrose se caractérise par une diminution de l'élasticité, de la compliance et de la structure des tissus. Elle est principalement due à une sclérose vasculaire et une accumulation progressive de MEC, plus particulièrement de collagène, dû à un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des constituants de la MEC. Les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu sont comparables au processus de cicatrisation pathologique, médié par les cellules endothéliales, inflammatoires, fibroblastiques et épithéliales, et caractérisé par l'activation et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL1, IL6) pro-fibrosantes (TGF β , IL13), de facteurs de croissance, d'enzymes protéolytiques (thrombine) et de chimiokines (Bentzen, 2006).

L'irradiation va induire l'activation de l'endothélium et l'expression de molécules pro-inflammatoires favorisant l'infiltration de cellules immunitaires, créant un environnement pro-inflammatoire chronique (cf. paragraphe III-3-b). Cette inflammation se caractérise par l'augmentation de la perméabilité endothéliale, la formation d'un œdème et une altération de la barrière endothéliale favorable à l'activation du système de coagulation. L'augmentation des facteurs pro-coagulants et pro-thrombotiques, comme la thrombine et le TGF β , ainsi que les macrophages activés vont favoriser la production de collagène et de MEC en favorisant la prolifération, le recrutement et l'activation des fibroblastes. Les fibroblastes activés vont se différencier en myofibroblastes et participer au déséquilibre entre la synthèse et la dégradation de la

MEC due à une diminution de l'expression de métalloprotéinases et une augmentation de l'expression d'inhibiteur des collagénases (Delanian and Lefaix, 2004; Denham and Hauer-Jensen, 2002).

Il est également important de noter que les ROS jouent un rôle essentiel dans l'induction des dommages tissulaires tardifs (Robbins and Zhao, 2004). En effet, les ROS peuvent participer à l'induction de la fibrose radio-induite. Comme nous avons déjà pu le voir, les ROS peuvent être induits par l'irradiation et un stress oxydant chronique peut être maintenu par l'altération des systèmes anti- et pro-oxydants. L'excès de ROS va déréguler la dégradation de la MEC, induire un phénotype endothélial pro-inflammatoire et pro-thrombotique et également favoriser l'activation des fibroblastes (Yarnold and Brotons, 2010).

IV- Les protéines p38 MAPK : protéines clés dans la réponse au stress oxydant

1- Généralités sur les MAPKs

La grande famille des MAPKs, très conservée au cours de l'évolution, permet la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. Les MAPKs, sont des enzymes qui possèdent une activité kinase leur permettant d'ajouter un groupement phosphate à leurs substrats. Cette modification post-traductionnelle joue un rôle essentiel dans l'activation et la transduction de signaux. On distingue trois principales sous-familles de MAPKs : les protéines ERK, les protéines JNK et les protéines p38 MAPK. L'activation des MAPKs s'effectue par une double phosphorylation sur un motif Thr-X-Tyr très conservé, où le résidu X peut être soit un résidu Gly, Pro ou Glu. La phosphorylation des MAPKs correspond à une cascade de phosphorylation effectuée en série par les MAPKs kinase kinase (MKKK), activées en réponse aux stimuli via les GTPases. Les MKKKs vont phosphoryler et activer les MAPKs kinase (MKK), qui à leur tour vont phosphoryler et activer les MAPKs et ainsi permettre la transduction et l'amplification du signal de façon spécifique en réponse à divers stimuli. Une fois activées, les MAPKs vont phosphoryler divers substrats sur des résidus Ser et Thr au niveau de motifs spécifiques Pro-X-Thr/Ser-Pro (Qi and Elion, 2005). La durée et le niveau d'activation des MAPKs dépendent fortement de leur état de phosphorylation régulée par l'action de phosphatases (Boutros et al., 2008).

La spécificité du signal induit par les MAPKs est dépendante du recrutement et de la liaison de partenaires spécifiques tels que des protéines activatrices, inhibitrices ou chaperonnes ainsi que de leur localisation sub-cellulaire. De plus, la liaison des MAPKs à leurs substrats fait intervenir des sites de recrutement spécifique, les « *docking sites* » (Biondi and Nebreda, 2003). Cependant, malgré cette spécificité, il existe une redondance et des « *cross-talk* » entre les voies MAPKs (Kyriakis and Avruch, 2012; Qi and Elion, 2005). Les MAPKs constituent donc un réseau de signalisation complexe activé par divers stimuli (facteurs de croissance, cytokines, choc thermique, UV, stress oxydant) régulant de nombreux substrats (facteurs de transcription, kinases, phosphatases, protéines cytosoliques) et ayant de nombreux mécanismes de régulation permettant ainsi une réponse spécifique de la cellule (Figure 1-17).

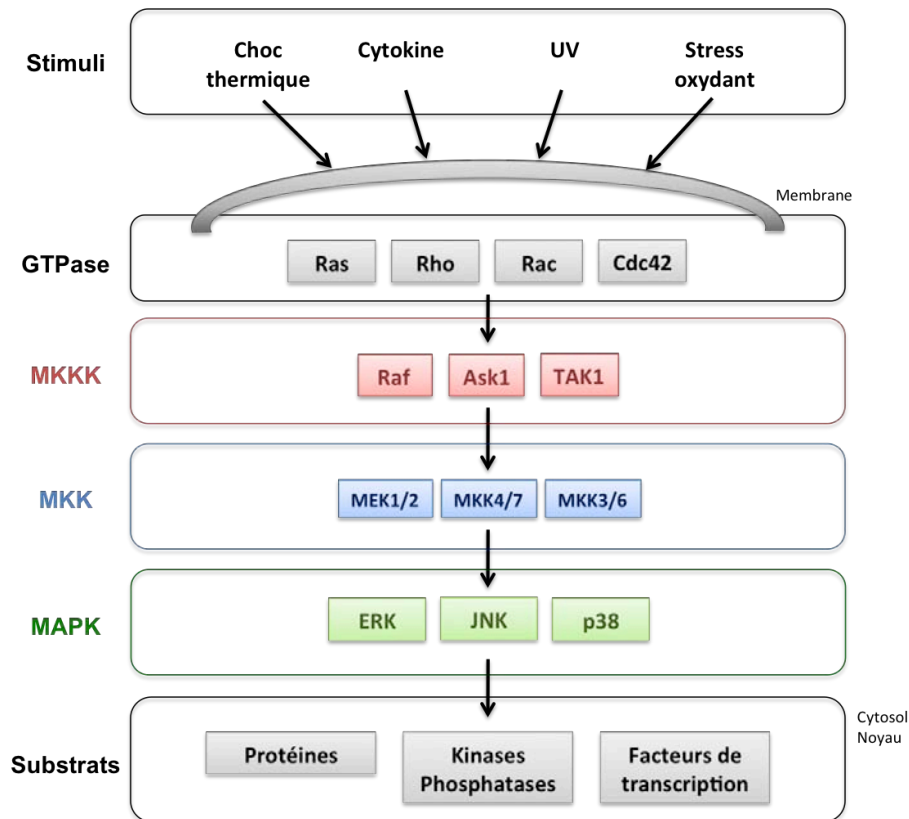


Figure 1-17 : La voie canonique d'activation des MAPKs

2- La voie p38 MAPK

La voie p38 MAPK est une voie importante permettant l'adaptation de la réponse cellulaire aux divers signaux extracellulaires via l'activation de nombreux mécanismes de régulation. Elle est principalement activée en réponse au stress et à l'inflammation et joue un rôle important dans la survie et la différenciation cellulaire.

a- Les isoformes de la famille p38 MAPK

La famille des p38 MAPK est constituée de quatre isoformes, p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ , issus de l'expression de différents gènes, mais partageant une forte homologie de séquence. L'expression dans les tissus varie selon les isoformes, p38 α est exprimée de façon ubiquitaire, alors que les autres isoformes sont exprimés préférentiellement dans certains tissus, comme p38 β exprimée dans le cerveau, p38 γ exprimée dans le muscle squelettique et p38 δ exprimée dans les glandes endocriniennes (Cuenda and Rousseau, 2007). Cependant, les différents membres de la famille p38 possèdent des spécificités identiques pour certains substrats ainsi qu'une certaine redondance dans leurs fonctions (Cuadrado and Nebreda, 2010). Malgré cela, il a été démontré, un

développement normal des souris invalidées pour les isoformes p38 β , p38 γ et p38 δ et une léthalité embryonnaire pour les souris invalidées pour l'isoforme p38 α (Gerits et al., 2007). Parmi les isoformes de p38 MAPK, p38 α est l'isoforme la mieux caractérisée et la plus étudiée. Dans la suite de ce manuscrit, le terme p38 se réfèrera à l'isoforme p38 α .

b- Régulation de la voie p38

- L'activation (Figure 1-18) :

La voie canonique d'activation de p38 : L'activation de la voie p38 est initiée par les MKKKs activées par divers stimuli. Parmi les MKKKs activant p38, Ask1 est activé par le stress oxydant, MEKK1 (MAPK/ERK kinase kinase) par les UV et le choc thermique, TAK1 (*TGF β -activated kinase 1*) par le TGF β , TPL2 (*Tumor progression loci 2*) par les cytokines inflammatoires. L'activation des MKKKs est finement régulée par leur complexation avec de nombreuses protéines, dont les petites GTPase de la famille Rho (Cuevas et al., 2007). Les MKKKs activées induisent l'activation des MKKs par leur phosphorylation au niveau de deux résidus, sérine et thréonine, localisés dans la boucle d'activation. Les MKKs principalement impliquées dans l'activation de p38 sont MKK3 et MKK6. Cependant, p38 peut être activée par d'autres MKKs, telle que MKK4 décrite principalement comme activateur de la voie JNK. Malgré la diversité des MKKs activant p38, la contribution de chacune est dépendante de leur niveau d'expression, du type de stimulus et du type cellulaire (Brancho et al., 2003). Les MKKs vont à leur tour phosphoryler p38 sur la thréonine 180 et la tyrosine 182. Cette double phosphorylation localisée au niveau de la boucle d'activation de p38, permet un changement de conformation stabilisant la boucle d'activation en conformation ouverte, facilitant ainsi la fixation du substrat et l'activité kinase de p38 (Cuadrado and Nebreda, 2010). La diversité des MKKKs et MKKs activant p38 et les nombreux mécanismes de régulation, permettent l'activation de la voie p38 en réponse à divers stimuli, faisant de p38 une protéine clé de la signalisation intracellulaire.

Les mécanismes non-canoniques d'activation de p38 : Il existe également d'autres mécanismes d'activation de p38. Dans les lymphocytes T, il a été démontré une activation de p38 par le TCR via la phosphorylation de p38 sur la Tyr323 par la protéine ZAP70 (*ζ -chain-associated protein kinase of 70 kDa*). Cette phosphorylation permet de stimuler l'auto-phosphorylation de p38 sur sa boucle d'activation (Salvador et al., 2005). De même, l'interaction de TAB1 (*TAK1-binding protein 1*) avec p38 permet l'activation

de p38 (Ge et al., 2002). En réponse à l'ischémie, ainsi qu'à d'autres stress, la liaison de TAB1 induit un réarrangement conformationnel de p38 au niveau de sa boucle d'activation permettant l'auto-phosphorylation activatrice de p38 (De Nicola et al., 2013; Kang et al., 2006).

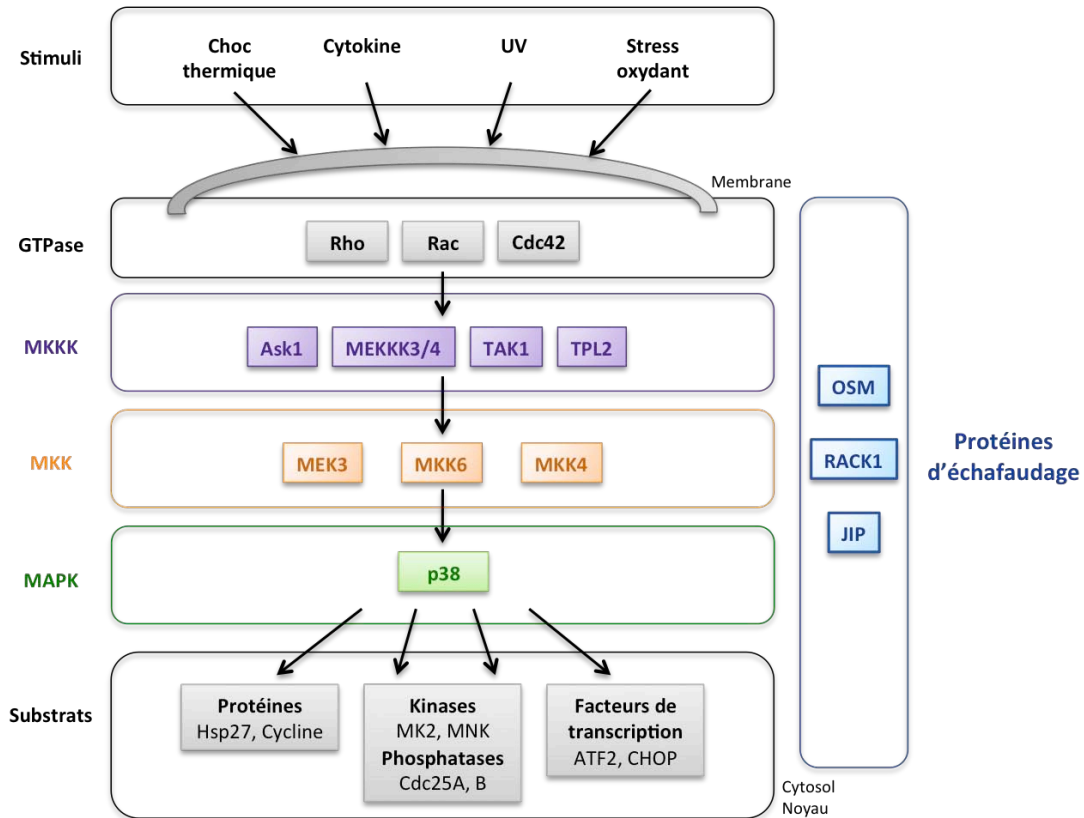


Figure 1-18 : La voie canonique d'activation de p38 MAPK

Le rôle des protéines d'échafaudage dans la régulation de p38 : les protéines d'échafaudage sont des protéines sans activité catalytique intrinsèque. Elles participent à la transduction des signaux intracellulaires via leur interaction avec les protéines impliquées dans la cascade de signalisation. Les protéines d'échafaudage sont impliquées dans la régulation de la cascade des MAPK en interagissant simultanément avec les MAPK et de nombreuses protéines (substrats, activateurs, inhibiteurs), ainsi qu'en régulant les changements conformationnels des MAPK nécessaires à leur activation (Cuadrado and Nebreda, 2010). De nombreuses protéines d'échafaudage de la voie p38 ont déjà pu être identifiées. La protéine OSM (*Osmosensing scaffold for MKKK3*) interagit avec Rac, MKKK3 et MKK3, formant un complexe protéique régulant l'activation de p38 en réponse à un choc osmotique (Uhlik et al., 2003). La protéine RACK1 (*Receptor for activated C kinase 1*) formant un complexe avec les

protéines RANK (*Receptor activator of NF- κ B*), TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*), TAK1 et MKK6 permet l'activation de p38 en réponse à la cytokine RANKL (*RANK ligand*) (Lin – 2015). RACK1 conduit également à l'activation de la voie p38 en interagissant directement avec MMK3/6 et augmentant l'activité kinase de MKK3/6 (Wang et al., 2015b). Les protéines de la famille JIP (*JNK-interacting proteins*) peuvent réguler l'activation de p38 en interagissant directement avec p38, mais aussi avec les protéines impliquées dans son activation, comme MKK3 ou des GEFs (*Guanine nucleotide exchange factors*) impliqués dans l'activation de Rac (Whitmarsh, 2006).

- **L'inactivation**

L'inactivation de p38 est également un élément crucial afin de permettre une activation transitoire de p38 et une régulation de l'intensité du signal, contribuant à la spécificité de la réponse cellulaire (Cuadrado and Nebreda, 2010).

L'inactivation de p38 est principalement due à la déphosphorylation des résidus thréonine et tyrosine au niveau de la boucle d'activation par les protéines phosphatases. La famille des DUPS (*Dual-specificity phosphatases*) ou MKPs (*MAPK phosphatases*) permet la double déphosphorylation des résidus thréonine et tyrosine (Boutros et al., 2008). Ces enzymes présentent une structure comparable aux MAPKs avec un site de liaison au substrat, le *docking site* et un site catalytique. L'interaction avec la MAPK conduit à un changement conformationnel de l'enzyme permettant d'augmenter son activité phosphatase. De même que pour l'activation des MAPKs, les MKPs peuvent être activées par divers stimuli (Owens and Keyse, 2007).

D'autres phosphatases peuvent également être impliquées dans la déphosphorylation et l'inactivation de p38, comme les serine/thréonine phosphatase de la famille PP2 (Cuadrado and Nebreda, 2010). Comme Wip1 (*Wild-type p53 induced phosphatase 1*), qui en réponse aux UV et au stress oxydant, induit la déphosphorylation de p38 (Takekawa et al., 2000). L'invalidation de Wip1 augmente la sensibilité des cellules aux rayonnements γ par l'induction de l'apoptose dépendante de la voie p38, démontrant l'importance de la régulation de p38 dans la réponse des cellules au stress (Wang et al., 2015a). De même, il a été démontré dans les cellules endothéliales que la serine/thréonine phosphatase PP2a peut interagir directement avec la forme active de p38 et dont l'inhibition favorise l'état phosphorylé de p38 (Lee et al., 2003). D'autres études ont aussi pu démontrer dans des cellules tumorales (Boudreau et

al., 2007; Lin et al., 2012) et des macrophages (Law et al., 2013) une augmentation de l'activité de p38 due à une inhibition de l'activité phosphatase de PP2a.

La phosphorylation de p38 peut également réguler négativement son activité, illustrant encore une fois la complexité de la voie p38 et de ses mécanismes de régulation. En effet, il a été démontré que la phosphorylation de p38 sur la Thr123 au niveau du *docking site*, diminue son activation et son activité, en diminuant l'association de p38 avec MKK6, ainsi que la liaison de p38 avec ses substrats (Peregrin et al., 2006).

- **La localisation sub-cellulaire**

La protéine p38 dans son état inactif non phosphorylée est au cytoplasme. Selon le type cellulaire et la nature du stimulus, p38 peut présenter une redistribution intracellulaire nécessaire pour notamment accéder à ses substrats qui peuvent être cytoplasmiques, mais aussi nucléaires (Cuadrado and Nebreda, 2010). Malgré le peu d'études pour comprendre les mécanismes impliqués dans la translocation de p38, il a été observé que dans certaines conditions p38 est préférentiellement accumulée au cytoplasme. En effet, l'interaction de p38 avec TAB1 favorise l'activation et la localisation cytoplasmique de p38 (Lu et al., 2006). De même, la protéine MK2 qui présente des séquences NES (*Nuclear Export Signal*) et NLS (*Nuclear localization signal*) participe à la localisation cytoplasmique de p38 (Ben-Levy et al., 1998; Gong et al., 2010). Pour d'autres stimuli, p38 transloque au noyau. En réponse à des stimuli induisant des dommages à l'ADN, la localisation nucléaire de p38 est dépendante de sa phosphorylation, mais pas de son activité kinase (Wood et al., 2009). Cependant, p38 n'ayant pas de séquence NLS, sa translocation nucléaire nécessite donc l'intervention de protéines partenaires telles que les importines ou des protéines ayant une séquence NLS (Cuadrado and Nebreda, 2010). Très récemment, il a été démontré que le translocation de p38 impliquait 3 importines de type β , soit les importines 3, 7 et 9 (Zehorai and Seger, 2014).

L'accumulation préférentielle de p38 au noyau ou au cytoplasme permet la phosphorylation de cibles spécifiques. Ainsi, la localisation sub-cellulaire de p38 est un autre mécanisme de régulation l'activité de la voie p38.

c- Les principaux substrats de la voie p38

La protéine p38 activée phosphoryle de nombreuses protéines impliquées dans de nombreuses voies de signalisation, régulant divers processus cellulaires. On compte parmi ses cibles, des protéines kinases, telles que les MSK (*Mitogen and stress-activated kinase*), les MNK (*MAPK interacting protein kinase*), et les MK (*MAPK-activated protein kinase*) (Cargnello and Roux, 2011), qui participent aussi à la phosphorylation de nombreuses cibles aussi bien nucléaires que cytoplasmiques.

- Substrats nucléaires

Parmi les cibles nucléaires, on dénombre de nombreux facteurs de transcription tels qu'ATF2 (*AMP-dependent transcription factor 2*) utilisé dans de nombreuses études comme contrôle d'activation de p38, c-Myc, p53, STAT 1 et 4 (*Signal transducer and activator of transcription*), ainsi que des protéines impliquées dans la régulation de la transcription comme les répresseurs HBP1 (*HMG box-containing protein 1*) et RB1 (*Retinoblastoma-associated protein 1*) (Trempelec et al., 2013). La phosphorylation de ces facteurs permet d'activer la transcription de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose, la croissance cellulaire, la réponse immunitaire et la réponse des dommages à l'ADN. Les protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine sont également des cibles de la voie p38, comme les histones H3 et H2AX, principalement démontré dans des cellules tumorales (Chiu et al., 2008; Dong et al., 2014; Hsiao et al., 2007; Wu et al., 2015), ainsi que la protéine HMG-14 (*High mobility group*) phosphorylée par les MSK (Cargnello and Roux, 2011).

Ainsi la voie p38 régule des facteurs, des répresseurs ou des activateurs de la transcription ainsi que le remodelage de la chromatine, permettant de réguler la transcription de nombreux gènes impliqués dans divers processus cellulaires (Cargnello and Roux, 2011; Cuadrado and Nebreda, 2010).

- Substrats cytosoliques

De nombreuses protéines cytoplasmiques sont phosphorylées par la voie p38. On retrouve parmi ses cibles des protéines liées à la réorganisation du cytosquelette comme la protéine Tau phosphorylée par p38 (Goedert et al., 1997; Lauretti and Praticò, 2015) et la protéine Hsp27 phosphorylée par la MK2 (Huot et al., 1997). L'activation de la voie p38 induit également la phosphorylation des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire comme les cyclines D1 et D3 ce qui induit leur

dégradation, et les phosphatases Cdc25 A et B ce qui favorise leur activité phosphatase (Cargnello and Roux, 2011; Cuenda and Rousseau, 2007). Les protéines impliquées dans l'apoptose comme les caspases 3 et 8, ainsi que de la protéine mitochondriale Bim, sont également des cibles de la voie p38 (Trempelec et al., 2013). La protéine p38 participe aussi à la génération de ROS en phosphorylant la sous-unité p47^{phox} de la NOX (Makni-Maalej et al., 2013). La voie p38 est également impliquée dans la régulation de protéines membranaires, comme le récepteur à l'EGF dont la phosphorylation par p38 favorise son internalisation (Cuadrado and Nebreda, 2010). Ces quelques exemples de substrats cytoplasmiques illustrent la grande diversité des fonctions régulées par la voie p38.

3- Les fonctions biologiques de p38 : voie essentielle dans le maintien de l'homéostasie

Comme nous venons de la voir, p38 a de nombreux substrats régulant de nombreuses fonctions cellulaires. Elle joue un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire où elle régule l'expression de cytokines et de molécules d'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. De plus, elle participe étroitement à la régulation de la migration cellulaire en régulant principalement la réorganisation du cytosquelette. Ainsi, p38 régule d'importantes fonctions biologiques impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire (Figure 1-19).

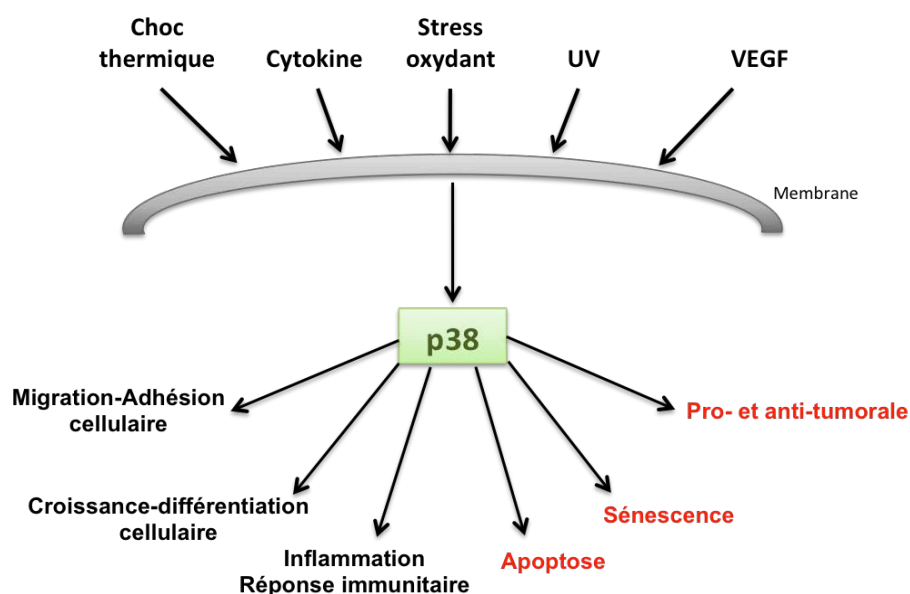


Figure 1-19 : Les principales fonctions de la voie p38 MAPK

a- Inflammation et réponse immunitaire

Les pathogènes, les virus, les signaux de danger, le stress conduisent très rapidement à une réaction inflammatoire caractérisée par une augmentation de la production de cytokines, une activation des cellules endothéliales et une activation des cellules immunitaires. A chacune de ces étapes, la protéine p38 peut intervenir.

L'activation de la voie p38 régule la production de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF α , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8 (Cuenda and Rousseau, 2007), mais aussi certains médiateurs comme l'enzyme COX-2 (*Cyclo-oxygenase 2*) (Grishin et al., 2006; Kim et al., 2005). La régulation des protéines de l'inflammation par p38 s'effectue par plusieurs mécanismes, dont la régulation de la stabilité des ARNm. En effet, l'ARNm de certaines protéines impliquées dans l'inflammation contient une séquence ARE (*AU-rich element*) localisée au niveau de la région non traduite 3'UTR, c'est le cas pour le TNF α , IL-6 et la protéine COX-2 (Cuenda and Rousseau, 2007). La présence de cette séquence ARE régule la stabilité et la traduction des ARNm. Certaines protéines se liant à l'ARN sont aussi des cibles de la voie p38, comme la protéine hnRNP-A1 capable de se lier aux séquences ARE et impliquée dans l'épissage, le transport et la traduction des ARNm (Buxadé et al., 2005; van der Houven van Oordt et al., 2000).

Les cellules endothéliales participent activement au processus d'inflammation. L'activation des cellules endothéliales conduisant à la sécrétion de cytokines et à l'expression de molécules d'adhésion est nécessaire au recrutement des cellules immunitaires. La voie p38 est impliquée dans l'activation des cellules endothéliales en réponse aux cytokines. En condition d'inflammation, p38 active l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1, PCAM-1 et E-sélectine, favorisant le recrutement des leucocytes (Pietersma et al., 1997; Roussel et al., 2010).

Enfin, p38 est également exprimée par de nombreuses cellules immunitaires. Elle est impliquée dans la prolifération, la différenciation et l'activation des lymphocytes T et des cellules dendritiques (Ashwell, 2006) ainsi que des macrophages (Kang et al., 2008). La voie p38 fortement impliquée dans la réponse immunitaire, est également à l'origine de maladies auto-immunes et inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde et l'asthme (Coulthard et al., 2009).

b- Croissance et différenciation cellulaire

En réponse à des stimuli extérieurs, p38 activée va induire la phosphorylation et l'activation de facteurs de transcription comme CHOP (*C/EBP homology protein*), CREB (*cAMP response element binding protein*) et AFT-1 régulant l'expression de gènes impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire (Tan et al., 1996; Wang and Ron, 1996). Il a été démontré, par inhibition de l'activité de p38, que la voie p38 est impliquée dans la différenciation de nombreux types cellulaires. L'activation de p38 intervient dans la différenciation des ostéoblastes (Guicheux et al., 2003), dans la myogenèse et la différenciation des myoblastes (Cuenda and Rousseau, 2007), ainsi que dans la différenciation des adipocytes (Nebreda and Porras, 2000) via la régulation des facteurs de transcription et le niveau des ARNm des protéines impliquées. L'utilisation *in vitro* et *in vivo* d'inhibiteurs pharmacologiques de p38 a également permis de démontrer l'implication de p38 dans l'angiogénèse (Tate et al., 2013) et la maturation des vaisseaux (Matsumoto et al., 2002). De nombreuses études ont également démontré le rôle de p38 dans la régulation du cycle cellulaire (Thornton and Rincon, 2009) en impliquant p38 dans l'arrêt du cycle en G1/S (Mikule et al., 2007; Sun et al., 2013) mais également en G2/M (Cha et al., 2007). En effet, parmi les substrats cytosoliques de p38, nous retrouvons des protéines impliquées dans la régulation du cycle, comme les cyclines et les phosphatases Cdc25 (Trempelec et al., 2013). p38 activée par le stress oxydant, le choc osmotique et les dommages à l'ADN, va également activer et stabiliser les protéine p53 et p21 (Thornton and Rincon, 2009). Enfin, la prolifération des cellules est également régulée par l'inhibition de contact cellule-cellule impliquant l'activation de p38 (Faust et al., 2005). La voie p38 joue donc un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération et la différenciation des cellules, dont toute dérégulation peut être délétère dans le cas de cancer, en favorisant la tumorigénèse et l'angiogénèse tumorale.

c- Régulation de la migration cellulaire : réorganisation du cytosquelette

La protéine p38 joue un rôle important dans le contrôle de la migration cellulaire, et plus particulièrement dans les cellules endothéliales où la voie p38/MK2/LIMK-1 activée par le VEGF, régule la réorganisation du cytosquelette d'actine et la migration des cellules endothéliales (Pin et al., 2012; Rousseau et al., 1997). La LIMK-1 (*LIM domain kinase 1*) active va phosphoryler la cofiline, inhibant son rôle dans la dépolymérisation de l'actine (Kobayashi et al., 2006). La LIMK-1 permet également la phosphorylation de l'annexine-1 impliquée dans la migration endothéliale induite par le

VEGF (Côté et al., 2010). De plus, la voie p38/MK2 activée en réponse au stress oxydant, va induire également la phosphorylation et l'activation de la protéine Hsp27 (Huot et al., 1997), protéine régulant la polymérisation de l'actine (Lavoie et al., 1993). D'autres protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette sont également des cibles de la voie p38, comme la caldesmone impliquée dans l'assemblage des filaments d'actine et la migration endothéliale (Mirzapoiazova et al., 2005). La paxilline, protéine localisée au niveau des points focaux d'adhésion essentiels pour un ancrage du cytosquelette, est également une cible de p38, dont la phosphorylation est impliquée dans la migration des fibroblastes (Lee et al., 2012). Récemment, il a également été démontré que l'activation de la protéine kinase impliquée dans la migration et la régulation des point focaux d'adhésion FAK (*Focal adhesion kinase*) est dépendante de PARK (*p38-regulated/activated kinase*) activée par p38 (Dwyer and Gelman, 2014; Yoshizuka et al., 2012). Ainsi, p38 joue un rôle clé dans la migration cellulaire, fonctions essentielles lors de l'embryogénèse, l'angiogénèse, ainsi que dans la réponse immunitaire. Cependant, une migration non-contrôlée peut être à l'origine de nombreuses pathologies, comme l'invasion tumorale et le développement de métastases.

De par son rôle central dans la réponse des cellules aux divers stimuli environnementaux, toutes dérégulations de la voie p38 peut conduire à d'importantes altérations cellulaires. La voie p38 est donc également impliquée dans de nombreuses pathologies, comme les maladies inflammatoires, les maladies cardiovasculaires et les cancers (Coulthard et al., 2009).

4- La voie p38 essentielle dans la réponse au stress oxydant

La protéine p38 est une protéine clé de la réponse au stress. Outre ces fonctions bénéfiques décrites précédemment, l'activation de p38 peut entraîner les cellules vers le processus apoptotique mais aussi vers la sénescence (Zarubin and Han, 2005).

a- Activation de p38 par le stress oxydant (Figure 1-20)

La protéine p38 est reconnue comme la kinase de réponse au stress, elle est activée par de nombreux stress tels que le stress oxydant, les rayonnements ionisants, le choc thermique (Dent et al., 2003; Zarubin and Han, 2005). En réponse au stress oxydant, la protéine Ask1 va induire l'activation de la voie p38. La protéine antioxydante TRX peut interagir de façon constitutive avec Ask1 inhibant son activité. La TRX sous forme réduite interagit avec Ask1 au niveau de sa partie N-terminale

empêchant l'oligomérisation de Ask1 et donc son activation. Les ROS vont induire l'oxydation de la TRX, qui va alors se dissocier de Ask1. Ask1 peut alors s'oligomériser permettant son autophosphorylation et son activation. Ask1 active induit l'activation de la cascade des MAPK induisant la phosphorylation et l'activation de p38 conduisant à un signal pro-apoptotique (Ray et al., 2012; Son et al., 2013). L'activation de p38 par les ROS a également été décrite dans les cellules endothéliales en réponse à une augmentation de peroxyde d'hydrogène (Bretón-Romero and Lamas, 2013). Le stress oxydant peut également réguler les phosphatases, et plus particulièrement les MKPs responsable de la déphosphorylation et de l'inactivation des MAPK (Son et al., 2013). De nombreux stress, tels que les ROS, le choc thermique, le choc osmotique, l'hypoxie, induisent une augmentation d'expression de MKP-1 (Boutros et al., 2008). Cependant, comme vu dans le paragraphe II-1-e, les phosphatases peuvent être oxydées par les ROS, conduisant à leur inactivation (Ray et al., 2012). En effet, il a été démontré dans des fibroblastes que l'inactivation de la MKP-1 par les ROS est corrélée à une activation de p38 (Liu et al., 2010).

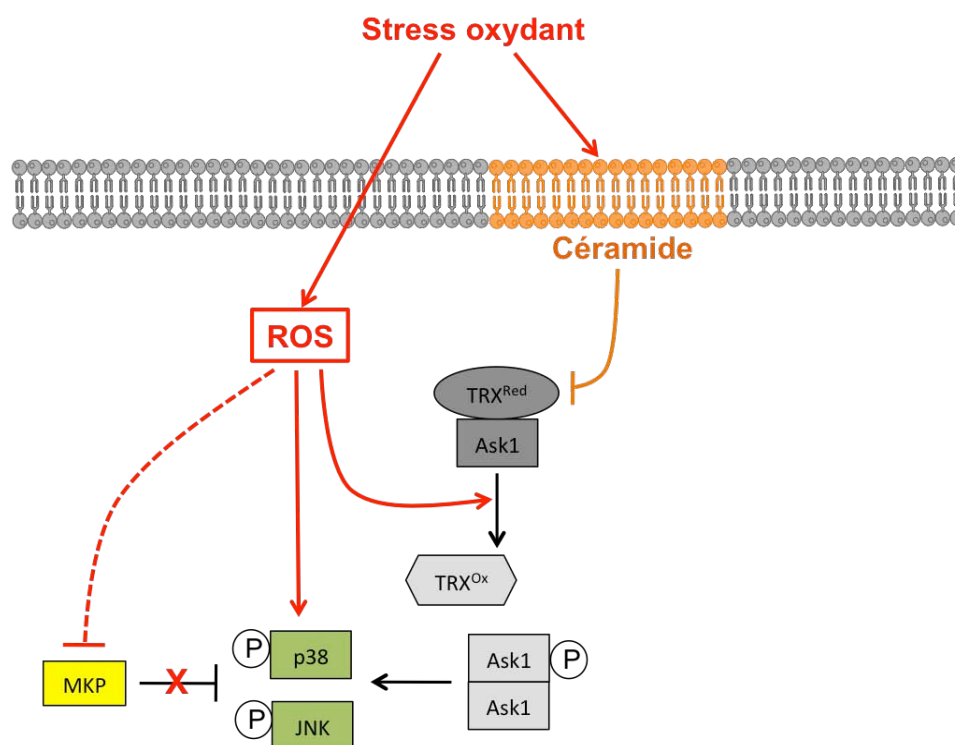


Figure 1-20 : Les principaux mécanismes d'activation de la voie p38 par les ROS (ligne continue : directement par l'activation des protéines de signalisation de la voie MAPK ; ligne discontinue : indirectement par l'inhibition des MKP)

La voie du céramide est également une voie importante de réponse au stress. La génération de céramide induite par l'irradiation, comme nous avons pu le voir dans le paragraphe II-2-d induit des voies de signalisations pro-apoptotique, comme la voie p38. En effet, le céramide peut conduire à l'activation de la voie p38 (Kim et al., 2008), via possiblement l'inhibition de la TRX permettant l'activation de Ask1 (Chen et al., 2008). Cependant, ceci n'a pas encore été démontré dans les cellules endothéliales et le mécanisme d'activation de p38 par le céramide reste encore peu connu.

b- Rôle de p38 dans l'apoptose

De nombreuses études démontrent l'implication de p38 dans l'apoptose, où son rôle est dépendant du type cellulaire et du stimulus. En effet, l'inhibition de p38 protège les cellules endothéliales de l'apoptose induite par les LDL-oxydés (Yin et al., 2013). p38 a été impliqué, avec la PP2a, dans l'apoptose dépendante des caspases en favorisant l'augmentation du TNF α (Liu et al., 2013). Activée par le céramide, la voie p38 participe à l'apoptose dépendante de la voie mitochondriale (Chen et al., 2008). Il a été plus particulièrement démontré que p38 activée par le céramide participe à l'apoptose des cellules en favorisant la translocation de Bax à la mitochondrie (Kim et al., 2008). Il en va de même, en réponse à l'irradiation et aux UV (Choi et al., 2006; Van Laethem et al., 2004). En effet, l'inhibition de p38, par des inhibiteurs pharmacologiques ou par la surexpression d'une forme dominante négative, protège les cellules de l'apoptose radio-induite en diminuant la translocation de Bax à la mitochondrie, la libération du cytochrome c dans le cytosol et l'activation des caspases (Choi et al., 2006). Ceci démontre donc l'importance de p38 comme médiateur de la mort cellulaire dépendante de la voie mitochondriale. Il a également été démontré, via l'activation de la protéine Hsp27, que p38 participe au bourgeonnement de la membrane plasmique lors de l'apoptose induite par le stress oxydant (Huot et al., 1998). Ainsi, l'activation de p38 par divers stimuli participe, via par plusieurs mécanismes, à la mort des cellules par apoptose.

c- Rôle de p38 dans la sénescence

Comme décrit dans le paragraphe II, la sénescence est un processus également induit en réponse au stress. Il a déjà été mis en évidence un rôle de p38 dans l'induction de la sénescence répliquative et de la sénescence prématurée (Iwasa et al., 2003). En effet, indépendamment des dommages à l'ADN, p38 participe à l'induction de la sénescence

induite par l'irradiation en régulant l'expression de facteurs de croissance, d'IL et de chimiokines composant le SASP, via le facteur de transcription NF- κ B (Freund et al., 2011). De plus, il a été démontré que l'activation de p38 en réponse au stress oxydant, favorise l'accumulation de lamine B1, conduisant à l'altération de la structure de noyau et à la sénescence (Barascu et al., 2012). Depuis ces premières études du rôle de p38 dans la sénescence réalisées à partir de modèles cellulaires de fibroblastes (Barascu et al., 2012; Freund et al., 2011), il a aussi été démontré dans un modèle de cellules endothéliales primaires HUVEC soumises aux rayonnements ionisants que l'inhibition de l'activation de p38 par les ROS prévient la sénescence radio-induite (Marampon et al., 2015). Enfin, il a été démontré que des substrats de p38, comme MK2 (Alimbetov et al., 2015) et MNK1 (Shimada et al., 2009; Ziaei et al., 2012) participent à l'induction de la sénescence. L'inhibition de MK2 induit une diminution de la sécrétion d'IL-6, facteurs du SASP, par les cellules sénescents. La voie p38/NMK1 régule l'expression et la localisation subcellulaire de la ribonucléoprotéine hnRNP-A1 impliquée dans l'établissement du phénotype sénescents. Toutes ces études démontrent l'implication importante de la voie p38 dans l'induction de la sénescence qui permet d'empêcher la prolifération des cellules portant des dommages à l'ADN.

5- La spécificité de la voie p38

L'activation d'une voie de signalisation nécessite généralement l'intégration de plusieurs signaux activateurs pour permettre une réponse cellulaire appropriée et adaptée. Cependant, les différentes cascades de signalisation MAPK (p38, ERK et JNK) s'entrecroisent, formant un réseau complexe de signalisation. Plusieurs évidences démontrent une redondance des substrats entre les différentes voies MAPK (Cuadrado and Nebreda, 2010). C'est pourquoi, tout au long de la cascade de signalisation, les MAPKs forment des complexes qui facilitent leur activation, mais également renforcent leur spécificité, leur localisation et précisent leurs cibles (Whitmarsh, 2006).

C'est le cas de la voie p38 qui montre une certaine spécificité d'action apportée par les protéines d'échafaudage permettant la formation de complexes multi-protéiques, comme nous avons pu le voir dans le paragraphe IV-2-b. Ces complexes empêchent l'activation de la voie par des stimuli inappropriés et favorisent la transduction du signal en réponse à une activation appropriée (Schaeffer and Weber, 1999). La présence des *docking sites*, sites spécifiques qui permettent le recrutement de substrats, d'activateurs

et de régulateurs, augmentent également la spécificité et l'efficacité de la réponse (Biondi and Nebreda, 2003).

La régulation précise des voies de signalisation est donc cruciale afin que les cellules puissent répondre convenablement aux signaux de leur environnement. Dans notre cas, l'importance de la voie p38 dans la physiopathologie de l'endothélium supporte la nécessité de caractériser cette voie et de connaître ses partenaires protéiques dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant. Ainsi, l'identification des mécanismes par lesquels la spécificité et l'efficacité du signal sont maintenues peut permettre le développement de stratégies thérapeutiques avec une spécificité accrue et des traitements avec des effets secondaires réduits.

Il existe déjà de nombreux inhibiteurs de la voie p38 MAPK, qui pour la majorité inhibent son activité catalytique par le ciblage du domaine de liaison à l'ATP (Gum et al., 1998). Les premiers inhibiteurs ont été développés pour limiter la production de cytokines pro-inflammatoires induite par p38, afin de traiter les maladies inflammatoires (Coulthard et al., 2009). Cependant, ces inhibiteurs présentaient une importante toxicité hépatique (Adams et al., 1998). La découverte de la structure de p38 et de son mode de liaison au substrat a permis le développement de nouveaux inhibiteurs (Zhang et al., 2007b). Comme le LY2228820, inhibiteur sélectif de p38 permettant de limiter l'angiogénèse (Tate et al., 2013) et inhibant la formation d'osteoclastes dans un modèle de myélomes multiples (Ishitsuka et al., 2008). Cet inhibiteur est actuellement en phase 2 d'essai clinique dans le traitement du cancer de l'ovaire (<http://www.lillyoncologypipeline.com>). Cependant, des toxicités neurologique, gastrointestinale et cardiovasculaire pour ce type d'inhibiteur, ont été montrées lors d'essais cliniques (Noel et al., 2008), toxicité dues à la pleiotropie de p38. Afin de limiter cette toxicité et permettre une inhibition sélective, des inhibiteurs des cibles de p38 ont également été développés, comme l'inhibiteur CMPD1 empêchant la phosphorylation de MK2 par p38 (Davidson et al., 2004). Cependant, la spécificité et l'efficacité restent à démontrer. Ainsi donc, l'identification et la caractérisation des protéines complexées à p38 induisant la spécificité de la signalisation permettraient le développement d'inhibiteurs spécifiques.

V- La Nucléophosmine

1- Généralités

a- Structure

La famille des nucléophosmines (NPM) est composée de 3 isoformes, NPM1, NPM2 et NPM3 (Okuwaki, 2008). NPM1, également nommée B23, NO38 ou numatrine est l'isoforme majoritaire et la protéine la plus étudiée au sein de la famille des nucléophosmines du fait de sa forte expression ubiquitaire et de l'implication de ses mutations génétiques dans certains cancers (lymphomes, myélomes, leucémies) (Grisendi et al., 2006). Dans la suite de ce manuscrit, l'abréviation « NPM » fera référence à l'isoforme 1.

NPM est une protéine ubiquitaire majoritairement nucléolaire composée de plusieurs domaines (Figure 1-21). Son extrémité N terminale est très conservée et possède un domaine d'oligomérisation lui permettant de se lier à de nombreuses protéines par des interactions apolaires et conférant ainsi à NPM sa fonction chaperonne. En son centre, NPM est composée de domaines riches en acides aminés acides permettant sa liaison aux histones et impliqués dans son activité ribonucléase. Enfin, l'extrémité C terminale est composée d'un domaine de liaison aux acides nucléiques. NPM possède également une séquence d'exportation nucléaire (NES), des séquences de localisation nucléaire (NLS) et une séquence de localisation nucléolaire (NuLS) (Okuwaki, 2008).

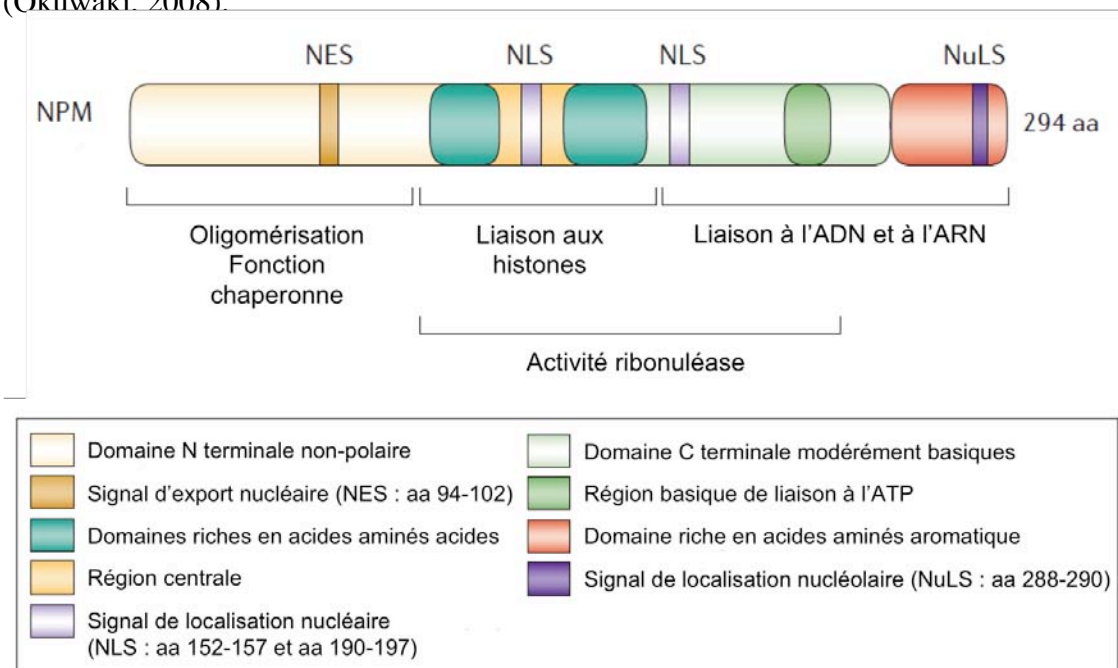


Figure 1-21 : La structure en multi-domaines de la nucléophosmine (NPM)
(Grisendi et al., 2006)

b- Régulation

La régulation de NPM s'effectue essentiellement par des modifications post-traductionnelles (poly-ADP-ribosylation, acétylation, sumoylation, ubiquitination et phosphorylation) ainsi que par son interaction avec de nombreuses protéines (Lim and Wang, 2006; Okuwaki, 2008).

- La phosphorylation

NPM possède de nombreux sites de phosphorylation qui régulent ses fonctions, mais également sa localisation. Elle peut être phosphorylée par de nombreuses kinases, telles que CKII (*Casein kinase II*), Plk1 (*Polo-like kinase 1*), NekA2 (*Nuclear kinase A2*), Cdc2 (*Cell division control 2*) et CDK2 (Lim and Wang, 2006) (Figure 1-22).

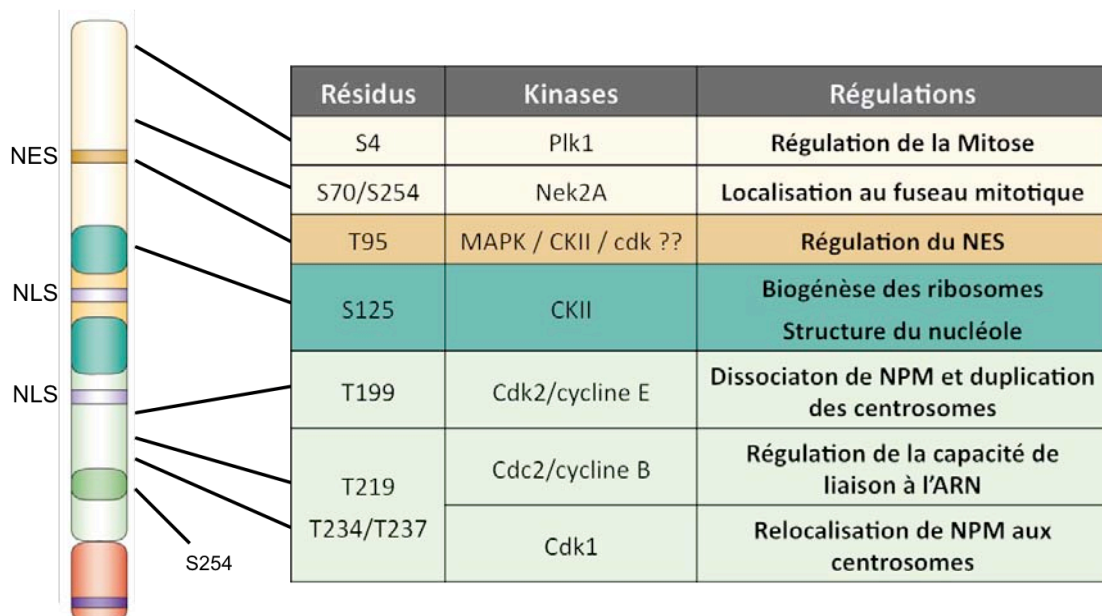


Figure 1-22 : Les principaux résidus phosphorylés et leurs kinases potentielles, impliquées dans la régulation de NPM

La CKII est principalement impliquée dans la phosphorylation de la serine 125 (S125), dont la mutation par une alanine induit la fragmentation du nucléole. La phosphorylation de la S125 favorise la biogénèse des ribosomes via la régulation de sa capacité de liaison à l'ARN (Okuwaki, 2008). La S125 peut également être phosphorylée par les protéines Aurora A et B nécessaires pour le bon déroulement de la mitose (Shandilya et al., 2014). La Plk1 par son interaction directe avec NPM, permet la

phosphorylation de la sérine 4 impliquée dans la mitose. En effet, la mutation de la sérine 4 par une alanine induit de multiples défauts de la mitose (Zhang et al., 2004). Les sérines 70 et 254 sont potentiellement phosphorylées par la Nek2A pouvant s'associer directement à la NPM favorisant sa localisation au niveau du fuseau mitotique et au centrosome durant les phases du cycle (Okuwaki, 2008; Yao et al., 2004). L'association de la Cdc2 à la cycline B participe à la phosphorylation des résidus thréonines 199, 219, 234 et 237, altérant la capacité de NPM à se lier à l'ARN, et favorisant le désassemblage du nucléole (Okuwaki, 2008). La CDK2/cycline E est également impliquée dans la phosphorylation de ces 4 résidus thréonines (T199, T219, T234 et T237) durant la mitose (Okuwaki, 2008). C'est la kinase principale du résidu T199, régulant son rôle dans la duplication des centrosomes (Okuda et al., 2000; Tokuyama et al., 2001). Enfin, les résidus thréonines 199, 234 et 237 peuvent également être phosphorylés par la CDK1, ces phosphorylations étant impliquées dans la réassociation de NPM aux centrosomes et la relocalisation de NPM en dehors du nucléole (Lim and Wang, 2006; Negi and Olson, 2006).

NPM possède de nombreux autres résidus phosphorylables, comme la thréonine 95 localisée au niveau du NES, dont la phosphorylation est impliquée dans la régulation de la localisation de NPM (Okuwaki, 2008). Cependant sa kinase n'a pas encore été identifiée. Une étude *in-silico*, a pu mettre en évidence des kinases potentielles pour ce résidu, comme la CKII, les CDK1, 2 et 5 ainsi que les MAPKs ERK2 et p38 (Ramos-Echazábal et al., 2012). Cette étude prédictive a également permis d'identifier de nombreuses autres kinases pouvant phosphoryler NPM, comme ATM, PKC, PKA, Akt.

Selon le type et le nombre de résidus phosphorylés, mais également selon leur association, NPM aura une localisation et des fonctions différentes, démontrant l'importance et les enjeux de la phosphorylation de NPM dans sa régulation.

- **Interactions protéiques**

NPM peut interagir avec de nombreuses protéines via sa fonction chaperonne en N terminale, régulant ainsi la fonction et la localisation de NPM. En effet, NPM peut former des homo- et hétéro-oligomères avec les différents membres de la famille NPM. L'interaction de NPM avec les autres membres régule sa capacité à se lier à l'ARN (Okuwaki, 2008), ainsi que son activité chaperonne (Prinos et al., 2011). Il est également important de noter que des inhibiteurs de l'oligomérisation de NPM sont

étudiés comme potentiels agents anti-tumoraux. En effet, en inhibant l'oligomérisation de NPM, l'inhibiteur NSC348884 induit une augmentation de p53, l'apoptose et une sensibilisation des cellules cancéreuses à la doxorubicine (Qi et al., 2008).

NPM interagit également avec les kinases qui vont induire sa phosphorylation ainsi qu'avec de nombreuses autres protéines pouvant réguler sa localisation et ses fonctions, comme la protéine Arf (Okuwaki, 2008). En effet, il a été démontré que NPM interagit avec la protéine Arf, altérant la biogénèse des ribosomes (Bertwistle et al., 2004). La mutation de NPM, au niveau de son site d'interaction avec Arf, induit une augmentation de son ubiquitination et de sa dégradation par le protéasome (Enomoto et al., 2006). Enfin, la séquence NES de NPM est régulée par son interaction avec des protéines, comme la protéine d'export nucléaire CRM1 (*Chromosome region maintenance 1*), ainsi que par des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation de la T95, régulant ainsi la localisation sub-cellulaire de NPM (Okuwaki, 2008).

2- Fonctions de NPM

De par sa structure en multi-domaines, NPM est une protéine multifonctionnelle, impliquée dans diverses fonctions cellulaires : la prolifération, la croissance, l'apoptose et la sénescence (Grisendi et al., 2006). NPM est également une protéine essentielle dans le développement embryonnaire et la stabilité génomique, l'invalidation du gène *npm* conduisant à la létalité embryonnaire (Grisendi et al., 2005). De par la présence de séquences NES et NLS lui permettant de transiter entre le noyau et le cytosol, NPM a d'importantes fonctions cytoplasmiques.

a- Fonctions nucléaires

Principalement localisée au noyau, au niveau des nucléoles, les fonctions de NPM les plus décrites sont des fonctions nucléaires. Elle participe à la régulation de la traduction, la régulation de la transcription, au contrôle du cycle cellulaire ainsi qu'au maintien de l'intégrité du génome (Lindström, 2011).

- Régulation de la transcription

NPM régule la transcription des gènes, en régulant l'assemblage et le désassemblage de la chromatine grâce à sa liaison à l'histone H1 (Gadad et al., 2011) et

aux histones H3, H2B et H4 présents au niveau des nucléosomes (Swaminathan et al., 2005). NPM régule également des facteurs de transcription comme STAT3 (Ren et al., 2014), ATF-5 (Liu et al., 2012), c-Myc (Li and Hann, 2013), E2F1 (Lin et al., 2006), ou encore NF- κ B (Dhar et al., 2004) et p53 (Colombo et al., 2002).

- **Régulation de la traduction**

NPM participe à la biogénèse des ribosomes, ainsi qu'à la synthèse et la stabilité des ARNm. En effet, NPM associée aux ARN pré-ribosomiaux facilite le clivage des ARNr et leur maturation. Elle permet également leur transit du noyau au cytoplasme. L'inactivation de NPM inhibe l'exportation des sous-unités ribosomiales conduisant à une diminution de la croissance cellulaire (Lindström, 2011; Okuwaki, 2008).

- **Maintien de l'intégrité du génome via la réparation des dommages à l'ADN**

NPM favorise le maintien de l'intégrité du génome en participant à la réparation des dommages à l'ADN (Lindström, 2011). En effet, des embryons invalidés pour NPM présentent une augmentation des marqueurs de dommages à l'ADN (γ -H2AX et ATM) (Colombo et al., 2005). Il a été démontré que NPM participe à la réparation de différents types de dommages à l'ADN. L'inactivation de NPM diminue la capacité de réparation par la BER. NPM est impliquée dans le contrôle du niveau d'expression et la localisation nucléaire de différentes protéines de réparation impliquée dans la BER (Poletto et al., 2014). NPM facilite également la NER. En réponse aux UV, elle favorise l'expression de la PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) co-facteur de l'ADN polymérase (Wu et al., 2002) et du facteur de transcription E2F1 impliqué dans la NER (Guo et al., 2010; Lin et al., 2010). De plus, NPM est également impliquée dans la réparation des cassures double brin. En réponse à l'irradiation, NPM est détectée au niveau des foyers de réparation. La mutation de la T199 de NPM en alanine induit la persistance des foyers Rad51 et BRCA1 impliqués dans la HR (Koike et al., 2010). Il a également été démontré que l'inhibition du recrutement de NPM au niveau des foyers de réparation, inhibe la réparation des dommages à l'ADN induits par l'irradiation (Sekhar et al., 2011).

b- Fonctions cytoplasmiques

NPM est une protéine qui transite rapidement entre le noyau et le cytoplasme grâce à sa séquence NES permettant son exportation nucléaire via le récepteur CRM1 (Okuwaki, 2008). NPM participe au transport des sous-unités pré-ribosomales du noyau vers le cytoplasme (Okuwaki et al., 2002). Via sa fonction chaperonne, NPM limite l'aggrégation de protéines, protège les enzymes de la dénaturation et favorise la renaturation des protéines (Szebeni and Olson, 1999). Elle participe également à la régulation du cycle cellulaire, principalement via la régulation de la duplication des centrosomes (Ma et al., 2006; Wang et al., 2005). Quelques études ont aussi montré son implication dans certaines voies de signalisation, telles que les voies MAPK (Inder et al., 2009; Loubeau et al., 2014).

- Régulation du cycle cellulaire via la duplication des centrosomes

Au niveau du cytoplasme, NPM est principalement impliquée dans la duplication des centrosomes, essentielle pour le bon déroulement du cycle cellulaire et le maintien de l'intégrité du génome (Okuda et al., 2000). En effet, la phosphorylation de NPM sur la T199 par la CDK2/cycline E permet sa dissociation des centrosomes nécessaire pour leur duplication. L'expression du mutant non-phosphorylable de NPM bloque cette duplication (Okuda et al., 2000; Tokuyama et al., 2001). Inversement, la phosphorylation de NPM sur les thréonines 234 et 237 par la CDK1/cycline B, favorise sa réassociation aux centrosomes (Lim and Wang, 2006). D'autres évidences démontrent l'implication de NPM dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, l'invalidation de NPM favorise un arrêt du cycle en phase S (Wang et al., 2011). De plus, la surexpression d'une forme mutée de NPM conduisant à une expression cytosolique de NPM (NPMc) favorise sa phosphorylation sur T199 et influence la progression du cycle cellulaire (Chan and Meng Lim, 2015). Enfin, NPM peut également interagir avec des protéines impliquées dans le cycle cellulaire régulant leurs fonctions, comme pour la kinase CDK1 et la phosphatase Cdc25C (Du et al., 2010), ou encore la kinase Aurora A (Reboutier et al., 2012).

- Rôle dans des voies de signalisation

L'implication de NPM dans les voies de signalisation existe mais reste encore peu caractérisée. En effet, il a été démontré que NPM régule négativement la voie de signalisation de la chimiokine CXCL12, via son interaction avec le récepteur couplé aux

protéines G CXCR4 (Zhang et al., 2007c). NPM est également impliquée dans la régulation des voies MAPK. La NPM cytoplasmique régule la voie de signalisation Ras/Raf/MAPK en facilitant la *clusterisation* de la forme active de la protéine Ras à la membrane plasmique, favorisant ainsi la transduction du signal (Inder et al., 2009). Dans des cellules de cancers de prostate, l'activation de la voie de signalisation MEKK/ERK en réponse aux récepteurs à l'EGF est également dépendante de NPM, possiblement via la régulation de Ras (Loubeau et al., 2014). De plus, il a également été démontré que NPM est un régulateur négatif de Rac1, petite protéine GTPase de la famille Rho impliquée dans l'activation des voies MAPK (Zoughlami et al., 2013).

NPM est donc impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires déterminantes pour le devenir de la cellule. La translocation et la localisation subcellulaire de NPM joue également un rôle crucial dans l'homéostasie cellulaire. En effet, la mutation de NPM conduisant à une expression cytoplasmique aberrante de NPM est retrouvée chez 1/3 des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (Falini et al., 2005). La fusion du domaine d'oligomérisation N terminale de NPM avec le domaine catalytique de la protéine ALK (*Anaplastic lymphoma kinase*) est impliquée dans les lymphomes (Bischof et al., 1997; Morris et al., 1995). De plus, NPM est également surexprimée dans de nombreux cancers (cancers gastriques, du colon, de la prostate, des ovaires) (Grisendi et al., 2006).

3- Rôle de NPM dans la cellule endothéliale

Très peu d'études portent sur la caractérisation des fonctions de NPM dans le compartiment endothélial. Il a été observé une augmentation d'expression et une déphosphorylation de NPM dans les cellules endothéliales traitées avec des LDL-oxydés (Kinumi et al., 2005). Il a également été démontré dans des cellules endothéliales que NPM participe à la régulation et à l'activation du facteur de transcription NF- κ B, impliqué dans l'inflammation et la dysfonction endothéliale (Csiszar et al., 2008). Plus récemment, il a été mis en évidence que le traitement des cellules endothéliales avec de l'acide salvonique B, molécule cardioprotectrice, induit une augmentation de la phosphorylation de NPM (Chang et al., 2011). Enfin, il a été montré que le complexe NPM/Arf régule l'expression du VEGFA, facteur de croissance spécifique des cellules endothéliales (Kawagishi et al., 2010).

4- NPM impliquée dans la réponse au stress

NPM est une protéine régulée au niveau de son expression et de sa phosphorylation par le stress oxydant tel que celui induit par les rayonnements ionisants (Ramsamooj et al., 1995), les UV (Wu and Yung, 2002), les LDL-oxydés (Kinumi et al., 2005), ou encore par le H₂O₂ (Paron et al., 2004). En condition de stress oxydant, les principales fonctions de NPM identifiées sont son implication dans la réparation des dommages à l'ADN (Lindström, 2011), dans l'apoptose, ainsi que dans la sénescence (Li et al., 2007).

a- L'apoptose

- *via les dommages à l'ADN* : Plusieurs études s'accordent sur le fait que NPM protège les cellules de l'apoptose induite par le stress oxydant, principalement en favorisant la réparation des dommages à l'ADN. En effet, l'augmentation d'expression de NPM induite en réponse aux UV favorise la réparation des dommages à l'ADN (Wu et al., 2002) via la régulation de p53 (Mauguel et al., 2004). De même en réponse à l'hypoxie, NPM inhibe l'activité de p53 et favorise la survie cellulaire (Li et al., 2004). Ces résultats ont également été démontrés dans des embryons de souris invalidés pour la NPM, où la diminution de NPM conduit à une accumulation des dommages à l'ADN et à une activation de p53, favorisant l'apoptose (Colombo et al., 2005). Enfin, l'invalidation de NPM sensibilise les cellules normales mais également les cellules cancéreuses hématopoïétiques à l'apoptose induite par les UV, par l'irradiation, par traitement au H₂O₂ ou à l'étoposide (Li et al., 2005). Du fait de cette implication de NPM dans l'apoptose dépendante des dommages, de nouvelles stratégies anti-tumorales se développent avec le ciblage de NPM. Des inhibiteurs de l'oligomérisation de NPM induisent une augmentation de l'activation de p53 et favorise l'apoptose (Qi et al., 2008), et induisent également une radio-sensibilisation des cellules via l'inhibition de la réparation des dommages à l'ADN (Sekhar et al., 2014). Il est également important de noter que le statut de phosphorylation de NPM sur T199 semble être impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN. Il a pu être démontré que la forme phosphorylée sur T199 participe aux voies de réparation, principalement par le recrutement des protéines de réparation au site de dommage, et que la forme déphosphorylée sur T199 inhibe cette réparation (Koike et al., 2010; Sekhar et al., 2011).

- *via la voie mitochondriale* : L'implication de NPM dans l'apoptose ne se résume pas seulement à son rôle dans la régulation des dommages à l'ADN. En effet, il a également été démontré que NPM peut favoriser l'apoptose via la voie mitochondriale. La relocalisation de NPM au cytoplasme est impliquée dans le processus d'apoptose dépendant de la protéine Bax (Kerr et al., 2007; Khandelwal et al., 2011; Wang et al., 2013). En effet, NPM interagit avec Bax (Thompson et al., 2008) au niveau du cytosol et favorise la translocation de Bax à la mitochondrie induisant un relargage du cytochrome c et l'activation des caspases conduisant à l'apoptose des cellules (Kerr et al., 2007; Wang et al., 2013).

b- La sénescence

La sénescence induite en réponse au stress oxydant implique également la protéine NPM. La surexpression de NPM dans des fibroblastes murins protège de la sénescence induite par l'activation d'oncogène, comme c-Myc et Ras (Li et al., 2007). La protéine Arf permet la stabilisation de p53 et l'expression de p21 conduisant à la sénescence. NPM via son interaction avec Arf, inhibe la stabilisation de p53 et par conséquent la sénescence des cellules. L'interaction Arf/NPM peut être inhibée par la phosphorylation de NPM sur la sérine 48 via la voie de signalisation PI3K/Akt (Hamilton et al., 2014). Cependant, le rôle de NPM dans la sénescence prématurée reste encore peu documenté.

En résumé, NPM est une protéine extrêmement régulée par sa phosphorylation, ses protéines partenaires, mais également par sa localisation cellulaire qui vont définir ses fonctions. Toutes dérégulations, mutations ou surexpression de NPM impactent de nombreux processus cellulaires. Elle est impliquée dans d'importantes fonctions cellulaires, comme la réparation des dommages à l'ADN. Elle est également impliquée dans la régulation d'importantes voies de signalisation, comme les voies MAPK. De par sa fonction chaperonne, elle se lie à de nombreuses protéines et régule leurs fonctions. De plus, NPM tout comme p38 est une protéine régulée par le stress oxydant et participe à la réponse de la cellule. NPM est donc une protéine clé de la réponse cellulaire.

Partie 2 : Problématiques et objectifs

Le compartiment endothélial est une cible majeure du stress oxydant, notamment dans le cadre d'une exposition aux rayonnements ionisants. Les cellules endothéliales soumises à ce type de stress subissent de nombreuses modifications morphologiques et fonctionnelles conduisant à d'importantes dysfonctions endothéliales dont la mort par apoptose. Il est désormais bien établi que ces dysfonctions participent aux effets toxiques des radiations sur les tissus sains, mettant ainsi l'endothélium au cœur de la problématique de la radioprotection.

Dans le contexte de l'apoptose endothéliale radio-induite, les voies de signalisation impliquées commencent à être caractérisées. La voie de l'ASMase conduisant à la génération du sphingolipide céramide mais aussi la voie de la protéine kinase p38 ont été identifiées comme impliquées dans la signalisation intracellulaire de la réponse pro-apoptique radio-induite des cellules endothéliales.

p38 est connue pour être impliquée dans de nombreuses voies de signalisation régulant d'importantes fonctions cellulaires liées au stress et plus particulièrement dans les cellules endothéliales. Cependant, au vu de la complexité de la voie p38 et dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant radio-induit, il est essentiel de caractériser précisément cette voie de signalisation p38.

Dans ce contexte, nous avons identifié une nouvelle protéine associée à p38 dans les cellules endothéliales : la nucléophosmine (NPM). Jusqu'à aujourd'hui, cette protéine principalement nucléaire n'avait jamais été décrite comme protéine partenaire de p38 dans aucun contexte cellulaire. **Nous avons donc émis l'hypothèse que NPM en s'associant à la protéine p38 puisse avoir un rôle important dans la réponse de l'endothélium au stress oxydant aigu.**

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons poursuivi les objectifs suivants :

- 1) Caractériser l'interaction NPM/p38 et étudier l'implication de NPM dans la voie p38.
- 2) Préciser le rôle de NPM dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant, plus particulièrement au niveau des dommages à l'ADN.
- 3) Déterminer le rôle de l'interaction NPM/p38 dans la signalisation dépendante du céramide dans les cellules endothéliales suite à un stress oxydant aigu.

Ce travail permettra de comprendre le rôle de NPM dans la voie de signalisation p38 dans les cellules endothéliales et de mettre en évidence le rôle de NPM dans les fonctions endothéliales modulées par le stress oxydant, tel que celui induit par l'irradiation. De plus, il pourrait permettre d'identifier une nouvelle molécule de la signalisation endothéliale, potentiellement utilisable comme cible thérapeutique pour protéger l'endothélium et ainsi limiter la radio-toxicité des tissus sains.

Partie 3 : Article

La dissociation du complexe p38/NPM/PP2a induite par le stress oxydant conduit à la modulation la signalisation des dommages à l'ADN par NPM.

I- Avant-propos

Cet article a été soumis le 10 décembre 2015 au journal FASEB et actuellement en révision. Le projet de recherche qui a conduit à cet article a été élaboré et dirigé par le Dr Isabelle Corre, le Dr Jacques Huot et le Dr François Paris. J'ai effectué ou participé à l'ensemble des expériences présentées dans les figures et les figures supplémentaires. J'ai travaillé en collaboration avec le Dr Isabelle Corre, le Dr Jacques Huot et la plateforme de protéomique de l'institut de recherche en Immunologie et en Cancérologie de Montréal, pour les figures 3-1A ; avec Elise Bénéteau pour les figures 3-2B, 3-3C et S3-2, avec le Dr Isabelle Corre pour les figures 3-2C et 3-3A, et avec Hala Estephan pour la figure 3-7B. J'ai réalisé les autres figures. J'ai également contribué à l'écriture de l'article, à la réalisation du montage des figures et des figures supplémentaires, et participé aux remaniements et aux corrections de l'article, sous la direction du Dr Isabelle Corre, du Dr Jacques Huot et du Dr François Paris.

II- Résumé

Le stress oxydant est une des principales causes de la dysfonction endothéliale. La voie p38 MAPK joue un rôle déterminant en permettant aux cellules de répondre au stress oxydant qui est étroitement régulée par des interactions entre la protéine p38 et ses protéines partenaires. Par une approche protéomique, nous avons identifié la nucléophosmine (NPM) comme nouveau partenaire de p38 dans les cellules endothéliales humaine de veine. Les co-immunoprécipitations et les analyses microscopiques confirment l'existence d'une interaction cytosolique NPM/p38 à un état basal. Le stress oxydant généré par une courte exposition à 500 μ M de peroxyde d'hydrogène, induit une déphosphorylation rapide de NPM sur T199 qui dépend de la phosphatase PP2a, un autre partenaire du complexe NPM/p38. Le blocage de l'activité de PP2a conduit à l'accumulation de NPM-pT199 et à une association accrue de NPM avec p38. Concomitant à la déphosphorylation de NPM, le stress oxydant favorise la translocation de cette protéine vers le noyau pour moduler la réponse aux dommages de l'ADN (DDR). Notamment, NPM phosphorylée altère la phosphorylation de la protéine senseur des cassures double brin (DSB) de l'ADN, la protéine kinase DNA-PK et la formation ultérieure des foyers γ -H2AX. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le complexe p38/NPM/PP2a joue le rôle de capteur dynamique permettant aux cellules endothéliales de réagir rapidement au stress oxydant aigu et massif.

Mots clés : espèces réactive de l'oxygène / nucléophosmine / p38 MAPK / dysfonction endothéliale / cassures double brin de l'ADN

III- Contexte et enjeux

Les cellules endothéliales sont une cible majeure du stress oxydant (Lum and Roebuck, 2001). Les rayonnements ionisants utilisée en radiothérapie sont une source importante de stress oxydant, du à la radiolyse des molécules d'eau produisant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Azzam et al., 2012). L'exposition des cellules endothéliales à un tel stress oxydant va induire l'activation de nombreuses voies de signalisation et engendrer de nombreuses modifications morphologiques et fonctionnelles (Alom-Ruiz et al., 2008; Houle and Huot, 2006), qui vont induire des dysfonctions de l'endothélium participant aux dommages tissulaires radio-induits (Garcia-Barros et al., 2003; Milliat et al., 2008).

La voie de réponse au stress majoritairement décrite est la voie p38 MAPK (p38). Les protéines p38 appartiennent à la famille des serine/thréonine kinases activées par le stress, les SAPK (*Stress activated protein kinase*). Elles sont connues pour être impliquées dans de nombreuses voies de signalisation régulant un grand nombre de fonctions cellulaires liées au stress (Cuadrado and Nebreda, 2010; Dent et al., 2003) et particulièrement dans les cellules endothéliales (Houle and Huot, 2006). Elles peuvent être activée par les ROS (Son et al., 2013). Cependant, la voie d'activation de p38, est une voie très complexe, mettant en jeu de nombreux partenaires et de nombreuses cibles, pouvant induire de multiples signaux et variant d'un type cellulaire à l'autre, expliquant l'importante diversité des fonctions régulées par cette voie de signalisation (Trempelec et al., 2013). Il apparaît donc nécessaire, afin de comprendre la réponse des cellules endothéliales à un stress oxydant aigu, tel que celui induit par l'irradiation, de caractériser précisément les acteurs moléculaires de cette voie p38.

L'objectif de cette étude est donc de comprendre la signalisation induite dans les cellules endothéliales en réponse au stress oxydant, et de comprendre plus particulièrement la voie majeure de réponse au stress, la voie p38. Nous avons identifié un nouveau partenaire de p38, la nucléophosmine (NPM), protéine également impliquée dans la réponse au stress oxydant (Grisendi et al., 2006), mais très peu décrite dans les cellules endothéliales et inconnue comme partenaire de p38. La compréhension du rôle et de l'implication de ce nouveau partenaire dans la signalétique p38 nous permettra de mieux comprendre la réponse de la cellule endothéliale au stress oxydant.

IV- Article

Oxidative stress disassembles the p38 /NPM/PP2a complex leading to the modulation of NPM-mediated signaling to DNA damage response

Maëva Guillonnet¹⁻⁴, François Paris¹⁻³, Hala Estephan¹⁻³, Elise Bénéteau¹⁻³, Jacques Huot⁴ and Isabelle Corre^{1-4*}.

¹CNRS, UMR 6299, Nantes, F-44000, France

²Inserm, UMR892, Nantes, F-44000, France

³Université de Nantes, Nantes, F-44000, France

⁴Le Centre de Recherche du CHU de Québec-Université Laval et le Centre de Recherche sur le Cancer de l'Université Laval, Québec, Canada

* Corresponding Author: I. Corre, CRCNA, Inserm U892/CNRS 6299,

IRS-UN, 8 Quai Moncousu, Nantes, F-44007, France

Tel: +33 2 28 08 02 08 Fax +33 2 28 08 02 04

Email: isabelle.corre@inserm.fr

Running Title: NPM and endothelial response to oxidative stress

ABBREVIATIONS LIST

a.u. : arbitrary unit

ctl : control

DDR: DNA Damage Response

DNA-PKcs: DNA-dependent protein kinase catalytic subunit

DSBs: Double-strand Breaks

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cell

IP: Immunoprecipitation

Mb/Cyto: Membrane/Cytosol

NPM: Nucleophosmin

OA: Okadaic acid

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

p38: p38 α

ROS: Reactive Oxygen Species

SD: Standard deviation

SEM: Standard error of the mean

TTM: Tautomycin

TCL: Total cell lysate

ABSTRACT

Oxidative stress is a leading cause of endothelial dysfunction. The p38 MAPK pathway plays a determinant rôle in allowing cells to cope with oxidative stress and is tightly regulated by a balanced interaction between the p38 protein and its interacting partners. By a proteomic approach, we identified nucleophosmin (NPM) as a new partner of p38 in human vein endothelial cells. Co-immunoprecipitation and microscopic analyses confirm the existence of a cytosolic NPM/p38 interaction in basal condition. Oxidative stress, generated by a short exposure to 500 μ M of hydrogen peroxide, induces a rapid dephosphorylation of NPM at T199 that depends on phosphatase PP2a, another partner of the NPM/p38 complex. Blocking PP2a activity leads to accumulation of NPM-pT199 and to an increased association of NPM with p38. Concomitantly to NPM dephosphorylation, oxidative stress promotes the translocation of this protein to the nucleus to modulate the DNA damage response (DDR). Notably, dephosphorylated NPM impairs the phosphorylation of DNA double-strand breaks (DSBs)-sensing protein DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) and subsequent formation of γ -H2AX foci. Overall, these results suggest that the p38/NPM/PP2a complex acts as a dynamic sensor allowing endothelial cells to react rapidly to acute and massive oxidative stress.

Key words: reactive oxygen species/nucleophosmin / p38 MAPK / endothelial dysfunction / double strand breaks DNA

INTRODUCTION

Endothelial cells are heavily exposed to Reactive Oxygen Species (ROS), generated either from endogenous (oxidative enzymes, mitochondria) or exogenous sources (inflammatory cytokines, xenobiotic, ionizing radiation) (1). ROS profoundly affect the functions of endothelial cells (2), notably by inducing many morphological and functional changes: major cytoskeleton reorganization (3) and increased permeability (4), up-regulation of adhesion molecules (5, 6), modulation of angiogenesis (7), genomic instability through DNA damage (8) and cell death (9, 10). Alterations of these endothelial functions link oxidative stress to severe cardiovascular pathologies like atherosclerosis (11, 12) hypertension (13) and diabetes (14) but also to early and late toxicity to normal tissue induced by ionizing radiation (15).

Understanding the molecular mechanism that underlies endothelial dysfunction in response to oxidative stress remains an important issue. A major oxidative stress-induced signaling pathway involves members of the p38 MAPK cascade (16). p38 MAPK are serine/threonine kinases of the stress activated protein kinase (SAPK) family, alongside with c-Jun N-terminal kinase (JNK). The p38 family contains four isoforms ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) that are expressed in function of cell types and are activated in response to a large number of chemical, biological and physical stresses (17). p38 α is the most widely expressed and studied member of the family and is referred here as p38 (p38) (18). p38 activation leads to the subsequent phosphorylation and activation of diverse cytoplasmic and nuclear targets that are involved in a broad range of cellular functions like proliferation, differentiation, migration and survival (17). Notably, activation of p38 in response to oxidative stress in endothelial cells induces a quick and massive reorganization of the actin cytoskeleton into stress fibers that results from MAPKAP kinase 2 (MK2) activation and phosphorylation of Hsp27 (3). A role for p38 has also been described in ionizing radiation-induced apoptosis of endothelial cells (19). Yet, except for p38 activators or substrates such as MKK3/MKK6 or MK2 respectively, little is known on other partners that are required to associate with p38 in order to transduce the oxidative stress response.

The stress response is also known to involve the protein nucleophosmin/B23 (NPM), a multifunctional ribonucleoprotein acting in several cellular functions including

ribosome biogenesis, cell apoptosis, proliferation and genomic stability (20). NPM contains many serine/threonine putative sites of phosphorylation (21) ascribed to modulate specific NPM functions (22). In particular, phosphorylation of Threonine 199 is important for NPM's function in centrosome duplication (22) and in pre-ribosomal RNA processing (23). Interestingly, treatments inducing oxidative stress such as UV, ionizing radiation, H₂O₂ or oxidized LDL (24-27) regulate the expression and phosphorylation status of NPM in several types of cells. Yet, the functions of NPM and its phosphorylated forms are poorly described in the endothelial compartment, except that it participates to the regulation of transcription factors in response to TNF α (28), its expression is increased after treatment with oxidized LDL (27) and its phosphorylation is induced in cells treated with salvianolic acid B, a cardioprotective molecule (29).

Despite the fact that p38 and NPM are oxidative stress-response proteins, no study has shown a direct relationship between the two proteins. We report here an interaction between p38 and NPM in endothelial cells. This interaction is regulated by oxidative stress that induces its rapid dissociation, through PP2A-mediated dephosphorylation of NPM at T199. In turn, this favors NPM translocation into the nucleus where it impairs DNA Damage Response (DDR) signaling and contributes to endothelial dysfunction in response to oxidative stress.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and treatments

Primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) were purchased from Lonza (Basel, Switzerland) and grown in supplier's medium (EBM-2, 5% fetal bovine serum and microvascular endothelial supplements/growth factors) at 37°C in a 5% CO₂ humidified air incubator. HUVECs were used from passage 2 to 5. Before treatments, cells were 0,1% serum-starved for 4 hours.

Cells were exposed to 500 µM hydrogen peroxide H₂O₂ (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) for various periods of time. When indicated, cells were pretreated with 400 nM p38 MAPK inhibitor LY2228820 (Sigma-Aldrich) for 1 hour, or with phosphatase inhibitors okadaic acid (OA) (Merck Millipore, Nottingham, United Kingdom) or tautomycin (TTM) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) for 30 minutes.

Antibodies

Anti-human nucleophosmin and mouse IgG1 isotype control were from Invitrogen™ (Life Technologies, St Aubin, France). Anti-phospho-NPM (Thr199), anti-p38 MAPK, anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), anti-GAPDH, anti-Hsp27, anti-phospho-Hsp27 (Ser82), anti-PP2A, anti-PP1 α and anti-phospho H2AX (Ser139) were from Cell Signaling Technology® (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). For immunoprecipitation assays, anti-p38 #474 (30) was used. Anti-human vinculin (Clone hVIN-1) and anti-Flag (Clone M2) were from Sigma-Aldrich, anti- α tubulin and anti-Lamin A/C and anti-PP1 β from Santa Cruz Biotechnology®. Anti-phospho DNAPK (Ser2056) and anti-MEK3 were from Abcam (Cambridge, United Kingdom). Anti-GM130 and Alexa Fluor 488 anti-CD31 from BD Pharmingen™ (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, Beckman Coulter, Villepinte, France) was used as control. Alexa Fluor 568 anti-Rabbit IgG (H+L) from Invitrogen and Alexa Fluor 488 anti-Mouse IgG (Fab2) from Cell Signaling Technology® were used as secondary antibodies.

Cell fractionation

Cells were collected by scraping in cold hypotonic sucrose buffer (250 mM sucrose, 10 mM Tris pH 7.4, 2 mM MgCl₂ containing 25 mM leupeptin), and incubated on ice for

15 minutes. After disrupting cellular membranes by Dounce homogenizer, nuclei were pelleted by centrifugation at 450 g for 20 minutes at 4°C. The remaining supernatant containing cytoplasmic and membrane fractions was solubilized by adding a mixing buffer containing: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 0,1% sodium deoxycholate, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 µM Leupeptin, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 1 mM PMSF. Insoluble materials were removed by centrifugation at 10 000 g for 10 minutes at 4°C. Nuclear proteins were extracted from nuclei pellet washed three times in sucrose Buffer, dissolved in mixing buffer, vortexed, sonicated and centrifuged at 9 700 g 30 minutes at 4°C.

DNA constructs and protein purification

pcDNA3 vector, pcDNA3-NPMT199A-Flag and pcDNA3-NPMT199D-Flag plasmids (23) were prepared with Qiagen® EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

pGEx-NPM (31) and pGEx-ATF2 (32) were used for BL21 bacteria's transformation. Protein production was induced by 1 mM IPTG for 3 hours. Bacteria were pelleted, frozen at -80°C. Purification of GST-tagged proteins (NPM and ATF2) were then obtained by sonication and lysis of bacterial pellet, and loading on glutathione Sepharose 4B (GE-Healthcare, Sigma-Aldrich) in accordance with the manufacturer's instructions.

Transfection

Transfection was performed using X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions. Cells were transfected with vector, NPMT199A-Flag or NPMT199D-Flag constructs.

RNA interference

Invalidation of NPM, PP2A and PP1 proteins was achieved using 5 nM Dharmacon ON-TARGET plus siRNA SMART pools containing 4 different siRNA (Dharmacon, ThermoScientific, St Leon-Rot, Germany) directed against human NPM1, PP2CA, PP2CB, PP1C α or PP1C β . RNAi controls were performed with a pool of four non-targeting sequences. Transfection of siRNA was performed in HUVECs 36 hours before experiments using DharmaFECT®4 according to the manufacturer's instructions.

Western Blot

After denaturation, equal amount of protein samples were subjected to SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene difluoride PVDF Immobilon-P membranes (Millipore, St Quentin en Yvelines, France). Antibody probing was performed and proteins were visualized using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection (BioRad, Marne la Coquette, France) by imager Fusion X7 (Vilbert Loumart, Collegien, France) or by autoradiography through exposure to X-ray films. Signal quantification was made with Bio1D software (Vilbert Loumart).

Co-Immunoprecipitation Assays

Equal quantity of protein were mixed with protein A/G Sepharose (GE-Healthcare) at 4°C for pre-clearing and incubated overnight at 4°C with the appropriate antibody. Complexes were incubated with protein A/G Sepharose beads for 30 minutes at 4°C, beads were washed with Buffer 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 µM Leupeptin, 1 mM Na₃VO₄, 0,1% Triton-X100, 0,1% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 50 mM NaF). Proteins were eluted by boiling in reducing buffer (0,5 M Tris, 10 mM SDS, 30% glycerol, 0,2 mM bromophenol-blue, and 12% β-mercapto-ethanol) 5 minutes at 95°C. Samples were loaded on 10% SDS-PAGE gel for immunoblotting analysis.

***In vitro* Kinase assays**

Recombinant human NPM, ATF2 and active p38α (Millipore) were mixed in Kinase Assay Buffer (25 mM Hepes pH 7.5, 25 mM β-glycerophosphate, 25 mM MgCl₂, 100 µM Na₃VO₄, 2 mM DTT). Then, 50 µM ATP and 4µCi [32P] ATP were added to the reaction for 30 minutes at 30°C. The reaction was stopped by adding Laemmli buffer and boiling 5 minutes at 95°C. Samples were loaded on a 12% SDS-PAGE gel. Gel was then stained with Coomassie Blue, fixed and dried. Radioactive signals were detected by Fuji FLA-5100 Imager.

Mass spectrometry

Protein extracts of cells treated or not by H₂O₂ were separated by gel electrophoresis. The bands of interest were excised and digested with trypsin. Tryptic peptides were analyzed by nano-LC-MSMS on an LTQ-Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermofisher Scientific, San Jose, CA, USA). The data were processed with Mascot

(Matrix Science, London, United Kingdom) and blasted against the Uniprot human database with carbamidomethyl (C) as fixed modification and deamidation (NQ), oxidation (M) and phosphorylation (STY) as variable modifications.

In-situ Proximity Ligation Assay and ImmunoFluorescence

Cells implanted on coverslips coated with 1% gelatin were treated 24 to 48 h after seeding, then fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 minutes and permeabilized with PBS, 0,1% Triton X-100 for 10 minutes. For PLA, cells were incubated with antibodies in accordance with the manufacturer's instructions (DuoLink®, by Olink Bioscience, Sigma Aldrich). For immunofluorescence studies, cells were incubated with primary antibodies overnight at 4°C and then with Alexa Fluor-coupled secondary antibodies for 1 hour. Coverslips were mounted on glass slides with mounting medium ProLong® Gold with DAPI (Life Technologies) and analyzed by confocal microscopy (model FV1000, Olympus or Nikon-A1 RSi). Images were quantified using Fiji (Version 2.0.0, ImageJ) and/or Volocity™ (Version 6.2.1, Perkin Elmer) software.

Statistical Analysis

Experiments were repeated at least 3 times. Data are presented as mean \pm SEM or SD as indicated in the figures. Statistical analyses were carried out using Prism5 (Version 5.0c, GraphPad, USA) software. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

NPM associates with p38 and their interaction is regulated by oxidative stress

p38 is a major transducer of the stress signals generated by ROS and ROS-generating agents such as inflammatory mediators and ionizing radiation (3, 19). This study was initiated to characterize more precisely the p38 molecular pathway induced by oxidative stress. Therefore, we first proceeded at identifying new cytosolic partners of p38 by analyzing its interactome in membrane/cytosol fractions of endothelial cells exposed to a massive oxidative stress. By mass spectrometry analysis of proteins co-immunoprecipitating with p38, we identified in basal condition a 40 kDa protein that corresponds to NPM (NP_002511) with 16 matching peptides covering 55 % of the protein (**Fig. 3-1A and Supplemental Fig. S3-1**). These results were confirmed by specific detection by Western Blot of endogenous NPM and p38 in immunoprecipitated p38 and NPM, respectively (**Fig. 3-1B**). Co-immunoprecipitation assays showed that the amount of NPM that co-precipitated with p38 rapidly decreased within 10 min in response to 500 μM H_2O_2 (**Fig. 3-1B**). The amount of p38 present in NPM immunoprecipitate was also decreased. This H_2O_2 -induced decrease in p38/NPM association occurred concomitantly with a decrease of total NPM in the membrane/cytosol fractions (**Input Fig. 3-1B and Fig. 3-1C**). Remarkably, by using the microscopic approach of proximity ligation assay (PLA) allowing « in-situ » detection of proximal endogenous proteins, we observed that the p38/NPM interaction preferentially occurred in the cytoplasm and mostly in a perinuclear location (**Fig. 3-1D**). In contrast, the complexes were mildly detected in the nucleus. The PLA analysis revealed that the total number of p38/NPM complexes decreased in response to oxidative stress and showed that this decrease was due to a significant depletion of p38/NPM complexes in the cytosolic compartment (**Fig. 3-1D**).

NPM does not affect the activation of p38 induced by oxidative stress

Oxidative stress induces a time-dependent phosphorylation and activation of p38 that peaks at 5 min exposure of endothelial cells to 500 μM H_2O_2 (**Fig. 3-2A**). Interestingly, the kinetics of activation of p38 by H_2O_2 was the same when assayed in the membrane/cytosolic fraction (**Fig. 3-2A, right panel**), consistent with the fact that this activation occurs mainly in the cytosol. Despite lacking any intrinsic enzymatic activity, NPM has previously been shown to enhance the activity of kinases (31). We

thus explored the possibility that NPM could impact p38 activity. To address this question, we knocked down the expression of NPM by ~ 80% with a pool of 4 different siRNAs. In comparison to cells treated with a pool of 4 different control scramble siRNAs, the knockdown of NPM did not affect H₂O₂-induced p38 phosphorylation and p38 kinase activation estimated by Hsp27 phosphorylation (**Fig. 3-2B**). Along these lines, an in-vitro kinase assay showed that increasing concentrations of purified NPM did not affect the ability of recombinant p38 to phosphorylate its known substrate ATF2 (**Fig. 3-2C**). Overall, the results suggest that NPM does not regulate the phosphorylation and activation of p38.

p38 is not an NPM kinase and its activity is not required for oxidative stress-induced dephosphorylation of NPM

Given that NPM is known to be phosphorylated on several Ser/Thr residues (22), we verified the possibility that NPM could be a substrate of p38, a Ser/Thr kinase. To this end, we first performed an in vitro kinase assay using recombinant active p38 and recombinant ATF2, a well-known substrate of p38 (33) used here as a control, or recombinant GST-NPM as a potential kinase substrate (**Fig. 3-3A**). In contrast to the marked phosphorylation of ATF2 in this assay, labeled ³²PO₄ from [γ ³²P]-ATP was not incorporated in NPM in the presence of active purified p38. Hence, NPM is not a direct substrate of p38.

Yet, we found that NPM was phosphorylated at T199 (NPM-pT199) in total lysates and membrane/cytoplasmic extracts of unstimulated endothelial cells. In this latter fraction, upon activation by oxidative stress, NPM was quickly dephosphorylated at T199 within 5-10 min of H₂O₂ treatment (**Fig. 3-3B**), an event that occurred concomitantly with its dissociation from p38 (**Fig. 3-1B, 3-1D**). Incidentally, other known stress signals leading to p38 activation (anisomycin, TNF α , ionizing radiation and heat shock) (**Supplemental Fig. S3-2**) lead to the same profile of NPM dephosphorylation, suggesting a correlation between p38 activation and NPM dephosphorylation. Nevertheless, oxidative stress-induced dephosphorylation of NPM at T199 appears to be independent of p38 activity since the pre-treatment of cells with LY2228820, a specific inhibitor of p38 (34), has no effect on T199 NPM dephosphorylation (**Fig. 3-3C**).

Phosphatase PP2a dephosphorylates NPM in response to oxidative stress

Oxidative stress is known to regulate Ser/Thr phosphatase activity (35), especially in endothelial cells (36). Accordingly, we next ascertained whether H₂O₂-induced dephosphorylation of NPM at T199 did involve the activation of a Ser/Thr phosphatase. We thus treated endothelial cells with okadaic acid (OA), an inhibitor of PP1 and PP2a, two major Ser/Thr phosphatases. As shown in **Fig. 3-4A**, OA (500 nM) completely inhibited the dephosphorylation of NPM at T199. Then, we aimed at identifying which of these two phosphatases was involved in the dephosphorylation of NPM-pT199. To strengthen results obtained with OA, we thus evaluated the level of NPM-pT199 following H₂O₂ exposure in cells knocked down for PP2a or PP1 (α and β isoforms). H₂O₂-induced dephosphorylation of NPM-pT199 was almost fully impaired in cells depleted in PP2a (**Fig. 3-4B**). In contrast to PP2a, the inhibition of PP1 with tautomycin (TTM) (**Fig. 3-4C**) or the knockdown of PP1 α or β isoforms (**Fig. 3-4D**) did not significantly reduce the phosphorylation level of residue T199. These results indicate that PP2a is the major phosphatase involved in dephosphorylating NPM-pT199 in oxidative stress conditions.

PP2a-mediated dephosphorylation of NPM promotes p38/NPM dissociation in response to oxidative stress

Interestingly, PP2a co-precipitated with p38 and NPM (**Fig. 3-5A**) in unstimulated endothelial cells. This suggests that NPM forms a heterotrimeric complex with p38 and PP2a in basal condition. As the p38/NPM complex disassembles when cells are treated with oxidative stress (**Fig. 3-1B, 3-1D**), PP2a also dissociates from the two proteins (**Fig. 3-5A**). Since dissociation of this complex is concomitant with PP2a induced-NPM dephosphorylation upon stress exposure, we envisioned a role for NPM phosphorylation at T199 in regulating the dynamics of p38/NPM interaction. Along these lines, more NPM was associated with p38 in condition where phosphorylation at T199 was maintained by pretreatment of cells with OA (**Fig. 3-5B**).

Dephosphorylation of cytoplasmic NPM is concomitant with its translocation to the nucleus

Despite a constant expression of NPM protein in total cell lysates, a rapid decrease of NPM protein level was observed in cytosolic/membrane fractions of endothelial cells treated with 500 μ M H₂O₂ (**Fig. 3-6A, upper panel**). Conversely, the

protein level of NPM concomitantly increased in the nuclear extracts (containing nuclear and nucleolar proteins) of cells exposed to H₂O₂. Hence, the oxidative stress-induced decrease in cytoplasmic/membrane NPM results from its translocation into the nucleus, rather than being caused by an unlikely degradation of NPM protein. As shown by microscopic analysis of the nucleus (**Fig. 3-6A, lower panel**), nuclear NPM was exclusively localized in the nucleolus in non-treated cells but was detected in the nucleoplasm after 15 min of 500 μ M H₂O₂. However, even if a constant shuttling of NPM between the nucleoplasm and nucleolus remains possible, it might not explain the observed increased of nucleoplasmic NPM, as the total nuclear NPM level detected by western blot is increased (**Fig. 3-6A, upper panel**). Altogether, these results are consistent with the fact that the augmentation of nuclear NPM results from the translocation of a cytoplasmic pool of NPM to the nucleoplasm following oxidative stress.

As we previously showed that cytoplasmic NPM was dephosphorylated on T199 in cells exposed to oxidative stress (**Fig. 3-3B**), we next verified which form of NPM translocated to the nucleus. As illustrated in **Fig. 3-6B**, oxidative stress-induced increase of nuclear NPM was not associated with an increased level of NPMpT199. This indicates that NPM found in the nucleus after 15 min of exposure to H₂O₂ is mainly unphosphorylated at T199. We expressed in endothelial cells Flag-tagged non-phosphorylatable (T199A) or phosphomimetic (T199D) mutated forms of NPM (**Supplemental Fig. S3-3**). In accordance with the previous results, the percentage of cells with localization of NPM in the cytoplasm is more important in cells that express the phosphomimetic T199D mutant as compared to the non-phosphorylatable T199A mutant (**Fig. 3-6C**). Overall, these results highlight that a rapid translocation of NPM from the cytosol to the nucleus occurs in endothelial cells upon oxidative stress exposure. Furthermore, converging results suggest that dephosphorylated T199 is the main form present in the nucleus after oxidative stress exposure of endothelial cells.

Non-phosphorylated NPM at T199 impairs the detection of oxidative-stress-induced DNA damage

In primary cell cultures, high doses of H₂O₂ produce single strand breaks (SSBs) and double strand breaks (DSBs) within DNA (37). In addition, NPM has been shown to interact with H2AX (38), an early marker of DSBs. Therefore, we next tested if the relocation of NPM unphosphorylated at T199 into the nucleus could modulate DNA

damage response (DDR) in endothelial cells exposed to oxidative stress. To this end, foci of phosphorylated γ -H2AX were quantified by immunostaining in HUVECs expressing non-phosphorylatable Flag-NPM T199A mutated protein and treated with 500 μ M of H₂O₂. γ -H2AX foci number per control cell peaked at 120 min and then decreased concomitantly to DNA repair. In contrast, γ -H2AX foci number per cells expressing T199A mutated protein barely increased during the whole kinetic (**Fig. 3-7A**). The first and major DNA repair machinery of DSBs taking place in quiescent normal cells involves the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit DNA-PKcs (39). This serine/threonine kinase, also identified as a sensor of DSBs, is very rapidly recruited to damage sites where it is activated through its phosphorylation at Ser 2056 and is then able to phosphorylate H2AX (40). As observed for γ -H2AX, DNA-PKcs phosphorylation quantified by Western Blot peaked at 120 min of 500 μ M H₂O₂ treatment in control cells, but is almost undetectable in cells expressing the T199A mutant (**Fig. 3-7B**). Overall, these findings indicate that non-phosphorylated NPM at T199 impairs the detection of oxidative stress-induced DSBs.

DISCUSSION

Endothelial dysfunction is associated with oxidative stress-induced vascular- and age-related pathologies like atherosclerosis, hypertension and diabetes (8, 13, 14) but also with radiation-induced toxicity to normal tissues (15). In this study, we aimed at understanding molecular mechanisms underlying endothelial dysfunction in response to oxidative stress. The p38 MAPK (p38) pathway is a pleiotropic pathway importantly involved in transducing stress signals, especially in the endothelial compartment (16, 18). In this context, we identified for the first time the protein NPM as a membrane/cytosolic partner of p38 that upon dissociation from p38 translocates to the nucleus to challenge the DNA Damage Response (DDR).

The interaction between NPM and p38 in endothelial cells is supported by three major findings: first, by mass spectrometry analysis of proteins that co-precipitate with p38, we found a protein of 40 kDa that corresponds to NPM with 16 matching peptides covering 55% of the protein; second, specific proteins detection by Western Blot in immunoprecipitated complexes reveals that NPM co-immunoprecipitates with p38 and reversely p38 coimmunoprecipitates with NPM; third, both p38 and NPM are found in close proximity by PLA assay. The interaction occurs in the cytoplasm of unstimulated cells, is found mostly in the perinuclear area and is decreased by oxidative stress. NPM is known as a nucleus/cytoplasm shuttling protein through its nuclear export (NES) and nuclear import sequences (NLS) (41). It is commonly accepted that the major localization of this protein is nucleolar/nuclear, due to the predominance of its nuclear import over nuclear export (42-44). Nevertheless, a mutated form of NPM conferring a cytoplasmic location of the protein is a hallmark of acute myeloid leukemia patients with a normal karyotype (45). Moreover, several recent studies also report in transformed cells the interaction of wild-type NPM with cytosolic proteins such as Stat3 (46) or Bax (47). However, we report for the first time the presence of a pool of cytoplasmic NPM in normal quiescent primary cells. Importantly, our work also identifies that the retention of NPM in the cytoplasm of normal cells relies on its interaction with p38, as discussed below.

Our findings provide evidence that in quiescent endothelial cells the cytosolic pool of NPM is phosphorylated on threonine 199 (T199). NPM possesses multiple sites of phosphorylation (22) and T199 is a major phosphorylation site regulating different

cellular functions such as centrosome duplication (48), pre-mRNA processing (23) and viral persistency (49). Despite its serine/threonine kinase activity, p38 is not a NPM kinase. In fact, purified active p38 cannot phosphorylate NPM in an in vitro assay in which it phosphorylates its typical substrate ATF2. Moreover, different chemical inhibitors of the kinase activity of p38 do not affect the phosphorylation level of NPM on T199. From these findings, phosphorylation of NPM at T199 must involve kinases different from p38. Several kinases have been shown to phosphorylate NPM at T199. Notably, CDK2 associated with cyclin E/A is the primary kinase of T199 NPM (50). Predominantly acting in the nucleus, CDK2 has been also detected in the cytoplasm (51) and recently, CDK2-dependent phosphorylation of NPM has been described in the cytosolic compartment (52). Additional kinases might be involved in phosphorylating NPM on T199, notably GRK5 and TPL2 (53, 54). These kinases are found in the nucleus. Hence, it is a possibility that phosphorylation of NPM at T199 by these kinases occur in the nucleus, which would lead to NPM translocation into the cytoplasm and to its association with p38. In our experimental conditions, the kinase that phosphorylates NPM at T199 remains to be determined.

A major feature of the interaction between p38 and NPM is that it senses oxidative stress, as supported by its dissociation following treatment with H₂O₂. Importantly, this oxidative stress induced-dissociation of the NPM/p38 complex is concomitant with a dephosphorylation of NPM at T199. In fact, in response to H₂O₂, the level of NPM-pT199 decreases progressively to reach basal level at 30 min. Several other stress stimuli (anisomycin, TNF α , heat shock and ionizing radiation), known as a source of oxidative stress able to activate p38, induce NPM dephosphorylation, supporting the point that this dephosphorylation of NPM is an inherent response of endothelial cells to stress. Members of the serine/threonine protein phosphatases family like PP1 and PP2a have been described to dephosphorylate NPM, particularly at T199 residue (55). Accordingly, we found that PP2a co-precipitates with both p38 and NPM and that dephosphorylation of T199 is markedly impaired by pharmacologic inhibition or silencing of PP2a. Conversely, the knockdown of PP1 α and β isoforms is not associated with an inhibition of dephosphorylation of NPM at T199 following exposure of endothelial cells to oxidative stress as it is the case in transformed cells exposed to UV (55). Overall, these findings are consistent with the fact that PP2a is the major phosphatase involved in oxidative stress-induced dephosphorylation of NPM at T199 in

primary endothelial cells.

The p38/NPM/PP2a complex is a characteristic feature of quiescent unstimulated endothelial cells and this association, highly reactive to oxidative stress, appears dependent on the phosphorylation status of NPM at T199, as inhibition of PP2a and consequent impairment of dephosphorylation of NPM limits the NPM/p38 dissociation. Based on our findings, we propose that NPM phosphorylated at T199 contributes to the dynamics of p38/NPM interaction. Furthermore, the role of p38 in the dynamics of the NPM/p38/PP2a complex appears to be independent of its kinase activity, as NPM-pT199 dephosphorylation is not impaired when p38 kinase activity is inhibited. p38 would then act as scaffold protein for NPM and its phosphatase PP2a. Our work expands the notion that p38 may have functions that are independent of its kinase activity (56). In this context, the possibility that additional partners are associated with the complex to modulate its signaling cannot be excluded.

Since ROS-induced dissociation of the complex is concomitant with the dephosphorylation of NPM by PP2a, we propose that in unstimulated cells, inactive form of PP2a is associated to p38/NPM and becomes activated upon exposure to H₂O₂, hence dephosphorylating NPM and leading to its dissociation from p38. Oxidative stress has been described as negatively regulating PP2a activity (57, 58). However, at high concentrations (>100 μM) H₂O₂ activates PP2a in pancreatic islets and in different cell lines (35) and more importantly in endothelial cells (36). Direct redox regulation of serine/threonine phosphatase has been proposed to explain the effect of oxidative stress on PP2a (58, 59). Alternatively, it is also possible that oxidative stress-mediated activation of PP2a relies on the activation of molecules upstream of the phosphatase. For example, activation of PP2a by the sphingolipid ceramide has been recently identified in promoting endothelial dysfunction (60). Incidentally, this lipid is known to be generated by oxidative stress (61) and is extremely rapidly produced in HUVECs exposed to 500 μM H₂O₂ (personal communication, I. Corre), suggesting that ceramide may be an activator of PP2a in our study.

Oxidative stress-induced destabilization of the p38/NPM/PP2a complex, associated to dephosphorylation of NPM-pT199, is concomitant to a very rapid increase of NPM into the nucleus. NPM-pT199 is barely detected in the nucleus and the phosphomimetic mutant NPM T199D when expressed in endothelial cells is mostly found in the

cytoplasm, which strengthens the point that dephosphorylated NPM is directed to the nucleus. The status of NPM phosphorylation is a relevant regulating factor of its localization. Notably, phosphorylated T95 residue is associated to nuclear export regulation (62), phosphorylated T199 is found to be localized to nuclear speckles in mouse fibroblasts (23) and cytoplasmic form of NPM in leukemic cells is highly phosphorylated on T199 (52). Now, our results also indicate that in endothelial primary cells, the major nuclear form of NPM is the T199 dephosphorylated form of NPM. Our results reinforce the notion that rapid dephosphorylation of NPM is an important factor for its spatial regulation, possibly through the Crm1/Importin nuclear import machinery as NPM/importin interaction as previously been reported (44). In line with its dephosphorylation, the dissociation of p38 from NPM also possibly unmasks an NLS motif of NPM, favoring then its access to importin and its nuclear import.

A hallmark of the oxidative stress response is the induction of DNA damage and repair. Notably, early damage induced by high concentrations of H₂O₂ includes alterations of DNA such as base oxidation and DNA single and double strand breaks (SSBs and DSBs) (37). Consistent with these findings, we provided evidence that in endothelial cells, treatment with 500 μ M H₂O₂ leads to formation of DSBs as detected by formation of γ -H2AX foci. Interestingly, NPM has been shown to contribute to the repair of different types of DNA damage: bulky lesions and UV-induced DNA cross-links (55, 63), SSBs and single-base damage (64). Implication of NPM in DSBs repair has been also described but in the context of homologous recombination (HR) and in cycling cancer cells (65, 66). In non-dividing cells, DSBs are preferentially repaired by the non-homologous end joining repair pathway (NHEJ), where the DNA-PKcs protein plays the role of DSBs sensor (39). In primary quiescent endothelial cells, oxidative stress-induced formation of γ -H2AX foci is coupled to the phosphorylation and activation of DNA-PKcs, demonstrating the engagement of the NHEJ pathway in these cells. Expression of the non-phosphorylatable mutant NPM-pT199 in the nucleus of endothelial cells is associated with an impairment of DSBs detection, the first step of the NHEJ repair pathway, as reflected by the inhibition of DNA-PKcs and subsequent inhibition of γ -H2AX foci. These results lead to two important conclusions. First, for the first time NPM is shown to be involved in the modulation of the NHEJ repair pathway and second, NPM appears to act through its T199 non-phosphorylated form to impair signaling within this pathway.

Previous work involved NPM and its phosphorylated T199 form in favoring HR repair process in irradiated cancer cells, as NPM-pT199 recruitment to sites of DSBs and binding to ubiquitinated chromatin promotes Rad51-mediated HR (65, 66). Accordingly, inhibiting NPM-pT199 recruitment to irradiation-induced foci (IRIF) by a novel chemical entity YTR107 has been proposed as a radiosensitization approach to eradicate specifically tumor cells (67). Indeed, YTR107 does not affect location of pT199-NPM in IRIF in normal lung fibroblast (68). Conversely to fibroblasts, primary endothelial cells do not exhibit pT199-NPM in their nucleus upon exposure to oxidative stress. This implies that the major nuclear form of NPM in these conditions is the non-phosphorylated T199 that affects efficient early step of the NHEJ pathway. Thus, the role of NPM in DNA repair appears to be different according to the type of DSBs repair pathway (HR vs. NHEJ) but also to the type and proliferation status of cells.

Our work supports the fact that the presence of a p38/NPM/PP2a complex in the cytoplasm allows a rapid acute response of normal endothelial cells to stress injury. As described in the model presented in **Fig. 3-8**, massive oxidative stress induces NPM dephosphorylation, its release from the p38/NPM/PP2a complex and its rapid relocation to the nucleus to impair DDR. The establishment of long-lasting DNA damage may associate to genomic instability leading to death, growth arrest or senescence set-up and would contribute to oxidative stress-induced endothelial dysfunction (8).

Overall, the biological issues covered by our findings highlight new mechanisms helping to understand oxidative stress-induced endothelial dysfunction-associated disorders that includes pathologies like atherosclerosis, diabetes but also normal tissue toxicity in radiotherapy treatments. Hence, in this specific context, targeting the NPM/p38/PP2a axis in endothelial cells could be considered to limit radiation-induced tissue toxicity, a current major limiting factor of this anti-cancer therapy.

This work was funded by the IOF Marie Curie People Programm of the European Union's Seventh Framework Program FP7/2007-2013/ under REA grant agreement n° 326512 to I.C, CIHR and NSERC to JH. M.G was a recipient of the French Ministry of Research MRSE studentship.

We would like to thank Drs. Jean-Yves Masson (Université Laval, CA), Claude Prigent and David Reboutier (IGDR, Rennes, FR) for providing the NPM mutants and purified Aurora kinase, respectively and for advices and helpful discussions. We thank Dr. Jacques Landry (Université Laval, CA) for giving p38 MAPK antibody. We are also grateful to Dr. Simon Rousseau (McGill University, Montreal), Dr. Julie Gavard (CRCNA, Nantes, FR) and François Houle (Université Laval, CA) for carefully reading the manuscript. The authors are grateful to Philippe Hulin and Steven Nedellec from the MicroPICell-Cellular Imaging Core Facility (SFR Bonamy, Nantes, FR) for their for help and advice. We thank Dr. Eric Bonneil, from the Proteomic Platform of the "Institute for Research in Immunology and Cancer" (IRIC) (University of Montreal, CA) for performing the Mass Spectrometry analyses.

REFERENCES

1. Touyz, R. M., and Briones, A. M. (2011) Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 34, 5-14
2. Papaharalambus, C. A., and Griendling, K. K. (2007) Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends in cardiovascular medicine* 17, 48-54
3. Huot, J., Houle, F., Marceau, F., and Landry, J. (1997) Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res* 80, 383-392
4. Boueiz, A., and Hassoun, P. M. (2009) Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvascular research* 77, 26-34
5. Sakamoto, N., Ishibashi, T., Sugimoto, K., Sawamura, T., Sakamoto, T., Inoue, N., Saitoh, S., Kamioka, M., Uekita, H., Ohkawara, H., Suzuki, K., Teramoto, T., Maruyama, Y., and Takeishi, Y. (2009) Role of LOX-1 in monocyte adhesion-triggered redox, Akt/eNOS and Ca²⁺ signaling pathways in endothelial cells. *Journal of cellular physiology* 220, 706-715
6. Seal, J. B., and Gewertz, B. L. (2005) Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg* 19, 572-584
7. Stone, J. R., and Collins, T. (2002) The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium : journal of endothelial cell research* 9, 231-238
8. Zhan, H., Suzuki, T., Aizawa, K., Miyagawa, K., and Nagai, R. (2010) Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. *The Journal of biological chemistry* 285, 29662-29670
9. Haendeler, J., Popp, R., Goy, C., Tischler, V., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2005) Cathepsin D and H₂O₂ stimulate degradation of thioredoxin-1: implication for endothelial cell apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 280, 42945-42951
10. Hermann, C., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (1997) Shear stress inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17, 3588-3592
11. Harrison, D., Griendling, K. K., Landmesser, U., Hornig, B., and Drexler, H. (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 91, 7A-11A
12. Victor, V. M., Rocha, M., Sola, E., Banuls, C., Garcia-Malpartida, K., and Hernandez-Mijares, A. (2009) Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 15, 2988-3002

13. Javeshghani, D., Schiffrin, E. L., Sairam, M. R., and Touyz, R. M. (2009) Potentiation of vascular oxidative stress and nitric oxide-mediated endothelial dysfunction by high-fat diet in a mouse model of estrogen deficiency and hyperandrogenemia. *J Am Soc Hypertens* 3, 295-305
14. Schini-Kerth, V. (2014) Role of polyphenols in improving endothelial dysfunction in diabetes. *Free radical biology & medicine* 75 Suppl 1, S11-12
15. Corre, I., Guillonneau, M., and Paris, F. (2013) Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity. *International journal of molecular sciences* 14, 22678-22696
16. Cuenda, A., and Rousseau, S. (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1358-1375
17. Coulthard, L. R., White, D. E., Jones, D. L., McDermott, M. F., and Burchill, S. A. (2009) p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends in molecular medicine* 15, 369-379
18. Cuadrado, A., Lafarga, V., Cheung, P. C., Dolado, I., Llanos, S., Cohen, P., and Nebreda, A. R. (2007) A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis. *EMBO J* 26, 2115-2126
19. Kumar, P., Miller, A. I., and Polverini, P. J. (2004) p38 MAPK mediates gamma-irradiation-induced endothelial cell apoptosis, and vascular endothelial growth factor protects endothelial cells through the phosphoinositide 3-kinase-Akt-Bcl-2 pathway. *The Journal of biological chemistry* 279, 43352-43360
20. Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B., and Pandolfi, P. P. (2006) Nucleophosmin and cancer. *Nature reviews. Cancer* 6, 493-505
21. Ramos-Echazabal, G., Chinae, G., Garcia-Fernandez, R., and Pons, T. (2012) In silico studies of potential phosphoresidues in the human nucleophosmin/B23: its kinases and related biological processes. *Journal of cellular biochemistry* 113, 2364-2374
22. Okuwaki, M. (2008) The structure and functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *Journal of biochemistry* 143, 441-448
23. Tarapore, P., Shinmura, K., Suzuki, H., Tokuyama, Y., Kim, S. H., Mayeda, A., and Fukasawa, K. (2006) Thr199 phosphorylation targets nucleophosmin to nuclear speckles and represses pre-mRNA processing. *FEBS letters* 580, 399-409
24. Yang, C., Maignel, D. A., and Carrier, F. (2002) Identification of nucleolin and nucleophosmin as genotoxic stress-responsive RNA-binding proteins. *Nucleic acids research* 30, 2251-2260
25. Ramsamooj, P., Notario, V., and Dritschilo, A. (1995) Modification of nucleolar protein B23 after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res* 143, 158-164

26. Paron, I., D'Elia, A., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., D'Aurizio, F., Prescott, A., Damante, G., and Tell, G. (2004) A proteomic approach to identify early molecular targets of oxidative stress in human epithelial lens cells. *The Biochemical journal* 378, 929-937
27. Kinumi, T., Ogawa, Y., Kimata, J., Saito, Y., Yoshida, Y., and Niki, E. (2005) Proteomic characterization of oxidative dysfunction in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by exposure to oxidized LDL. *Free radical research* 39, 1335-1344
28. Csiszar, A., Wang, M., Lakatta, E. G., and Ungvari, Z. (2008) Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB. *Journal of applied physiology* 105, 1333-1341
29. Chang, T. M., Shi, G. Y., Wu, H. L., Wu, C. H., Su, Y. D., Wang, H. L., Wen, H. Y., and Huang, H. C. (2011) Effects of salvianolic Acid B on protein expression in human umbilical vein endothelial cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011, 213050
30. Guay, J., Lambert, H., Gingras-Breton, G., Lavoie, J. N., Huot, J., and Landry, J. (1997) Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci* 110, 357-368
31. Reboutier, D., Troadec, M. B., Cremet, J. Y., Fukasawa, K., and Prigent, C. (2012) Nucleophosmin/B23 activates Aurora A at the centrosome through phosphorylation of serine 89. *J Cell Biol* 197, 19-26
32. Cote, M. C., Lavoie, J. R., Houle, F., Poirier, A., Rousseau, S., and Huot, J. (2010) Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor-induced Endothelial Cell Migration by LIM Kinase 1-mediated Phosphorylation of Annexin 1. *The Journal of biological chemistry* 285, 8013-8021
33. Trempelec, N., Dave-Coll, N., and Nebreda, A. R. (2013) SnapShot: p38 MAPK substrates. *Cell* 152, 924-924 e921
34. Ishitsuka, K., Hideshima, T., Neri, P., Vallet, S., Shiraishi, N., Okawa, Y., Shen, Z., Raje, N., Kiziltepe, T., Ocio, E. M., Chauhan, D., Tassone, P., Munshi, N., Campbell, R. M., Dios, A. D., Shih, C., Starling, J. J., Tamura, K., and Anderson, K. C. (2008) p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor LY2228820 enhances bortezomib-induced cytotoxicity and inhibits osteoclastogenesis in multiple myeloma; therapeutic implications. *British journal of haematology* 141, 598-606
35. Yan, L., Guo, S., Brault, M., Harmon, J., Robertson, R. P., Hamid, R., Stein, R., and Yang, E. (2012) The B55alpha-containing PP2A holoenzyme dephosphorylates FOXO1 in islet beta-cells under oxidative stress. *The Biochemical journal* 444, 239-247
36. Cicchillitti, L., Fasanaro, P., Biglioli, P., Capogrossi, M. C., and Martelli, F. (2003) Oxidative stress induces protein phosphatase 2A-dependent dephosphorylation of the pocket proteins pRb, p107, and p130. *The Journal of biological chemistry* 278, 19509-19517

37. Driessens, N., Versteijhe, S., Ghaddhab, C., Burniat, A., De Deken, X., Van Sande, J., Dumont, J. E., Miot, F., and Corvilain, B. (2009) Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocrine-related cancer* 16, 845-856
38. Du, Y. C., Gu, S., Zhou, J., Wang, T., Cai, H., Macinnes, M. A., Bradbury, E. M., and Chen, X. (2006) The dynamic alterations of H2AX complex during DNA repair detected by a proteomic approach reveal the critical roles of Ca(2+)/calmodulin in the ionizing radiation-induced cell cycle arrest. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, 1033-1044
39. Iyama, T., and Wilson, D. M., 3rd. (2013) DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair* 12, 620-636
40. Davis, A. J., Chen, B. P., and Chen, D. J. (2014) DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA repair* 17, 21-29
41. Bertwistle, D., Sugimoto, M., and Sherr, C. J. (2004) Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Molecular and cellular biology* 24, 985-996
42. Bolli, N., Nicoletti, I., De Marco, M. F., Bigerna, B., Pucciarini, A., Mannucci, R., Martelli, M. P., Liso, A., Mecucci, C., Fabbiano, F., Martelli, M. F., Henderson, B. R., and Falini, B. (2007) Born to be exported: COOH-terminal nuclear export signals of different strength ensure cytoplasmic accumulation of nucleophosmin leukemic mutants. *Cancer research* 67, 6230-6237
43. Falini, B., Bolli, N., Liso, A., Martelli, M. P., Mannucci, R., Pileri, S., and Nicoletti, I. (2009) Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. *Leukemia* 23, 1731-1743
44. Arregi, I., Falces, J., Olazabal-Herrero, A., Alonso-Marino, M., Taneva, S. G., Rodriguez, J. A., Urbaneja, M. A., and Banuelos, S. (2015) Leukemia-Associated Mutations in Nucleophosmin Alter Recognition by CRM1: Molecular Basis of Aberrant Transport. *PloS one* 10, e0130610
45. Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., Bigerna, B., Pacini, R., Pucciarini, A., Liso, A., Vignetti, M., Fazi, P., Meani, N., Pettrossi, V., Saglio, G., Mandelli, F., Lo-Coco, F., Pelicci, P. G., Martelli, M. F., and Party, G. A. L. W. (2005) Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *The New England journal of medicine* 352, 254-266
46. Ren, Z., Aerts, J. L., Pen, J. J., Heirman, C., Breckpot, K., and De Greve, J. (2015) Phosphorylated STAT3 physically interacts with NPM and transcriptionally enhances its expression in cancer. *Oncogene* 34, 1650-1657
47. Khandelwal, N., Simpson, J., Taylor, G., Rafique, S., Whitehouse, A., Hiscox, J., and Stark, L. A. (2011) Nucleolar NF-kappaB/RelA mediates apoptosis by causing cytoplasmic relocation of nucleophosmin. *Cell death and differentiation* 18, 1889-

48. Tokuyama, Y., Horn, H. F., Kawamura, K., Tarapore, P., and Fukasawa, K. (2001) Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *The Journal of biological chemistry* 276, 21529-21537
49. Sarek, G., Jarviluoma, A., Moore, H. M., Tojkander, S., Vartia, S., Biberfeld, P., Laiho, M., and Ojala, P. M. (2010) Nucleophosmin phosphorylation by v-cyclin-CDK6 controls KSHV latency. *PLoS pathogens* 6, e1000818
50. Okuda, M., Horn, H. F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A. G., Chan, P. K., Knudsen, E. S., Hofmann, I. A., Snyder, J. D., Bove, K. E., and Fukasawa, K. (2000) Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103, 127-140
51. Hiromura, K., Pippin, J. W., Blonski, M. J., Roberts, J. M., and Shankland, S. J. (2002) The subcellular localization of cyclin dependent kinase 2 determines the fate of mesangial cells: role in apoptosis and proliferation. *Oncogene* 21, 1750-1758
52. Chan, N., and Lim, T. M. (2015) Cytoplasmic nucleophosmin has elevated T199 phosphorylation upon which G2/M phase progression is dependent. *Scientific reports* 5, 11777
53. So, C. H., Michal, A. M., Mashayekhi, R., and Benovic, J. L. (2012) G protein-coupled receptor kinase 5 phosphorylates nucleophosmin and regulates cell sensitivity to polo-like kinase 1 inhibition. *The Journal of biological chemistry* 287, 17088-17099
54. Kanellis, D. C., Bursac, S., Tsihchlis, P. N., Volarevic, S., and Eliopoulos, A. G. (2015) Physical and functional interaction of the TPL2 kinase with nucleophosmin. *Oncogene* 34, 2516-2526
55. Lin, C. Y., Tan, B. C., Liu, H., Shih, C. J., Chien, K. Y., Lin, C. L., and Yung, B. Y. (2010) Dephosphorylation of nucleophosmin by PP1beta facilitates pRB binding and consequent E2F1- dependent DNA repair. *Molecular biology of the cell* 21, 4409-4417
56. Fan, L., Yang, X., Du, J., Marshall, M., Blanchard, K., and Ye, X. (2005) A novel role of p38 alpha MAPK in mitotic progression independent of its kinase activity. *Cell Cycle* 4, 1616-1624
57. Jin Jung, K., Hyun Kim, D., Kyeong Lee, E., Woo Song, C., Pal Yu, B., and Young Chung, H. (2013) Oxidative stress induces inactivation of protein phosphatase 2A, promoting proinflammatory NFkappaB in aged rat kidney. *Free radical biology & medicine* 61, 206-217
58. Rao, R. K., and Clayton, L. W. (2002) Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Biochemical and biophysical research communications* 293, 610-616

59. Sommer, D., Coleman, S., Swanson, S. A., and Stemmer, P. M. (2002) Differential susceptibilities of serine/threonine phosphatases to oxidative and nitrosative stress. *Archives of biochemistry and biophysics* 404, 271-278
60. Bharath, L. P., Ruan, T., Li, Y., Ravindran, A., Wan, X., Nhan, J. K., Walker, M. L., Deeter, L., Goodrich, R., Johnson, E., Munday, D., Mueller, R., Kunz, D., Jones, D., Reese, V., Summers, S. A., Babu, P. V., Holland, W. L., Zhang, Q. J., Abel, E. D., and Symons, J. D. (2015) Ceramide-Initiated Protein Phosphatase 2A Activation Contributes to Arterial Dysfunction In Vivo. *Diabetes* 64, 3914-3926
61. Martin, D., Salinas, M., Fujita, N., Tsuruo, T., and Cuadrado, A. (2002) Ceramide and reactive oxygen species generated by H₂O₂ induce caspase-3-independent degradation of Akt/protein kinase B. *The Journal of biological chemistry* 277, 42943-42952
62. Wang, W., Budhu, A., Forgues, M., and Wang, X. W. (2005) Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nature cell biology* 7, 823-830
63. Wu, M. H., Chang, J. H., and Yung, B. Y. (2002) Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression. *Carcinogenesis* 23, 93-100
64. Poletto, M., Lirussi, L., Wilson, D. M., 3rd, and Tell, G. (2014) Nucleophosmin modulates stability, activity, and nucleolar accumulation of base excision repair proteins. *Molecular biology of the cell* 25, 1641-1652
65. Koike, A., Nishikawa, H., Wu, W., Okada, Y., Venkitaraman, A. R., and Ohta, T. (2010) Recruitment of phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage through RNF8-dependent ubiquitin conjugates. *Cancer research* 70, 6746-6756
66. Sekhar, K. R., Benamar, M., Venkateswaran, A., Sasi, S., Penthala, N. R., Crooks, P. A., Hann, S. R., Geng, L., Balusu, R., Abbas, T., and Freeman, M. L. (2014) Targeting nucleophosmin 1 represents a rational strategy for radiation sensitization. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 89, 1106-1114
67. Sekhar, K. R., Reddy, Y. T., Reddy, P. N., Crooks, P. A., Venkateswaran, A., McDonald, W. H., Geng, L., Sasi, S., Van Der Waal, R. P., Roti, J. L., Salleng, K. J., Rachakonda, G., and Freeman, M. L. (2011) The novel chemical entity YTR107 inhibits recruitment of nucleophosmin to sites of DNA damage, suppressing repair of DNA double-strand breaks and enhancing radiosensitization. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 6490-6499
68. Penthala, N. R., Crooks, P. A., Freeman, M. L., and Sekhar, K. R. (2015) Development and validation of a novel assay to identify radiosensitizers that target nucleophosmin 1. *Bioorganic & medicinal chemistry* 23, 3681-3686

FIGURES LEGENDS

Figure 3-1. Identification of an interaction between NPM and p38 that is regulated by oxidative stress

A. Schematic sequence coverage of NPM protein (NP_002511) by peptides identified by mass spectroscopy in p38 immunoprecipitates from membrane/cytosol fractions. The peptide sequences corresponding to NPM are marked in bold.

B. Co-immunoprecipitation of endogenous p38 and NPM in membrane/cytosolic fractions. The membrane/cytosol extracts of cells treated with H₂O₂ (500μM, 10 min) were subjected to immunoprecipitation (IP) using anti-p38 MAPK antibody (B, upper panel) or anti-NPM antibody (B, lower panel). IP fractions were revealed by Western Blot with an anti-NPM or anti-p38 MAPK antibodies. IP control (IP ctrl) was performed with a non-specific IgG. Expression of NPM and p38 in the input (5% of the membrane/cytosol extract used for IP) was checked by Western Blot. (B, right panel) Quantification of NPM protein expression detected by Western Blot in p38 immune complex. Mean +/- SD of 4 independent experiments. *: Statistically different (P<0,05. Mann-Whitney test).

C. Decrease of NPM expression in membrane/cytosol fractions (Mb/Cyto) in HUVECs treated with H₂O₂ (500 μM, 10 min). (C, left panel) Mb/Cyto proteins were analyzed by Western Blot with an anti-NPM antibody. Hsp27 is used as loading control. (C, right panel) Quantification of 3 to 5 independent experiments (Mean +/- SD). **: Statistically different (P<0,01. Mann-Whitney test).

D. In situ interactions between endogenous p38 and NPM monitored by Proximity Ligation Assay (PLA) using anti-p38 MAPK and anti-NPM antibodies in HUVECs exposed to H₂O₂ (500 μM, 15 min). Proximal location between the two proteins was observed as red fluorescent dots. The nuclei were marked with Dapi (blue) and plasma membrane with CD31 antibody (green). Cells were observed by confocal microscopy (Nikon A1 - x60 objective with oil immersion). Negative control: PLA of p38 and Golgi matrix protein GM130. Positive control: PLA of p38 and MKK3. Scale bar: 20μm. Histogram represents quantification of red fluorescent dots in total cell, in the cytosol or in the nucleus by Volocity™ software. Each value represents mean +/- SEM

of dots/cells (n=70 cells). **: Statistically different (P<0,01. Student t-test). ***: Statistically different (P<0,001. Student t-test).

Figure 3-2. Activation of p38 induced by oxidative stress is not regulated by NPM

A. Kinetics of p38 phosphorylation in response to H₂O₂ (500µM) in total cell lysates (TCL) and in membrane/cytosol fractions (Mb/Cyto). Proteins were analyzed by Western Blot with an anti-phospho (Thr180/Tyr182) p38 antibody. Tubulin and GAPDH were used as loading controls.

B. No effect of silencing NPM on kinetics of p38 phosphorylation and activation in response to 500 µM H₂O₂. Lysates of cells transfected with negative control scrambled siRNA (scr) or with siRNA against NPM (NPM) were analyzed by Western Blot with an anti phospho-p38 (Thr180/Tyr182) or antiphospho-Hsp27 (Ser82), a known substrate of p38. Tubulin: loading control.

C. In vitro phosphorylation of ATF2 by p38 is not affected in the presence of purified NPM protein. The kinase activity of p38 was evaluated on its specific substrate ATF2 by a radioactive kinase assay: purified active kinase p38 (1 pmole) was incubated with purified GST-ATF2 (10 pmoles) and increasing quantities of NPM (0,25 to 10 pmoles) in the presence of [³²P] ATP. Kinase assay reaction was stopped, boiled and samples loaded for SDS-PAGE. Radioactive phospho-ATF2 (p-ATF2) in the gel was detected by PhosphoImaging. Each reaction was done in duplicates.

Figure 3-3. Phosphorylation of NPM is not regulated by p38

A. In vitro kinase assay with increasing quantities of active recombinant p38 (0,05 to 1 pmol) and recombinant ATF2 (10 pmoles) (A, left panel) or recombinant NPM (10 pmoles) (A, right panel) as substrate. Faint band observed in the first and last lanes at 66 kDa appeared as a non-specific minor contaminant present in the recombinant p38 preparation.

B. Level of phosphorylation of NPM on T199 in total cell lysates (TCL) and in membrane/cytosol fractions (Mb/Cyto) of cells treated with 500 µM H₂O₂ for various times. Proteins were analyzed by Western Blot with anti-phospho T199 NPM antibody. Tubulin and GAPDH were used as loading controls. Quantification histogram of the

presented blot, expressed as fold decrease of the ratio NPM-pT199/total NPM. This figure is representative of 4 independent experiments.

C. Oxidative stress-induced dephosphorylation of T199 NPM in cells pretreated with p38 MAPK inhibitor. HUVECs were pretreated 1 hour with 400 nM LY2228020 before various times of treatment with 500 μ M H₂O₂. Total cell lysates were analyzed by Western Blot with an anti-phospho T199 NPM antibody. Tubulin and phospho-Hsp27 (p-Hsp27) were respectively used as loading control and control for p38 inhibition.

Figure 3-4. Dephosphorylation of NPM is dependent on PP2A in condition of oxidative stress

NPM phosphorylated on Thr199 is revealed specifically by Western Blot in total lysates of HUVECs pretreated 30 min with phosphatase inhibitors, OA (500nM) in (A) or TTM (0,1 μ M) in (C), or of HUVECs knocked-down for PP2a in (B) or for PP1 α or PP1 β in (D) before treatment with H₂O₂ (500 μ M, 15 min). Total cell lysates were separated by SDS-PAGE. Tubulin was used as loading control. PP2a and PP1 α /PP1 β were used as control for PP2a silencing and PP1 silencing, respectively.

Figure 3-5. NPM/p38 interaction depends on PP2a phosphatase activity

A. PP2a associates with p38 and NPM in unstimulated HUVECs but this complex rapidly disassembles upon oxidative stress. Cells were treated with H₂O₂ (500 μ M) for 5 and 15 min. The membrane/cytosol extracts were subjected to PP2a IP (IP PP2a). IP fractions were revealed by Western Blot with specific anti-PP2a, anti-NPM or anti-p38 MAPK antibodies. IP ctl was performed with a non-specific IgG. Quantity of NPM, p38 and PP2a proteins in Input was checked by Western Blot.

B. Inhibition of phosphatase activity reinforces NPM/p38 interaction. HUVECs were pretreated 30 min with OA (500nM). The membrane/cytosol extracts were prepared and subjected to p38 IP. Immunoprecipitated proteins were revealed by Western Blot with specific anti-NPM or anti-p38 MAPK antibodies. An IP control (IP ctl) was performed with a non-specific IgG. NPM and NPM-pT199 were revealed with specific antibodies. Vinculin was used as loading control.

Figure 3-6. NPM dephosphorylated at T199 translocates to the nucleus upon oxidative stress

A. Expression of total NPM varies in cytosol and nucleus in HUVECs treated with H₂O₂ (500 μM). (A, upper panel) Quantification of Western Blot of endogenous NPM in TCL, Mb/Cyto and nucleus fractions in non-treated and H₂O₂ (500 μM, 15 min). The graph represents mean +/-SEM of signal from 7 independent experiments. **: Statistically different (P<0,01. Mann-Whitney test). (A, lower panel) Image of representative nucleus (Dapi staining in blue) immunostained for NPM (red) after 15 min of 500 μM H₂O₂ treatment. Cells were observed in confocal microscopy (Nikon A1 - x60 objective with oil immersion). The graph represents mean +/- SD of NPM staining intensity in the nucleus (n=30). Quantification was made by Volocity™ software. Scale bar: 5μm.

B. Phosphorylated T199 NPM is not translocated to the nucleus. Total endogenous NPM and NPM-pT199 were revealed by specific antibodies in nuclear extracts (20μg). Lamin A/C and Tubulin are used respectively as loading control of nuclear and cytosolic fractions.

C. Expression and localization of NPM-T199 mutants in HUVECs. 24 hour post-transfection of Flag-NPM T199A (non-phosphorylatable) and Flag-NPM T199D (phosphomimetic) plasmids, cells were fixed in 4% PFA and Flag-NPM was detected by Western Blot with an anti-Flag M2 antibody (green). Nuclei were stained with Dapi (blue). Cells were observed by confocal microscopy (Nikon A1 - x60 objective with oil immersion). The graph represents the percentage (mean +/- SD) of cell expressing NPM-Flag in cytosol (n=500 cells). Quantification was made by Fiji® software. *: Statistically different (P<0,05. Mann-Whitney test). Scale bar: 20μm.

Figure 3-7. NPM dephosphorylated at T199 leads to impaired DDR signaling

A. DSBs detection by γ-H2AX foci staining in HUVECs expressing T199A-NPM exposed to H₂O₂. Cells were transfected with control vector or Flag-tagged T199A-NPM for 24 hours, treated with 500μM H₂O₂ for 240 min and then fixed with 4% PFA. Following immunostaining of γH2AX foci with an anti-phospho H2AX (Ser139) antibody, cells were observed by confocal microscopy (Nikon A1 - x60 objective with oil immersion). (A, left panel) Representative image of γ-H2AX foci (red dots) detected

in the nucleus (Dapi, blue) in Flag-positive cells. Transfected Flag-NPM was detected by anti-Flag M2 antibody (not shown). (A, right panel) Quantification of γ -H2AX foci per Flag-positive cells. In each experiment, foci numbers are counted in 200 cells Flag-positive cells. The graph represents mean \pm SEM of n=12. Quantification is made by Volocity™ software. *: Statistically different (P<0,05), **: Statistically different (P<0,01), ****: Statistically different (P<0,0001) (One-way Anova multiple comparisons). Scale bar: 10 μ m.

B. Levels of phosphorylation on Ser2096 of DNA-PKcs in T199A-NPM expressing HUVECs in response to H₂O₂. As in (A), transfected cells with control vector or Flag-tagged T199A-NPM were exposed to 500 μ M H₂O₂. Total cell lysates were revealed specifically by Western Blot for phospho-Ser 2096 DNAPKcs. Detection of Flag was used to monitor loading of Flag-T199A-NPM proteins. Tubulin was used as loading control. The graph represented the blot quantification of p-S2046 DNA-PKcs.

Figure 3-8. Proposed model of the regulation and role of NPM/p38 complex in endothelial cell signaling induced by oxidative stress

In unstimulated quiescent cells, p38/p-T199 NPM/PP2a forms a complex, which is quickly dissociated in response to oxidative stress (ROS). This dissociation happens concomitantly with activated PP2a (PP2A*)-mediated dephosphorylation of NPM at T199. Following dissociation of the complex, ROS phosphorylated p38 activates its downstream effectors and more importantly, a pool of NPM unphosphorylated at T199 translocates to the nucleus where its expression is associated with an impaired DDR due to impaired detection of the DNA damage, as reflected by the inhibition of DNA-PK and subsequent inhibition of γ -H2AX phosphorylation and foci formation.

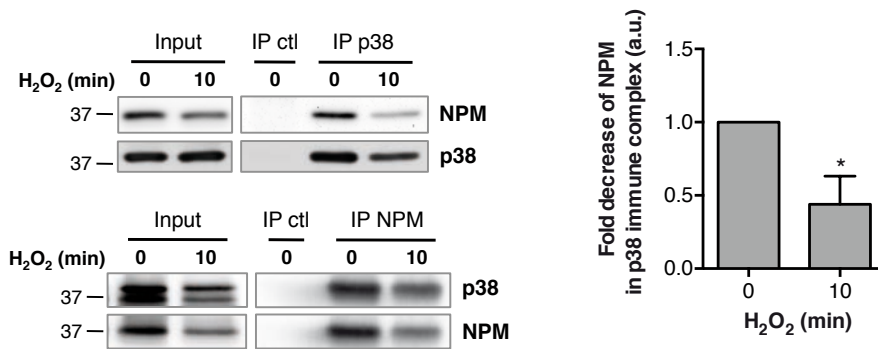
FIGURES

Figure 3-1

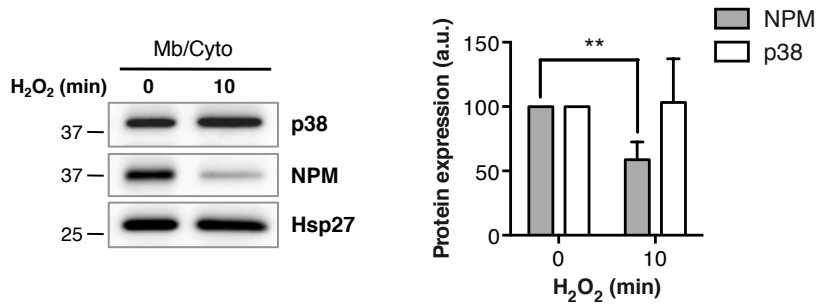
A

N^{term}MEDSMDMDMSPLRPQNYLFGCELKADKDYHFKVDNDENEHQLSLRTVSLGAGAKDELHIVEAEAMNYEGSPIKV
TLATLKMSVQPTVSLGGFEITPPVVLRLKCGSGPVHISGQHLVAVEEDAESSEDEEEEDVKLLSISGKRSAPGGGSKV
 POKKVKLAADEDDEDDDDDEDDDDDDDDDFDDEEAEEKAPVKKSIRDTPAKNAQKSNQNGKDKSPSSTPRSKGQESF
 KKQEKTPKTPKGPSSVEDIKAKMQASIEKGGSLPKVEAKFINYVKNCFRMTDQEAIQDLWQWRKSL^{Cterm}

B



C



D

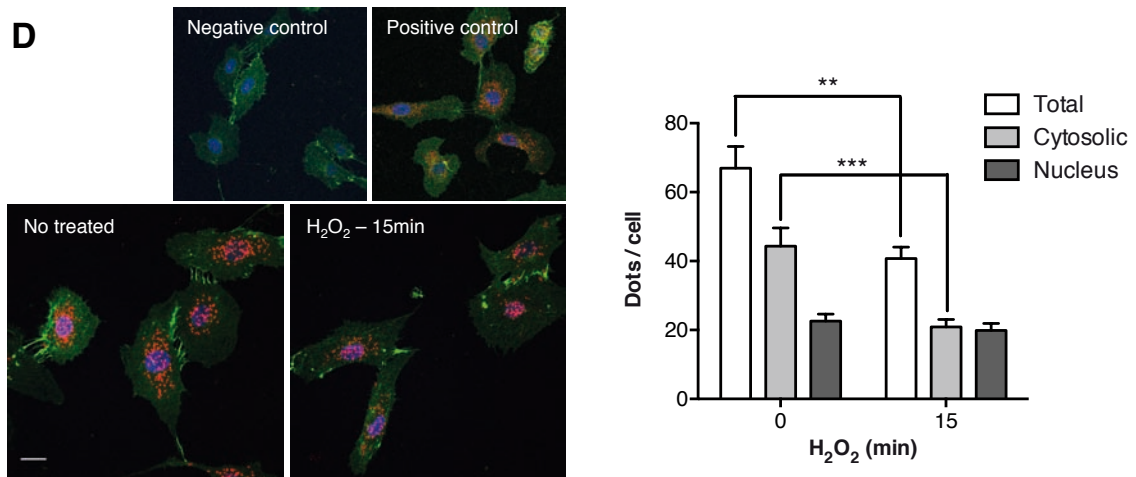
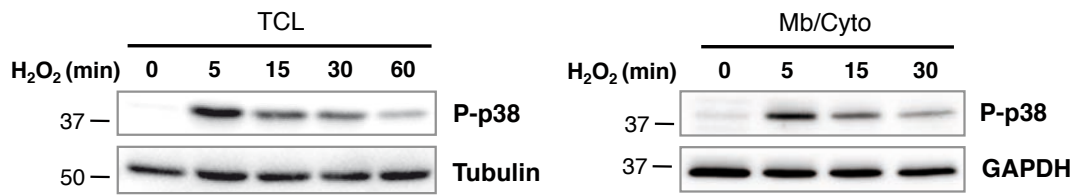
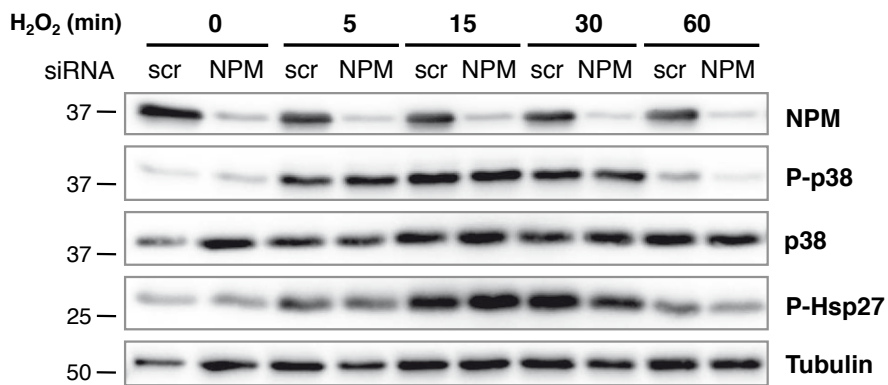


Figure 3-2

A



B



C

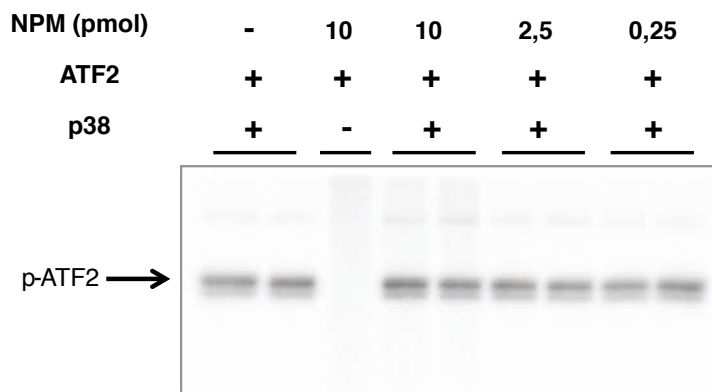
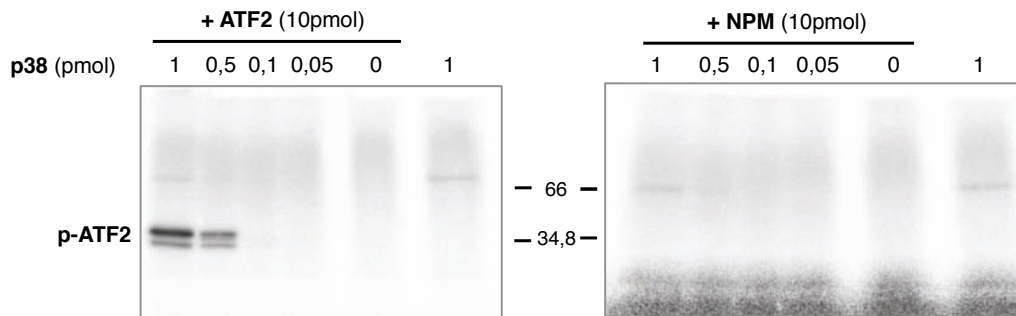
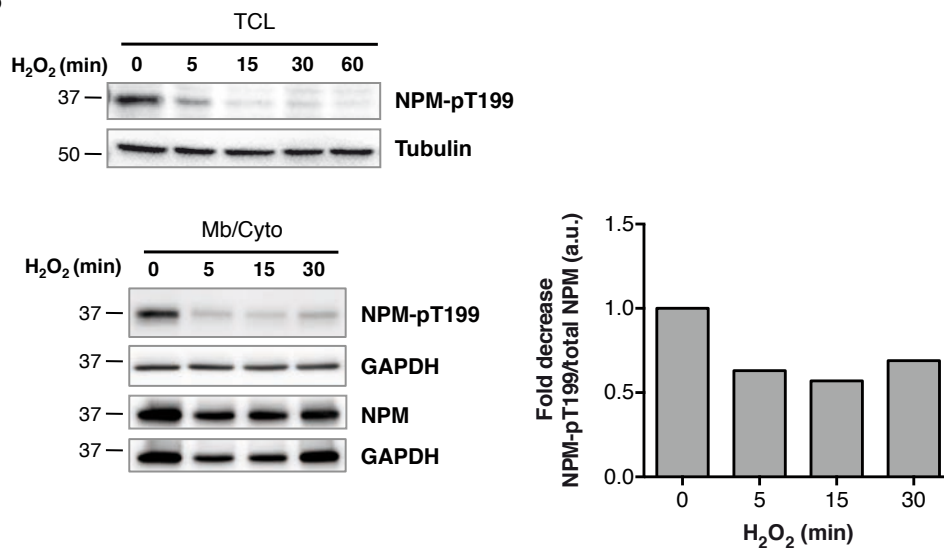


Figure 3-3

A



B



C

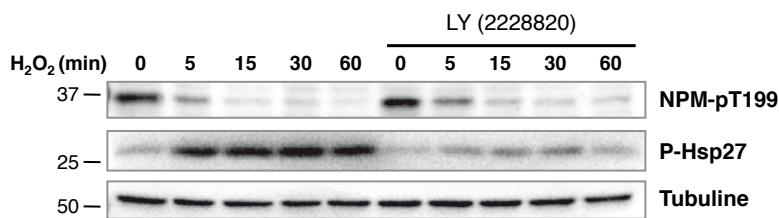


Figure 3-4

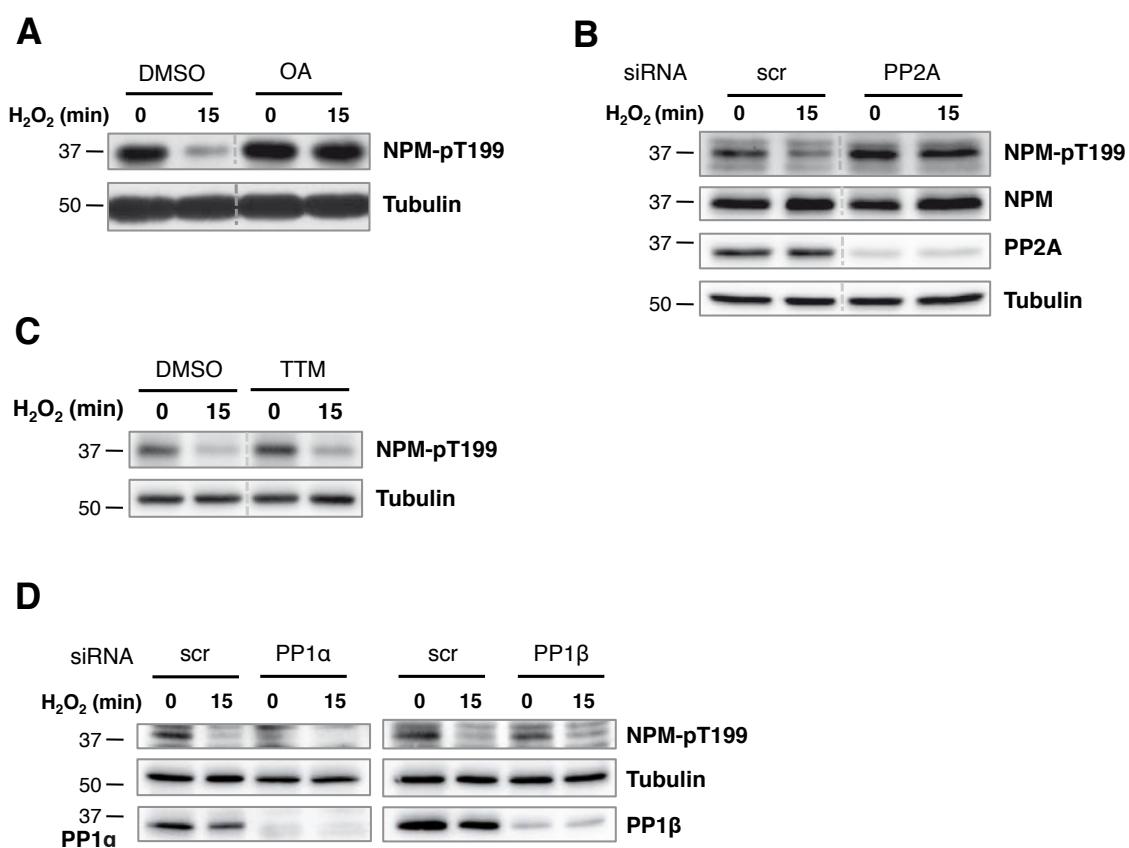
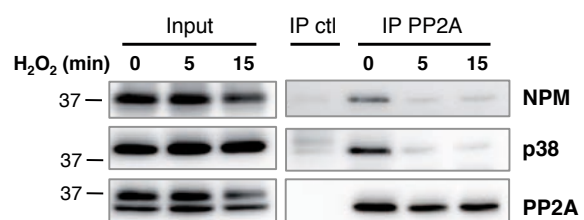


Figure 3-5

A



B

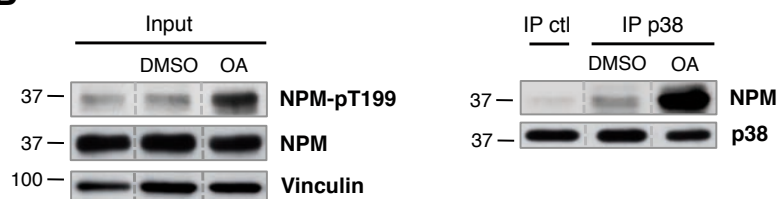
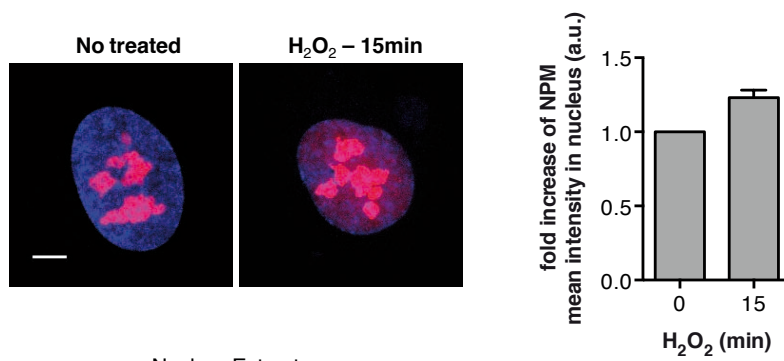
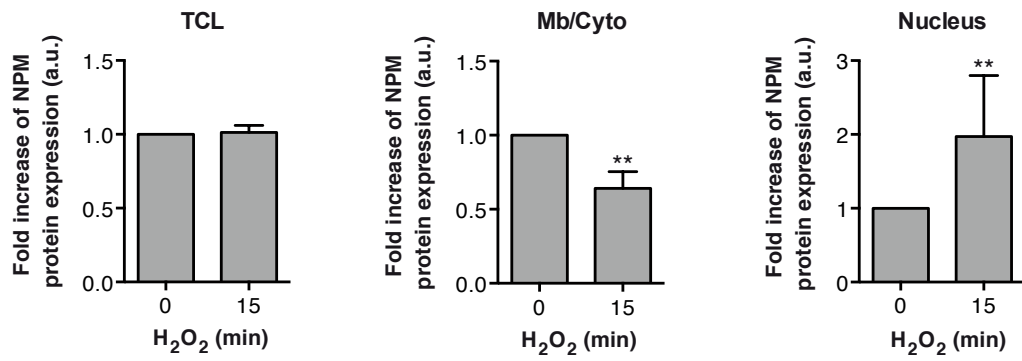
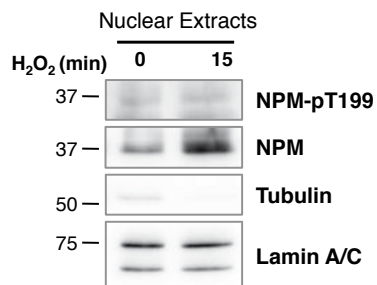


Figure 3-6

A



B



C

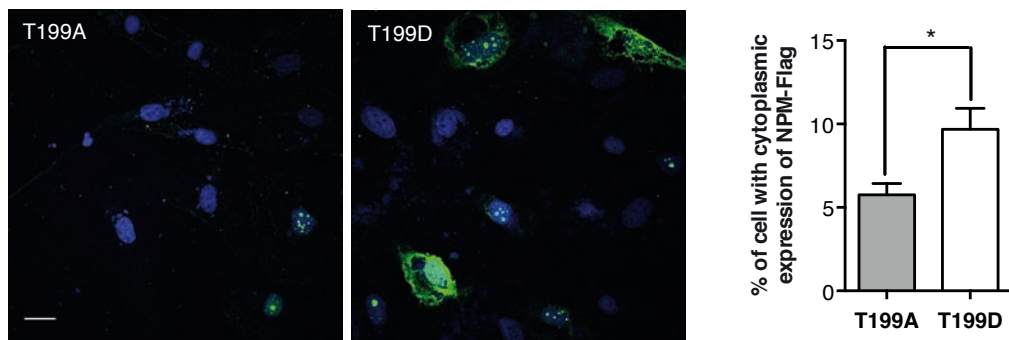


Figure 3-7

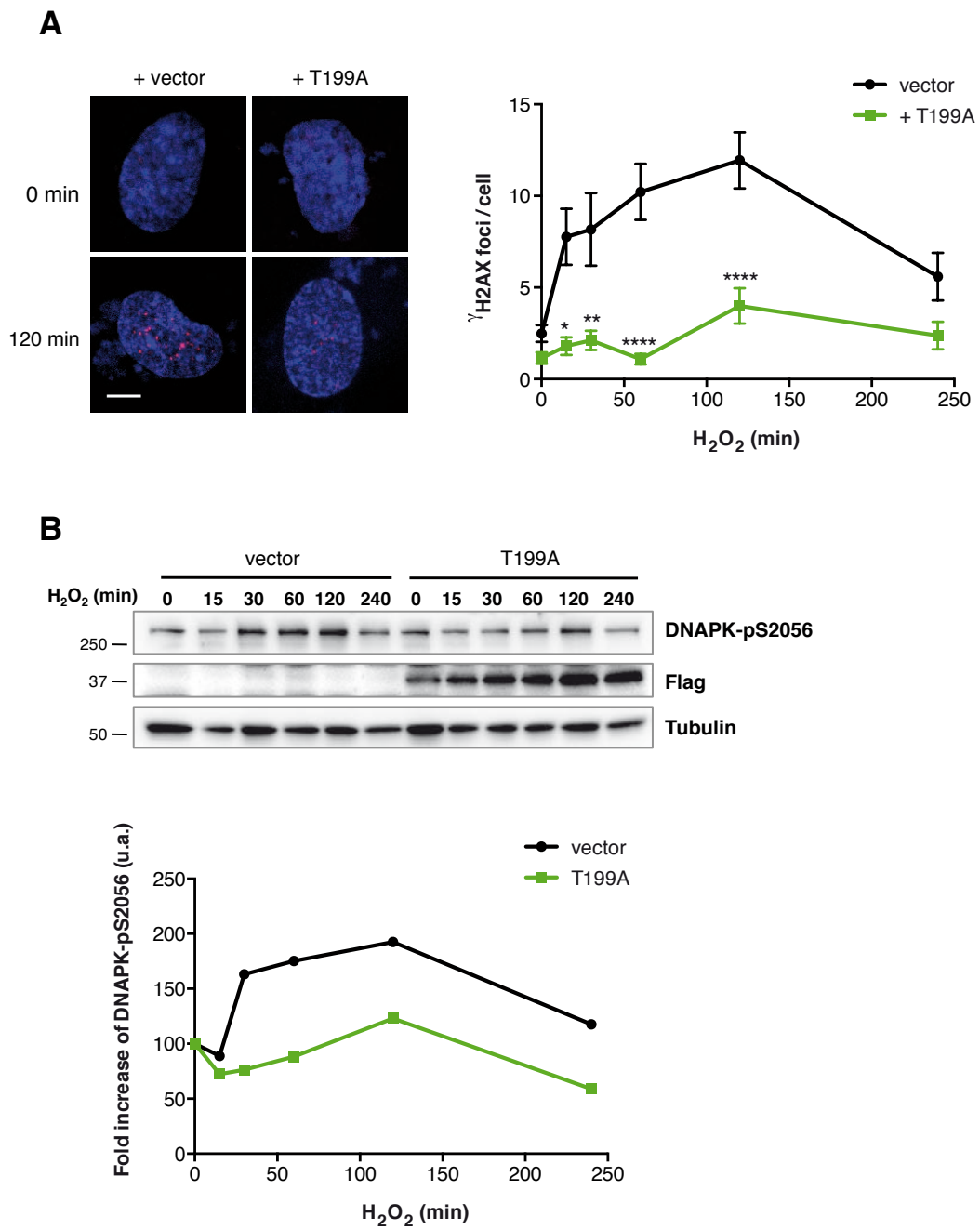
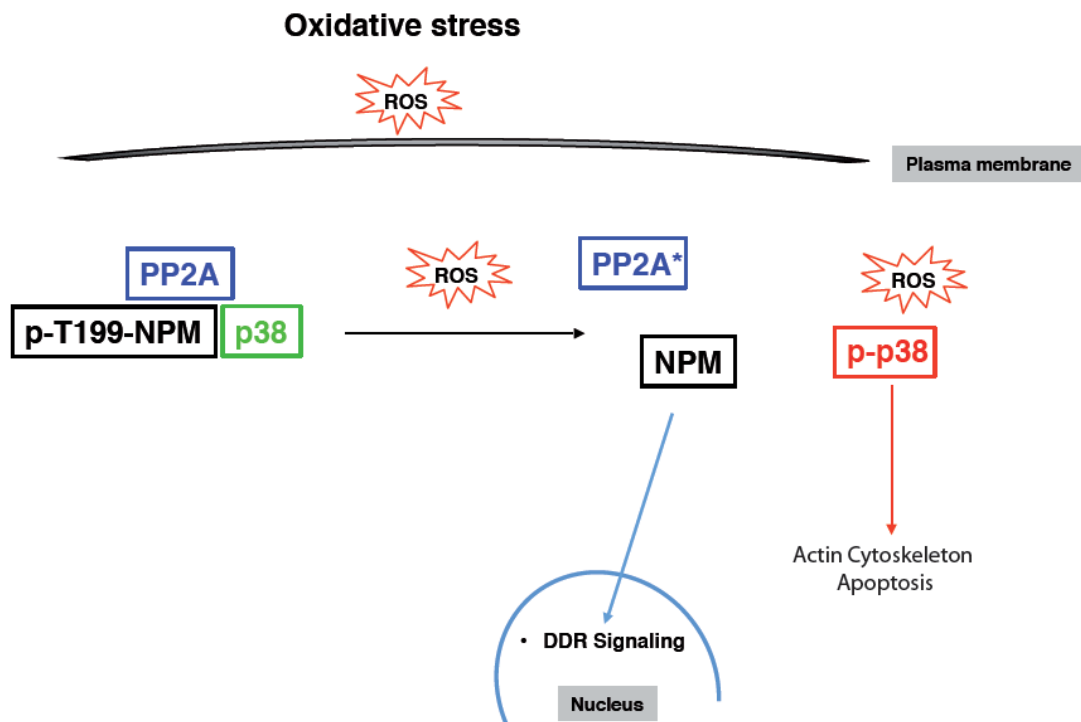
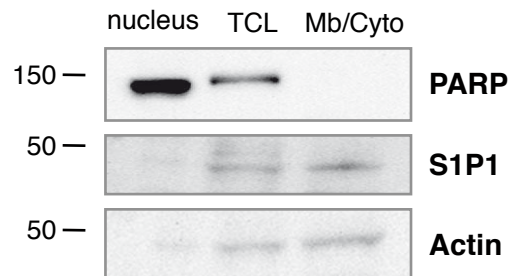


Figure 3-8



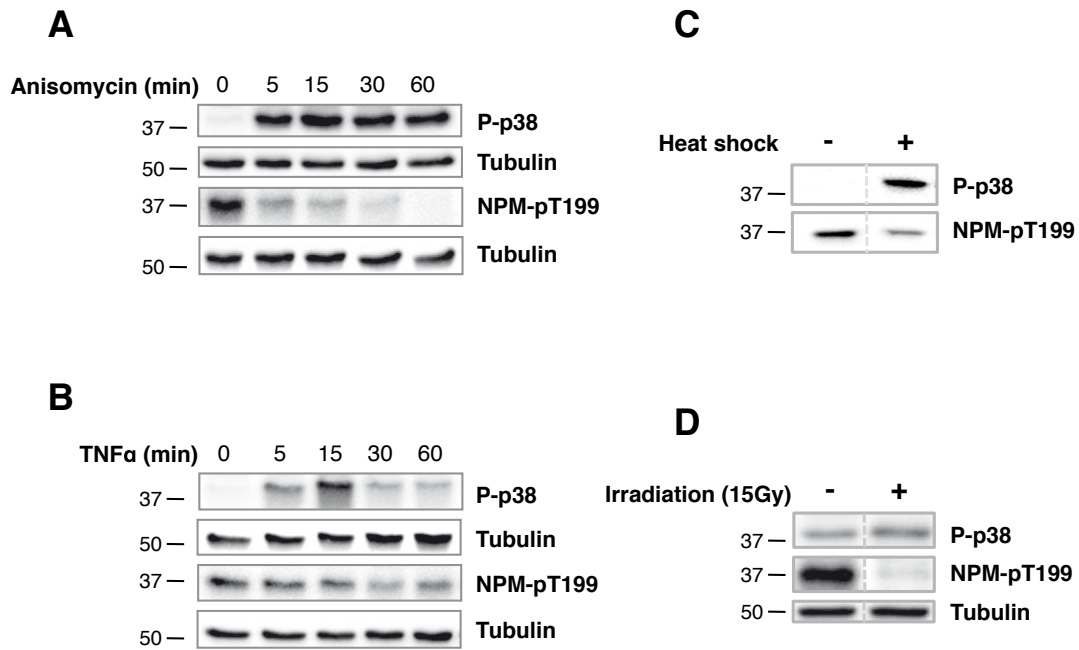
SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figures:



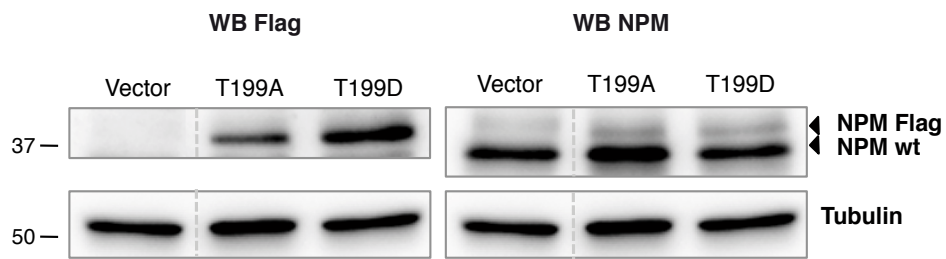
Supplemental Figure S3-1: Quality control of fractionation.

Nucleus, Membrane/Cytosol (Mb/Cyto) and total cell lysates (TCL) extracts of endothelial HMEC-1 cell line were prepared as described in Material and Methods. PARP was used as loading control of nuclear fraction, S1P1 and Actin were used as loading control of Mb/Cyto fractions.



Supplemental Figure S3-2: Dephosphorylation of NPM in response to several stress stimuli

Level of phosphorylation of NPM on Thr199 and phosphorylation of p38 MAPK on Thr180/Tyr182 in total lysates of cells treated with (A) Anisomycin (1μg/ml), (B) TNFα (100ng/ml), (C) Heat shock (37°C to 25°C) and (D) Irradiation (15 Gy). 20 μg of proteins were separated by SDS-PAGE, NPM-pT199 and phospho-p38 MAPK were detected by specific antibodies. Tubulin was used as loading control.



Supplemental Figure S3-3: Expression of NPM T199A and NPM T199D proteins in HUVECs

HUVECs were transfected with control vector or with Flag-tagged T199A-NPM or Flag-tagged T199DNPM plasmids for 24 hours. Endogenous NPM and Flag-tagged-NPM are revealed by Western Blot in total cell lysates with anti-NPM and anti-Flag M2 antibodies, respectively. Tubulin was used as loading control.

Supplementary Methods:

Cell culture and treatments

Human dermal endothelial cell line (HMEC-1) was used for control of fractionation. HUVECs were exposed to 1 μ g/ml Anisomycin (Sigma-Aldrich, France), or 100ng/ml TNF α (PeproTech, France) for various times. Heat shock was obtained by passage from 37°C to 25°C during 12 minutes. Irradiation of HUVECs was carried out in a Faxitron CP160 irradiator (Faxitron X-ray Corporation, Buffalo Grove, USA) at a dose of 15 Gy.

Antibodies

Antibodies used were : anti-actine (C-11) (sc-1615) (Santa Cruz Biotechnology, USA); anti-PARP (AM30 – clone C-2-10) (Calbiochem, France) ; anti-sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1)(PR S4809) (Sigma-Aldrich, France).

V- Conclusion

La voie p38 MAPK (p38) est une voie régulant de nombreuses fonctions. Elle est principalement impliquée dans la transduction de signaux de stress conduisant à l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et / ou la réparation des dommages à l'ADN, en fonction à la fois du contexte cellulaire et des partenaires moléculaires engagés (Cuadrado and Nebreda, 2010; Cuenda and Rousseau, 2007). Le compartiment endothélial est fortement exposé au ROS et son incapacité à faire face de manière appropriée au stress oxydant est associé à des pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose (Madamanchi et al., 2005) et l'hypertension (Javeshghani et al., 2009). Dans cette étude, nous avons cherché à identifier dans les cellules endothéliales de nouveaux partenaires de p38 qui contribuent à la régulation de la réponse au stress oxydant. Nous avons identifié pour la première fois la protéine nucléophosmine NPM comme partenaire membranaire/cytosolique de p38 dans les cellules endothéliales.

Nous avons pu démontrer pour la première fois l'existence d'une interaction NPM/p38 dans le cytoplasme des cellules endothéliales, dissociée en réponse au stress oxydant. Cette interaction dépendante du statut de phosphorylation de NPM sur la thréonine 199, implique la phosphatase PP2a. En effet, nous avons pu démontrer que PP2a permet la déphosphorylation de NPM sur T199 en réponse au stress oxydant, et l'inhibition de PP2a augmentant l'état phosphorylé de NPM sur T199, augmente l'interaction de NPM avec p38. Nous avons également pu mettre en évidence que la déphosphorylation de NPM sur T199 est corrélée à sa translocation au noyau, où NPM déphosphorylée va inhiber l'activation de la DNA-PK et la formation des foyers γ H2AX, protéine impliquée dans la détection des dommages à l'ADN.

Cette étude, nous a permis d'identifier de nouveaux acteurs de la voie p38 MAPK, NPM et PP2a, dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant, et de poser le modèle suivant : le trimère p38/NPMpT199/PP2a existe dans le cytoplasme des cellules endothéliales quiescentes et se dissocie très rapidement en réponse au stress oxydant. Cette dissociation serait concomitante à l'activation de la phosphatase PP2a induisant ainsi la déphosphorylation de NPM. NPM déphosphorylée et libérée du complexe se relocalise au noyau, altérant la réponse aux dommages à l'ADN (Figure 3-8). L'identification du rôle de NPM dans la réponse aux dommages de l'ADN fait de

cette protéine une cible importante dans les cellules endothéliales. En effet, protéger les cellules des dommages induits en favorisant la reconnaissance et la réparation des cassures permettrait de protéger les cellules endothéliales, notamment dans le cadre de radiothérapie.

Partie 4 : Résultats complémentaires

Implication du céramide dans la voie p38 activée par le stress oxydant dans les cellules endothéliales

I- Introduction

La voie de l'acide sphingomyélinase (ASMase) est une voie importante de réponse au stress (Mathias et al., 1998), et plus particulièrement dans les cellules endothéliales (Garcia-Barros et al., 2003; Paris et al., 2001), cellules riches en ASMase (Marathe et al., 1998). L'irradiation à fortes doses et le stress oxydant induisent, dans les cellules endothéliales, l'activation de l'ASMase qui est impliquée dans l'apoptose de ces cellules (Garcia-Barros et al., 2003; Peña et al., 2000; Zhang et al., 2007). Cette activation entraîne la production d'un sphingolipide au niveau de la membrane plasmique, le céramide (Haimovitz-Friedman et al., 1994; Zhang et al., 2007) (Figure 1-16). L'ASMase se trouve localisée initialement dans les lysosomes qui, en réponse à divers stimuli de stress (UV, irradiation, TNF α), peuvent fusionner avec la membrane plasmique provoquant ainsi une relocalisation de l'ASMase au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique où se trouve son substrat, la sphingomyéline (Charruyer et al., 2005; Grassme et al., 2001; Haimovitz-Friedman et al., 1994; Milhas et al., 2010). Les mécanismes d'activation de l'ASMase et de sa translocation à la membrane plasmique par les rayonnements ionisants restent encore mal caractérisés, mais une implication des ROS est souvent suggérée (Li et al., 2012; Zhang et al., 2007). Le céramide généré par l'ASMase joue le rôle de second messenger et induit l'activation de diverses voies de signalisation (Mathias et al., 1998), dont l'activation de cascades de signalisation pro-apoptotiques (Kolesnick and Fuks, 2003). Il est établi que ce sphingolipide induit l'activation de la voie p38 MAPK (p38) conduisant à l'apoptose des cellules leucémiques et lymphocytaires (Chen et al., 2008; Kim et al., 2008; Mondal et al., 2010), mais également à la calcification des cellules musculaires vasculaires (Liao et al., 2013), ainsi qu'à des dysfonctions endothéliales (Schweitzer et al., 2011). La mise en évidence d'une voie céramide/p38 dans la mort des cellules endothéliales exposées aux rayonnements ionisants a fait l'objet de précédents travaux au sein de notre laboratoire mais nécessite encore des études plus approfondies.

p38 est une protéine clé dans la réponse des cellules au stress (Cuadrado and Nebreda, 2010). Cette voie de signalisation est impliquée dans la survie, la différenciation et la mort cellulaire (Zarubin and Han, 2005). De nombreuses études démontrent l'implication de p38 dans l'apoptose, dépendamment du type cellulaire et du stimulus. L'inhibition de p38 protège les cellules endothéliales de l'apoptose induite par les LDL-oxydés (Yin et al., 2013). Activée par le céramide, la voie p38 participe à l'apoptose des cellules leucémiques, dépendante de la voie mitochondriale en favorisant la translocation de Bax à la mitochondrie (Kim et al., 2008). Dans les cellules endothéliales, le céramide et la voie p38 sont aussi impliqués dans l'augmentation de la perméabilité endothéliale suite à l'exposition des cellules à la fumée de cigarette (Schweitzer et al., 2011). Il existe donc une voie céramide/p38 impliquée dans la réponse des cellules au stress. Tel que décrit dans la troisième partie de ce manuscrit, nos travaux ont identifié un nouveau partenaire de p38, la nucléophosmine (NPM), impliquée dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant. Aucune donnée de la littérature n'a établi à ce jour de relation entre la protéine NPM et le sphingolipide céramide.

Dans la présente étude, nous cherchons donc à déterminer l'implication du céramide dans l'activation de la voie p38 induite par le stress oxydant, dans les cellules endothéliales. Dans un modèle de cellules endothéliales HUVEC, nous avons d'abord validé l'existence d'une voie ASMase/céramide. Puis, nous montrons que l'inhibition de cette voie par un inhibiteur fonctionnel de l'ASMase, la désipramine, module l'activation de p38 induite par le stress oxydant. Enfin, nous montrons aussi l'impact de la voie du céramide sur l'interaction NPM/p38, régulée au cours du stress oxydant et impliquée dans la réponse des cellules endothéliales.

II- Matériels et méthodes

Traitement des cellules :

Les cellules HUVEC (Lonza, Suisse) ont été traitées avec 500 μM de peroxyde d'hydrogène (Sigma-Aldrich, France) ou avec 1u/ml d'ASMase placentaire purifiée (Sigma-Aldrich, France) pendant différents temps. Quand cela est indiqué, les HUVEC ont été pré-traitées 2 heures avec un inhibiteur fonctionnel de l'ASMase, la désipramine (5 μM ; Sigma-Aldrich, France).

Anticorps :

Anti-ASMase (#3687) de chez Cell Signaling Technology® (USA).

Dosages des céramides intracellulaires :

Les cellules sont cultivées à 80% de confluence, puis grattées dans deux fois 500 μl de PBS, avant d'être transférées dans des tubes Eppendorfs et centrifugées à 2500 rpm à 4°C durant 5 minutes. Le surnageant est éliminé, et les culots sont conservés à -80°C avant analyse.

Le standard interne (IS) constitué de 40 μl de C17:0 Cer (1 μM), est ajouté dans chaque échantillon. L'extraction des lipides totaux a été réalisée en deux étapes suivant des procédures décrites dans la littérature (Folch et al., 1957; Hara and Radin, 1978). 1,5 ml d'un mélange de hexane/isopropanol (60/40 ; v/v) contenant 0,6% d'acide formique est ajouté dans chaque fraction, puis centrifugé à 3000 rpm à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré dans un tube en verre, puis 1,5 ml de méthanol contenant 0,6 % d'acide formique est ajouté sur le culot. Après centrifugation à 8000 rpm, durant 5 minutes à 4°C, le surnageant est combiné avec celui de la première étape et les lipides totaux sont évaporés à sec sous flux d'azote à température ambiante.

La purification des différentes familles de sphingolipides est réalisée sur des cartouches SPE de type NH_2 (100 mg, Interchim). L'extrait lipidique total est solubilisé dans 150 μl du mélange hexane/isopropanol (60/40 ; v/v) contenant 0,6% d'acide formique, puis déposé sur les colonnes préalablement conditionnées avec 2 ml d'hexane. Les différentes classes de lipides sont isolées en utilisant la méthode décrite par Bodennec *et al.* (Bodennec et al., 2000). Les différentes fractions récupérées sont évaporées à sec sous flux d'azote, avant d'être resolubilisées dans un volume optimisé d'éluant B.

Les céramides sont quantifiés par UHPLC-MS/MS, sur une UPLC Acquity H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, USA) couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle Waters Xevo TQD.

Toutes les analyses ont été réalisées en utilisant l'ionisation par électrospray en mode positive (ESI⁺), et le mode MRM pour permettre de cibler au mieux chaque analyte en une seule analyse.

Les différents céramides sont séparés sur une colonne Waters de type Acquity UPLC BEH C18 (2.1 mm × 50 mm, 1.8- μ m taille des particules), équipée d'une précolonne. La colonne est maintenue à une température de 43°C.

La température du compartiment échantillon est maintenue à 10°C. Les phases mobiles sont constituées par de l'eau (Eluant A), et du méthanol (Eluant B), contenant 1 % d'acide formique et 5 mM de formiate d'ammonium. Le volume d'injection est de 5 μ l. Les céramides purifiés sont élués à l'aide d'une méthode comportant plusieurs gradients (confère tableau).

Composé	Temps (min)	Débit (mL/min)	Eluant A (%)	Eluant B (%)
Cer	0	0,6	5	95
	4	0,6	2	98
	4,1	0,6	5	95
	6	0,6	5	95

Les résultats sont collectés par le logiciel Mass Lynx (version 4.1), tandis que l'intégration et la quantification sont réalisées à partir du logiciel TargetLinxTM (Waters, Manchester, UK).

III- Résultats

1- Le stress oxydant induit la génération de céramide dans les cellules endothéliales

Dans un premier temps, nous avons validé l'expression protéique de l'ASMase dans les cellules HUVEC (**Figure 4-1**). Dans les lysats totaux contenant tous les compartiments intracellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries, membranes et noyau), 3 formes sont détectées dont une forme majoritaire à 65 kDa. Cette forme est aussi retrouvée très exprimée dans la fraction enrichie en membrane/cytosol et correspond à la forme L-ASMase (ou forme lysosomale de l'ASMase) (Jenkins et al., 2011).

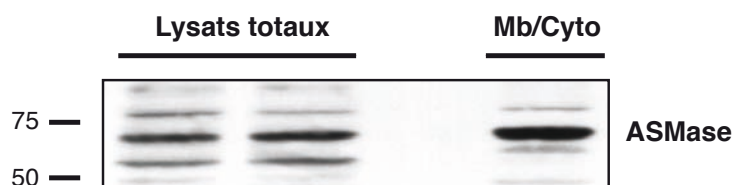


Figure 4-1 : Les cellules HUVEC expriment l'ASMase dans les fractions enrichies en membranes/cytosol.

30 μg de lysats totaux et 40 μg de fractions enrichies en membranes/cytosol (Mb/Cyto) ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE. Après transfert sur membrane de PVDF, l'ASMase a été détectée spécifiquement par Western Blot avec un anticorps anti-ASMase.

Afin de savoir si l'ASMase exprimée dans les HUVEC peut être activée par le stress oxydant, la présence et la production de céramide dans les cellules endothéliales traitées par l'ASMase ou H_2O_2 ont été déterminées par un dosage UPLC-ESI-MS/MS des céramides intracellulaires. L'activation de la voie ASMase entraîne la production de céramide par hydrolyse de la sphingomyéline (SM). Dans les cellules endothéliales, les formes de sphingomyéline majoritairement retrouvées au niveau des membranes sont la C16-SM, C18-SM, C24-SM et C24:1-SM (Paris F., données personnelles). L'identification et la quantification des céramides ont été faites sur des extraits lipidiques purifiés obtenus à partir de $1,5 \cdot 10^6$ cellules HUVEC. En condition basale et après 2 minutes de stimulation par 1u/ml d'ASMase placentaire purifiée, mais également après 30 secondes de traitement au H_2O_2 500 μM , différents types de céramides sont détectés dans les HUVEC (**Figure 4-2A**). La stimulation par l'ASMase

exogène induit une augmentation rapide dès 2 minutes de toutes les formes de céramide présentes (**Figure 4-2A**). Nous détectons 4 formes majoritaires : C16, C18, C24:1 et C24 qui reflètent l'hydrolyse des sphingomyélines majoritaires des cellules endothéliales. Le C18 ne varie pas, alors que les 3 autres formes augmentent transitoirement et diminuent très rapidement dès 5 minutes de stimulation (**Figure 4-2B**). Le traitement par H₂O₂ induit également une augmentation de toutes les formes de céramides présentes dès 30 secondes de traitement (**Figure 4-2A**), dont les 4 formes majoritaires : C16, C18, C24:1 et C24. Le céramide C18 varie très peu. Mais comme pour le traitement par l'ASMase nous observons une augmentation des 3 autres formes également transitoire avec une diminution rapide dès 2 minutes de traitement (**Figure 4-2B**). Le stress oxydant induit donc une génération rapide et transitoire d'environ 20% des formes C16, C24:1 et C24 dans les cellules endothéliales.

A

Céramides	C14	C16:1	C16	C18:1	C18	C20:1	C20	C22:1	C22	C24:1	C24	Quantité totale (pmol)
Contrôle	1,25	0,25	20,1	0,2	23,4	0	0,75	0,5	5,15	26,6	25,55	103,75
ASMase (2min)	1,95	0,35	27,9	0,3	23,2	0	0,9	0,85	7,15	37,4	36,15	136,15
H ₂ O ₂ (30sec)	1,55	0,4	26,15	0,3	24,2	0	0,8	0,7	5,65	32,55	30,35	122,65

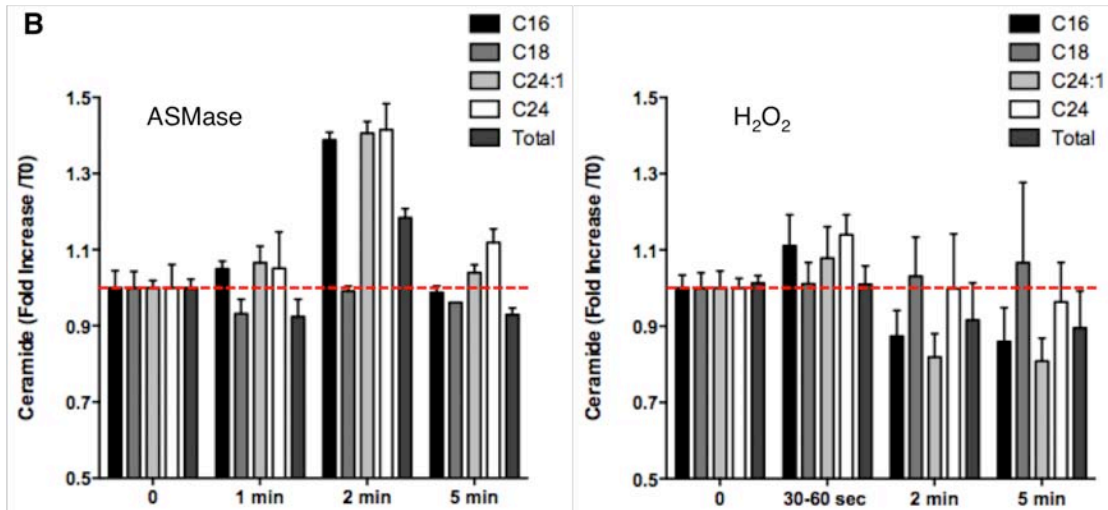


Figure 4-2 : Le traitement des cellules HUVEC par l'ASMase ou par H₂O₂ entraînent la production de céramides intracellulaires.

(A) Différents types de céramides sont détectés dans les cellules HUVEC en condition basale et après 2 minutes de stimulation par 1u/ml d'ASMase ou 30 secondes de H₂O₂ 500 μM. L'identification et la quantification des différents types de céramides (en fonction de la nature de la chaîne grasse) ont été réalisées sur les extraits lipidiques purifiés à partir de lysat d'HUVEC traitées ou non. (B) Représentation graphique du pourcentage d'augmentation des céramides majoritaires en fonction du temps de stimulation par l'ASMase (1 u/ml) ou H₂O₂ (500 μM). Une expérience en duplicata.

2- L'activation de p38 en réponse au stress oxydant est dépendante de la voie ASMase/céramide

En réponse au traitement des cellules HUVEC au H₂O₂ (500µM), on détecte une phosphorylation de p38 dès 5 minutes (**Figure 4-3A**). Cette activation de p38 est également induite par l'ajout d'ASMase exogène avec une phosphorylation rapide de p38 également dès 5 minutes de traitement (**Figure 4-3B**), suggérant que le céramide produit par la ASMase active la voie p38. Pour confirmer cette implication du céramide dans l'activation de p38 en réponse au stress oxydant, les cellules HUVEC ont été pré-traitées avant l'ajout de H₂O₂ (500µM) avec un inhibiteur de l'ASMase, la désipramine. La désipramine, via ses groupements cationiques, favorise le détachement de l'ASMase des lipides de la face interne de la membrane lysosomale, entraînant ainsi son accumulation et sa dégradation dans le lysosome (Kornhuber et al., 2011).

Comme nous avons pu l'observer dans la figure 4-3A, le traitement au H₂O₂ induit la phosphorylation de p38, mais l'inhibition de l'ASMase altère fortement cette phosphorylation (**Figure 4-3C**). Ainsi, la phosphorylation et l'activation de p38 induite par le stress oxydant sont inhibées par l'utilisation d'un inhibiteur de l'ASMase, confirmant l'implication du céramide dans l'activation de p38.

3- La voie ASMase/céramide module l'interaction NPM/p38 dans les cellules endothéliales

Les travaux décrits dans la troisième partie de cette thèse ont démontré dans les cellules endothéliales une interaction NPM/p38 impliquée dans la réponse au stress oxydant. Nous avons mis en évidence que cette interaction existe à l'état basal et qu'elle se dissocie très rapidement en réponse au stress oxydant. Le pré-traitement des cellules HUVEC avec la désipramine réduit cette dissociation du complexe NPM/p38 induite par le stress oxydant (**Figure 4-4**). Si le céramide est impliqué dans l'activation de p38, il l'est également dans la dissociation du complexe NPM/p38 dans les cellules endothéliales en réponse au stress oxydant.

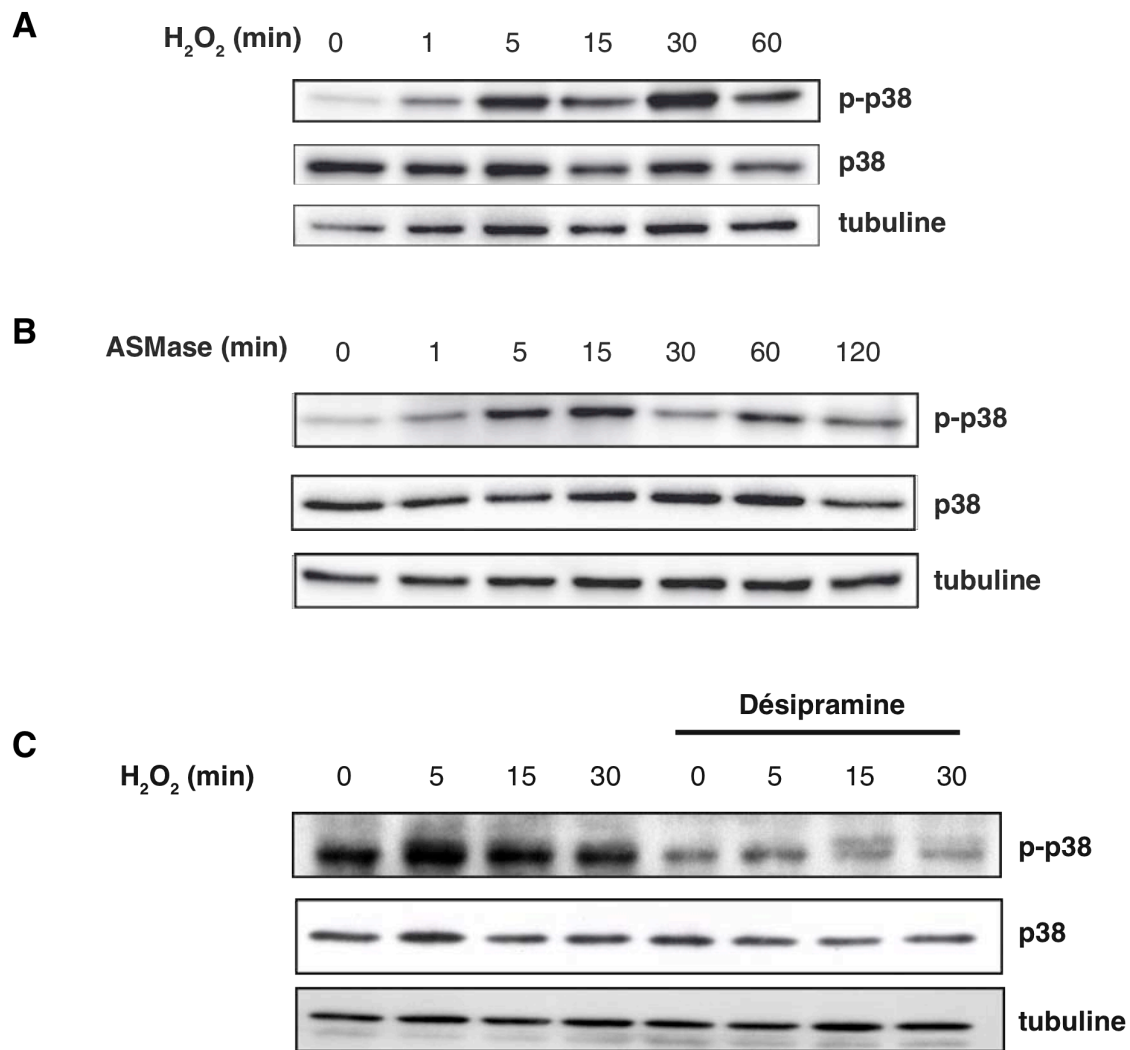


Figure 4-3 : L'ASMase, comme le stress oxydant, induit la phosphorylation de p38. L'inhibition de l'ASMase diminue fortement l'activation de p38 par le stress oxydant.

Les cellules HUVEC sont traitées (A) par H₂O₂ à 500 μM, (B) par l'enzyme ASMase placentaire purifiée active (1u/ml) ou (C) pré-traitées 2 heures avec 5 μM de désipramine avant d'être stimulées par H₂O₂ à 500 μM. Les lysats totaux sont préparés et séparés par électrophorèse SDS-PAGE. La protéine p38 phosphorylée sur Thr180/Tyr182 est détectée par Western Blot. La quantité de p38 totale est aussi analysée. La tubuline est utilisée comme contrôle de charge.

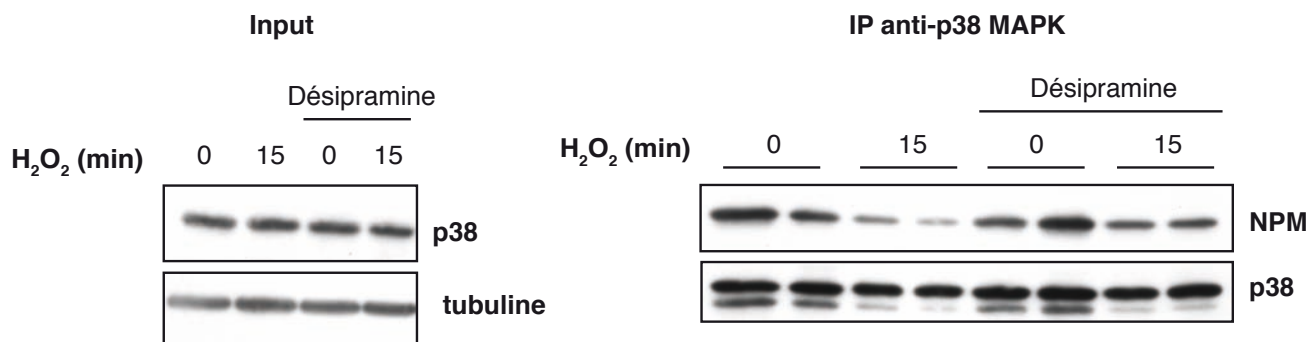


Figure 4-4 : Le complexe NPM/p38 présent dans les cellules HUVEC à l'état basal diminue rapidement en condition de stress oxydant. L'inhibition de l'ASMase bloque cette dissociation.

Les cellules HUVEC sont pré-traitées ou non avec la désipramine 5 μ M pendant 2 heures. Puis, elles sont traitées ou non avec H_2O_2 à 500 μ M pendant 15 minutes. Une immunoprécipitation anti-p38 est réalisée à partir de 400 μ g de lysats totaux. Après séparation par électrophorèse SDS-PAGE et transfert sur membrane de PVDF, la protéine NPM présente dans les immunoprécipitats de p38 est révélée par Western Blot. La quantité de p38 est vérifiée dans l'immunoprécipitation, ainsi que dans les inputs où la tubuline est utilisée comme contrôle de charge.

IV- Discussion

Les cellules endothéliales sont fréquemment exposées à des stress environnementaux auxquels elles s'adaptent grâce à l'activation de voies de signalisation (Alom-Ruiz et al., 2008) telles que la voie p38 (Houle and Huot, 2006) et la voie du céramide (Zhang et al., 2007). Cela est d'autant plus vrai dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant, tel que celui induit par l'irradiation (Garcia-Barros et al., 2003; Haimovitz-Friedman et al., 1994). Dans notre étude, nous avons pu démontrer que la voie du céramide activée dans les cellules endothéliales en réponse au stress oxydant est également impliquée dans l'activation de la voie p38.

Nous avons montré que l'ASMase exprimée par les cellules endothéliales permet la génération de céramide en réponse au stress oxydant. La participation des ROS dans le mécanisme d'activation de l'ASMase a déjà été suggérée. En effet, l'utilisation d'antioxydants limite l'activation et la translocation à la membrane plasmique de l'ASMase dans des cellules endothéliales irradiées (Corre et al., 2013). Dans un autre modèle cellulaire, des lymphocytes T immortalisés, il a été mis en évidence que la translocation de l'ASMase par la fusion des lysosomes avec la membrane plasmique implique les ROS (Li et al., 2012). L'activation de l'ASMase s'effectuant très rapidement, il est également possible que les ROS agissent directement sur l'enzyme. En effet, les ROS peuvent réguler de nombreuses protéines en induisant leur oxydation principalement au niveau des cystéines (Holmström and Finkel, 2014; Kim et al., 2015). L'ASMase possède en C-terminal une cystéine (Cys629) dont le statut d'oxydation a été démontré comme impliqué dans l'activation de l'enzyme (Qiu et al., 2003).

Le céramide ainsi généré par l'ASMase joue le rôle de second messenger et peut induire de nombreuses voies de signalisations intracellulaires (Gulbins and Kolesnick, 2003). Nos résultats montrent que l'inhibition de l'ASMase dans les cellules endothéliales conduit à une forte diminution de la phosphorylation de p38 en réponse au stress oxydant, mettant en évidence une voie ceramide/p38 induite par le stress oxydant. Il nous reste encore à déterminer comment la voie p38 est activée par le céramide en réponse au stress oxydant. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées. Le céramide peut réguler des protéines d'activation de p38. En effet, le céramide favorise l'activation de la protéine Ask1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*) (Chen et al., 2008) via

l'expression de la protéine Txnip (*Thioredoxin-interacting protein*) protéine inhibant la thioredoxine, elle-même inhibitrice d'Ask1. Ask1 est une MAPKKK (*Mitogen activated protein kinase kinase kinase*) permettant le phosphorylation et l'activation de MKK3 et 6, principales kinases activatrices de p38 (Cuadrado and Nebreda, 2010). Le céramide favorise l'agglutination des micro-domaines lipidiques pour former de grandes plateformes membranaires riches en céramides (Kolesnick et al., 2000). Cette réorganisation de la membrane plasmique est connue pour favoriser l'induction et la transmission des signaux intracellulaires (Cremesti et al., 2002). Il est donc envisageable, que des récepteurs membranaires activant p38, comme le récepteur au VEGF (Rousseau et al., 1997), au TNF α et à l'IL-1 (Cuenda and Rousseau, 2007) puissent se localiser au niveau de ces plateformes et induire l'activation de p38. De plus, au niveau des cellules endothéliales, cette réorganisation de la membrane plasmique favorise la production de ROS en permettant la formation et l'activation du complexe NOX (NADPH oxydase) (Zhang et al., 2007). Cette amplification de la production de ROS via les plateformes « Redox » enrichies en céramide peut aussi participer à l'activation de la voie p38 (Son et al., 2013).

Comme nous l'avons vu dans la troisième partie de ce travail de thèse, nous avons montré que p38 interagissait dans les cellules endothéliales avec la protéine NPM. Cette interaction existe à l'état basal dans le cytoplasme des cellules endothéliales et se dissocie rapidement après stress oxydant. Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la voie ASMase/céramide est aussi impliquée dans la régulation du complexe NPM/p38 dans les cellules endothéliales. En effet, l'inhibition de l'ASMase empêche la dissociation des partenaires en réponse au stress oxydant. La dissociation du complexe NPM/p38 en réponse au stress oxydant nécessite la déphosphorylation de NPM par la phosphatase PP2a. Cette protéine est une serine/thréonine phosphatase dont l'activité est hautement régulée via les sous unités régulatrices déterminant la spécificité du substrat (Janssens and Goris, 2001). Si peu de cibles du céramide sont encore formellement identifiées, les phosphatases CAPP (*Ceramide-activated protein phosphatase*) (Mathias et al., 1998), qui sont des phosphatases de la famille de PP2a, sont à ce jour clairement connues comme étant activées par le céramide (Oaks and Ogretmen, 2014), Il est donc possible, que la génération de céramide en réponse au stress oxydant induise l'activation de la phosphatase PP2a responsable de la déphosphorylation de NPM favorisant ainsi la dissociation du complexe NPM/p38. Cette hypothèse fera l'objet d'une nouvelle étude.

Le rôle du céramide dans la réponse au stress oxydant via son implication dans l'activation de la voie NPM/p38 est donc aussi à prendre en compte dans le développement des thérapies ciblant la voie ASMase/céramide via les inhibiteurs de l'ASMase (Kornhuber et al., 2010). En effet, comme nous venons de le voir, l'inhibition de la voie du céramide conduit également à l'inhibition de p38 et de la voie NPM/p38. Nous avons mis en évidence un rôle de NPM dans la réponse aux dommages de l'ADN. Il serait opportun de déterminer si cette réponse de la cellule endothéliale au stress oxydant implique aussi le céramide. Ainsi, une meilleure compréhension de la voie céramide/p38/NPM pourrait conduire à mieux cibler les acteurs impliqués dans la dysfonction endothéliale afin de modérer les effets délétères du stress oxydant sur ce compartiment cellulaire et sur les tissus avoisinants qu'il irrigue.

Discussion générale

La dysfonction endothéliale induite par le stress oxydant joue un rôle clé dans l'induction de pathologies telles que l'athérosclérose et l'hypertension (Madamanchi et al., 2005). Dans le cadre de la radiothérapie, la dysfonction endothéliale est également impliquée dans la réponse des tissus à l'irradiation. La protection des cellules endothéliales de l'apoptose radio-induite protège les tissus des effets délétères de l'irradiation (Garcia-Barros et al., 2003; Paris et al., 2001). Comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant reste un enjeu majeur pour limiter les altérations de l'endothélium et protéger les tissus de la radio-toxicité.

Ce travail de thèse avait pour objectif général de mieux comprendre le rôle de la voie p38 MAPK dans les cellules endothéliales soumises à un stress oxydant massif mimant celui généré par les radiations ionisantes. Au vu de la complexité de cette voie, nous avons cherché à déterminer les partenaires moléculaires de p38 pouvant contribuer à la régulation de la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant.

Identification de la nucléophosmine comme nouveau partenaire de p38

- Implication de l'interaction NPM/p38 dans la réponse au stress oxydant

Notre étude a mis en évidence pour la première fois une interaction entre la protéine NPM et p38 dans le cytoplasme des cellules endothéliales. La protéine NPM est une protéine principalement décrite au niveau des nucléoles. C'est une ribonucléoprotéine capable de se lier à l'ADN, l'ARN et aux histones (Okuwaki, 2008). Elle est essentielle à la biogénèse des ribosomes et à la stabilité du génome (Lindström, 2011). Cependant, la présence de séquences NES (*Nuclear Export Signal*) et NLS (*Nuclear Localisation Signal*) dans sa structure (Okuwaki, 2008) lui confère la possibilité de transiter entre le noyau et le cytoplasme. Peu de travaux décrivent les fonctions cytoplasmiques de NPM. Néanmoins, il est bien connu que NPM régule la duplication des centrosomes (Tokuyama et al., 2001). De plus, dans le cas des leucémies myéloïdes aiguës, un tiers des patients présentent une localisation aberrante de NPM au cytoplasme (Falini et al., 2005). Cette localisation cytoplasmique conduit à

une localisation anormale des protéines partenaires de NPM, altérant leurs fonctions biologiques (Falini et al., 2009). C'est le cas pour la protéine Arf19 (Colombo et al., 2006) et le facteur de transcription NF- κ B (Cilloni et al., 2008) dont la localisation cytoplasmique conduit à leur inactivation. NPM cytoplasmique joue donc un rôle important dans la régulation de nombreuses protéines partenaires. Il a aussi été démontré l'implication de NPM dans la régulation de voies de signalisation intracellulaires. C'est le cas notamment dans les cascades MAPK. NPM est décrite comme favorisant la stabilisation de la protéine K-Ras à la membrane, améliorant la transduction du signal (Inder et al., 2009). De même, NPM régule la voie ERK1/2 en réponse à l'EGF dans les cellules de cancer de prostate (Loubeau et al., 2014). La découverte de NPM en association avec p38 MAPK dans le cytoplasme suggère une possible implication de NPM dans la régulation de la voie p38.

En réponse au stress oxydant, p38 est rapidement phosphorylée permettant son activation. La localisation de p38 joue par ailleurs un rôle dans la régulation de la voie en permettant l'accès à certains de ses substrats (Cuadrado and Nebreda, 2010). En effet, p38 inactive est préférentiellement localisée au cytoplasme. En réponse à divers stimuli, p38 activée transloque au noyau (Wood et al., 2009). Cependant, p38 ne possède pas de séquence de localisation nucléaire NLS. La translocation nucléaire de p38 nécessite donc l'intervention de protéines partenaires telles que les importines ou des protéines ayant une séquence NLS (Cuadrado and Nebreda, 2010). NPM est une protéine chaperonne permettant de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau grâce à ses séquences NES et NLS (Okuwaki, 2008). Une étude a pu mettre en évidence que NPM facilite la translocation nucléaire du facteur de transcription STAT3 activé (Ren et al., 2014). L'ensemble de ces données suggère un rôle possible de NPM dans la localisation au noyau de p38 activée. Nos travaux ont montré que l'interaction NPM/p38 existe à l'état basal et qu'elle se dissocie très rapidement en réponse au stress oxydant, condition où la phosphorylation de p38 est induite. Il semble donc que NPM interagisse plutôt avec la forme inactive de p38 et non avec la forme active phosphorylée de p38, ce qui reste à vérifier. De plus, la présence de NPM n'influence ni l'activité kinase de p38, ni sa phosphorylation. NPM n'est donc pas impliquée dans l'activité de p38, contrairement à sa capacité d'activer d'autres kinases dont la kinase Aurora A (Reboutier et al., 2012). Au vu de nos résultats, NPM ne semble donc pas impliquée dans la régulation de la voie p38.

NPM possède de nombreux sites de phosphorylation qui régulent ses fonctions et sa localisation (Okuwaki, 2008). Nous avons pu montrer que, dans les cellules endothéliales, NPM est phosphorylée sur le thréonine 199 (T199) à l'état basal. Cette phosphorylation de NPM sur T199 est impliquée dans la régulation de certaines de ses fonctions comme la duplication des centrosomes (Tokuyama et al., 2001) et la réparation des dommages à l'ADN (Koike et al., 2010). NPM possède également d'autres sites de phosphorylation tels que la thréonine 95 située au niveau du NES, dont la phosphorylation régule la localisation de NPM (Wang et al., 2005). Il a déjà été démontré que NPM interagit avec des serine/thréonine kinases, telles que Aurora A, Aurora B (Shandilya et al., 2014) et TPL2 (Kanellis et al., 2014), impliquées dans sa phosphorylation et sa régulation. De plus, il a été montré que p38 était impliquée dans la régulation d'une autre ribonucléoprotéine, la protéine hnRNPA1 (Shimada et al., 2009). Il est donc possible que les fonctions de NPM soient régulées par p38. Or, nos résultats d'essai kinase *in vitro* démontrent que p38 ne phosphoryle pas NPM. NPM n'est donc pas un substrat de p38. Cependant, une étude *in silico* a pu identifier la T95 de NPM comme site potentiel de phosphorylation par p38. Il est donc envisageable que la phosphorylation de NPM par p38 nécessite l'intervention de co-facteurs, non présents dans l'essai kinase *in vitro*.

Nous avons également pu mettre en évidence que NPM phosphorylée sur T199 dans les cellules endothéliales est rapidement déphosphorylée en réponse au stress oxydant. Cette déphosphorylation est concomitante à l'activation de p38 en réponse au stress oxydant. Cependant, l'inhibition de l'activité kinase de p38 ne modifie pas le statut de phosphorylation de NPM sur T199. L'activité kinase de p38 n'intervient donc pas dans la régulation du statut de phosphorylation de NPM sur T199. Une étude a déjà décrit un rôle de p38 indépendant de son activité kinase (Fan et al., 2005). Il est possible que l'interaction de p38 avec NPM masque un des signaux NLS de NPM, empêchant ainsi sa localisation nucléaire et par conséquent ses fonctions nucléaires. Une perspective très intéressante serait de caractériser précisément le site d'interaction des protéines p38 et NPM.

La protéine p38 est une protéine très abondante dans les cellules et elle est principalement localisée au niveau du cytoplasme sous sa forme inactive (Cuadrado and Nebreda, 2010). NPM est une protéine également abondante, mais principalement

localisée au noyau (Okuwaki, 2008). Si nous montrons une association de NPM avec p38 dans le cytoplasme, il est probable que tout le pool de p38 cytoplasmique ne soit pas lié à NPM. Notre hypothèse actuelle est que la cellule posséderait un pool de p38 libre rapidement activable en réponse au stress oxydant. Ce pool permettrait alors la transduction de signaux intracellulaires. Cette hypothèse est aussi supportée par le fait que l'activation de p38 n'est pas dépendante de NPM. Les protéines p38 liées à NPM joueraient alors le rôle de protéines d'échafaudage permettant de maintenir un pool disponible de NPM au cytoplasme à proximité de partenaires cytoplasmiques.

- Importance du statut de phosphorylation de NPM dans l'interaction NPM/p38 et dans la translocation nucléaire de NPM

Interaction NPM/p38

Nos résultats montrent le rôle important du statut de phosphorylation de NPM sur T199 dans le cytoplasme des cellules endothéliales en réponse au stress oxydant. Le pool de NPM cytoplasmique est phosphorylé à l'état basal puis déphosphorylé en réponse au stress oxydant via la phosphatase PP2a. L'interaction NPM/p38 présente en condition basale est diminuée après stress oxydant, condition où NPM est déphosphorylée. Il semble donc logique de penser que la forme phosphorylée de NPM soit la forme préférentiellement associée à p38. Cette évidence est supportée par le fait que l'augmentation de NPM phosphorylée sur T199 par l'inhibition de PP2a augmente l'interaction de NPM avec p38.

La phosphatase PP2a interagit avec NPM et p38 à l'état basal et se dissocie très rapidement en réponse au stress oxydant, de façon concomitante à la déphosphorylation de NPM. Nous pouvons donc penser que la PP2a soit associée sous forme inactive au complexe NPM/p38, puis qu'elle soit activée par le stress oxydant, déphosphorylant ainsi NPM.

p38 et PP2a

La déphosphorylation de NPM sur T199 induite par la phosphatase PP2a semble jouer un rôle important dans l'interaction NPM/p38 et dans la translocation de NPM au noyau. La PP2a est une holoenzyme composée de 3 sous-unités (catalytique, régulatrice, scaffold) et sa localisation subcellulaire détermine la spécificité du substrat (Janssens and Goris, 2001). Le rôle de p38 dans la localisation de PP2a a précédemment été décrit.

Il a notamment été démontré que p38 régule la localisation subcellulaire de PP2a dans des cardiomyocytes invalidés pour p38 (Zuluaga et al., 2007). Dans ces cellules, PP2a est principalement localisé non plus au cytoplasme mais au noyau. Dans notre contexte, p38 pourrait stabiliser la formation du complexe NPM/PP2a au niveau du cytosol. p38 jouerait ainsi un rôle de protéine d'échafaudage pour NPM phosphorylée sur T199 et PP2a, fonction indépendante de son activité kinase et cohérente avec nos résultats montrant que l'activité kinase de p38 n'affecte pas la phosphorylation de NPM.

Cependant, le rôle du stress oxydant dans la régulation de PP2a reste encore mal compris. Certaines études décrivent une inhibition de la PP2a par le stress oxydant (Jin Jung et al., 2013; Rao and Clayton, 2002) corrélée à une activation de p38 en réponse à divers stress (Chen et al., 2009; Lee et al., 2003; Lin et al., 2012). Or, nos résultats indiquent une activation de la PP2a ainsi qu'une activation de p38 en réponse au stress. De plus, des expériences préliminaires d'inactivation de PP2a dans les cellules endothéliales HUVEC montrent que l'absence de PP2a ne modifie pas le profil d'activation de p38 en réponse au stress oxydant. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études démontrant une activation des phosphatases en réponse aux UV (Herman et al., 2002). Il a notamment été démontré que PP2a est activée en réponse à divers stress (Arora et al., 2014; Maalouf and Rho, 2008), et plus particulièrement dans les cellules endothéliales en réponse au TNF α (Grethe and Pörn-Ares, 2006) et au H₂O₂ (Cicchillitti et al., 2003). De plus, quelques études ont montré un lien entre p38 et l'activation de la PP2a dans la régulation de voies de signalisation induites par le stress. C'est le cas pour l'inhibition de la voie de survie ERK qui est dépendante de l'activation de PP2a impliquant p38, démontré dans différents types cellulaires en réponse à divers stress (Gardai et al., 2004; Grethe and Pörn-Ares, 2006; Liu and Hofmann, 2004; Westermarck et al., 2001). Il est donc essentiel aujourd'hui de démontrer formellement l'activation de PP2a dans les cellules endothéliales en réponse au stress oxydant.

Les effets opposés du stress oxydant sur la PP2a dépendent probablement du système considéré. Le stress oxydant peut conduire à l'oxydation des cystéines du site catalytique des phosphatases et conduire à leur inhibition (Valko et al., 2006). Mais comme nous venons de le voir ci-dessus, le stress oxydant peut également conduire à leur activation. Il est possible que le stress oxydant puisse réguler des acteurs de l'activation de PP2a. La PP2a fait partie de la famille des CAPP (*Ceramide activated*

protein phosphatase). Nos résultats montrent une implication du céramide dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant et dans la régulation du complexe NPM/p38. Nous pouvons donc envisager une activation de PP2a dépendante du céramide généré en réponse au stress oxydant (Mathias et al., 1998), que nous discuterons dans le paragraphe dédié à la voie ASMAse/céramide.

Translocation de NPM au noyau

Nos travaux ont permis d'établir la concomitance entre la déphosphorylation de NPM sur T199 et sa translocation au noyau sous sa forme déphosphorylée. La phosphorylation de NPM est décrite comme un facteur important de régulation de la localisation de la protéine. NPM phosphorylée sur T199 se localise au niveau des centrosomes (Tokuyama et al., 2001) alors que sa phosphorylation sur les sérines 70 et 254 favorise sa localisation au niveau du fuseau mitotique (Okuwaki, 2008) et que la phosphorylation du résidu thréonine 95 est associée à une régulation de l'exportation nucléaire de NPM (Wang et al., 2005). Il a aussi été récemment décrit que l'expression de la forme cytoplasmique de NPM dans les cellules leucémiques est associée à une augmentation de la phosphorylation sur T199 (Chan and Meng Lim, 2015). Dans notre modèle, la déphosphorylation de NPM permettrait donc sa dissociation du complexe et sa translocation au noyau.

La fonction nucléaire de NPM

- Inhibition de la détection des dommages à l'ADN

Une des fonctions de NPM décrite au noyau en réponse au stress oxydant est son implication dans la réparation de dommages à l'ADN (Koike et al., 2010; Lin et al., 2010; Poletto et al., 2014; Wu et al., 2002). Il a été démontré que l'augmentation d'expression de NPM plusieurs heures après l'exposition aux UV est corrélée à une capacité de réparation augmentée (Wu et al., 2002). Une autre étude a également mis en évidence qu'en réponse aux UV, la surexpression de la forme non phosphorylée sur T199 de NPM favorise le mécanisme de réparation NER (Lin et al., 2010). A l'inverse, en réponse à l'irradiation, il a été démontré que NPM participe aux voies de réparation via sa forme phosphorylée sur T199 principalement en favorisant le recrutement des protéines de réparation sur les sites de dommages (Koike et al., 2010; Sekhar et al.,

2011). Le rôle précis de NPM dans la réparation des dommages semble donc encore très controversé et pourrait varier dépendamment, du contexte cellulaire, du stimulus mais également de la voie de réparation engagée. Notre étude montre le rôle de NPM dans la phase initiale précoce de la réparation au niveau de la signalétique des dommages. En effet, nos résultats démontrent que dès 30 minutes de traitement au H₂O₂, la NPM déphosphorylée inhibe la signalisation des dommages à l'ADN, en limitant l'activation de protéines de détection des dommages à l'ADN.

Cette implication de NPM dans la détection des dommages à l'ADN a été effectuée par l'analyse des marqueurs des cassures double brins, la formation des foyers γ -H2AX et l'activation de la DNA-PK kinase impliquée dans la phosphorylation de H2AX (An et al., 2010). Nous avons choisi d'explorer l'activation de la DNA-PK, protéine impliquée dans la réparation des cassures double brin par le mécanisme de NHEJ (Mahaney et al., 2009), car c'est le mécanisme de réparation majoritaire dans les cellules non cyclantes (Iyama and Wilson, 2013). Notre modèle d'étude HUVEC est un modèle de cellules endothéliales primaires qui prolifèrent peu et que nous utilisons dans nos expériences en condition de milieu appauvri en facteurs de croissance permettant de travailler sur une population de cellules majoritairement quiescentes en phase G0/G1. En réponse au stress oxydant, inducteur de cassures double brin de l'ADN (Driessens et al., 2009), nous avons montré que la surexpression du mutant non-phosphorylable de NPM (T199A) inhibe la signalisation des dommages à l'ADN, en inhibant la phosphorylation de la DNA-PK et par conséquent la phosphorylation et la formation des foyers H2AX. La phosphorylation de la DNA-PK nécessite son recrutement au niveau de la cassure double brin via les protéines Ku70/Ku80. En effet, ces dernières se lient directement au niveau de la cassure double brin et permettent le recrutement d'un dimère de protéines DNA-PK favorisant leur autophosphorylation (Jette and Lees-Miller, 2015). NPM possède un domaine de liaison à l'ADN/l'ARN en C terminale (Figure 1-21) et il est important de noter que le résidu T199 se localise au niveau de ce domaine (Figure 1-22). Il a été montré que la phosphorylation de la NPM sur quatre résidus thréonine, dont T199, altère la capacité de NPM à lier l'ARN (Okuwaki et al., 2002). NPM non phosphorylée et transloquée au noyau pourrait donc se localiser au niveau des cassures doubles brins de l'ADN et empêcher le recrutement des protéines Ku70/Ku80 nécessaire à l'activation de la DNA-PK et à la signalisation des dommages à l'ADN. Ainsi donc, dans les cellules endothéliales, NPM non phosphorylée au noyau

empêcherait la détection des dommages à l'ADN et par conséquent leur réparation, induisant alors la persistance de dommages à l'ADN. Cette persistance des dommages devra être vérifiée dans notre modèle.

Une question essentielle se pose alors. Quelle est l'implication d'une telle accumulation de dommages à l'ADN dans les cellules endothéliales primaires qui ne sont pas destinées à proliférer puisque le tissu endothélial à un faible taux de renouvellement ? La présence des dommages à l'ADN plusieurs heures après l'irradiation favorise l'instabilité génomique et la mort des cellules (Ianzini and Mackey, 1998). De même, la persistance des dommages à l'ADN après irradiation favorise la sénescence des cellules (Labay et al., 2011). La sénescence endothéliale est un facteur important de dysfonction (Bhayadia et al., 2015; Erusalimsky, 2009). Dans notre laboratoire, la sénescence endothéliale induite par l'irradiation fait l'objet d'études plus approfondies afin de comprendre ses mécanismes et ses conséquences. Dans un modèle de cellules endothéliales de microvaisseaux HMVEC-L irradiées, les travaux suggèrent que la sénescence puisse aussi impliquer un remodelage de la chromatine (Audrey Lafargue, résultats non publiés). Le remodelage de la chromatine joue également un rôle important dans la signalisation et la réparation des dommages à l'ADN en facilitant l'accès des acteurs moléculaires de la réparation à la double hélice d'ADN (Rossetto et al., 2010). Il est établi que NPM participe au remodelage de la chromatine par son activité chaperonne d'histones. Il n'est donc pas impossible que NPM participe aussi de cette façon à la sénescence radio-induite des cellules endothéliales. Nous pouvons envisager que dans notre modèle de cellules endothéliales exposées à stress oxydant aigu, NPM favorise ainsi la mort ou la sénescence des cellules en empêchant la détection des dommages à l'ADN, possiblement en induisant un remodelage de la chromatine. Il est admis que la mort et la sénescence des cellules endothéliales participent aux lésions tissulaires radio-induites (Campisi, 2013; Paris et al., 2001). Ceci soulève donc que le ciblage de NPM dans les cellules endothéliales du tissu sain soit une possibilité pour protéger ces tissus de la radio-toxicité.

- Le ciblage de NPM permettrait-il de protéger les cellules endothéliales des effets délétères du stress oxydant ?

Comme nous avons pu le voir brièvement dans l'introduction de cette thèse, il existe déjà des molécules ciblant la NPM. Ces inhibiteurs déjà identifiés, comme le

NSC348884 (Qi et al., 2008) et le YTR107 (Sekhar et al., 2011), empêchent l'oligomérisation de NPM et favorisent l'apoptose des cellules tumorales. L'utilisation du YTR107 semblerait empêcher la réparation des dommages à l'ADN et par conséquent radiosensibilise les cellules tumorales (Penthala et al., 2015). Cependant, il apparaît que la forme de NPM ciblée par cet inhibiteur soit essentiellement la forme phosphorylée sur T199. De plus, NPM est surexprimée dans de nombreuses tumeurs solides (cancers gastriques, du colon, de la prostate, des ovaires). Cette surexpression de NPM est généralement associée à une résistance à la mort (Grisendi et al., 2006). Or, le statut de phosphorylation de NPM dans les cellules tumorales est très peu étudié. Dans les cellules leucémiques, il a été montré que la forme mutée cytoplasmique de NPM est préférentiellement phosphorylée sur T199 (Chan and Meng Lim, 2015). Récemment, il a pu être mis en évidence que cette forme cytoplasmique de NPM peut être spécifiquement ciblée par un inhibiteur de NPM, la dégueline (Yi et al., 2015).

Dans notre étude, l'objectif est de trouver des cibles pour protéger le tissu sain de la radio-toxicité en protégeant les cellules endothéliales des effets délétères du stress oxydant. Il serait donc intéressant de pouvoir cibler, uniquement dans les tissus sains la NPM non phosphorylée sur T199, forme responsable de l'inhibition de la détection des dommages à l'ADN, grâce à l'identification et au design d'inhibiteurs spécifiques de cette forme.

Nos travaux montrent aussi que la voie d'activation de p38 est indépendante de NPM mais conduit aussi à des effets délétères du stress oxydant. Cibler uniquement NPM ne pourra donc pas être considéré comme l'unique moyen de protéger les cellules endothéliales du stress oxydant. Il serait donc intéressant de pouvoir cibler une molécule potentiellement commune aux deux voies.

La voie de l'ASMase/céramide dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant

- Le céramide, sphingolipide impliqué dans l'activation de la voie NPM/p38/PP2a

La voie de la sphingomyélinase acide, enzyme permettant la génération de céramide, joue un rôle clé dans les réponses des cellules endothéliales à l'irradiation. L'inactivation du gène de l'ASMase chez des souris permet de protéger les cellules endothéliales de l'apoptose radio-induite (Garcia-Barros et al., 2003). De précédents travaux de l'équipe ont décrit l'implication du céramide dans l'activation de p38, dans des cellules endothéliales irradiées, résultats que nous avons confirmés en réponse au stress oxydant. Nous avons montré que la voie ASMase/céramide est impliquée dans l'activation de p38 mais également dans la dissociation du complexe NPM/p38 en réponse au stress oxydant. Cependant, l'activité kinase de p38 n'est pas requise pour la déphosphorylation de NPM impliquée dans la dissociation du complexe. Il semble donc que le céramide participe à la dissociation du complexe indépendamment de son effet sur p38. Le céramide conduirait à l'activation de la voie p38 et à la régulation du complexe NPM/p38, mais de façon parallèle.

Notre étude a permis de mettre en évidence l'implication de la phosphatase PP2a dans la déphosphorylation de NPM qui apparaît être concomitante à la dissociation du complexe NPM/p38. Quelques cibles intracellulaires du céramide ont pu être identifiées, parmi lesquelles les phosphatases appelées CAPP pour Ceramide-Activated Protein Phosphatase (Mathias et al., 1998), phosphatases de la famille de PP2a. La PP2a peut être activée par le céramide (Oaks and Ogretmen, 2014), et plus particulièrement dans les cellules endothéliales, où l'activation de PP2a par le céramide est impliquée dans la dysfonction endothéliale (Bharath et al., 2015). Il est donc possible que la génération de céramide en réponse au stress oxydant induise l'activation de la phosphatase PP2a responsable de la déphosphorylation de NPM favorisant ainsi la dissociation du complexe NPM/p38, hypothèse qui fera l'objet de futurs travaux.

- La voie de l'ASMase/céramide participe aux effets précoces et tardifs du stress oxydant

La voie ASMase/céramide permet l'activation de la voie p38 dans les cellules endothéliales. Des études ont déjà démontré une activation de p38 par le céramide, impliquée dans l'apoptose des cellules, en favorisant la localisation de Bax à la membrane mitochondriale (Kim et al., 2008). De plus, des études précédentes du laboratoire ont montré que l'activation de p38 par le céramide induit l'apoptose précoce des cellules après irradiation (Colin Niaudet, résultats non publiés). L'apoptose précoce des cellules endothéliales participe aux lésions radio-induites des tissus sains (Milliat et al., 2008). Il a pu être démontré que cette apoptose est l'événement initiateur des lésions du tissu intestinal induites par l'irradiation (Paris et al., 2001).

La voie ASMase/céramide est également impliquée dans la dissociation du complexe NPM/p38. Cette dissociation permet la relocalisation de NPM au noyau et altère la détection des dommages à l'ADN. Cela peut favoriser la persistance des dommages à l'ADN et par conséquent la mort mitotique ou la sénescence des cellules. Il a pu être démontré une génération de céramide par la céramide synthase en réponse aux dommages à l'ADN (Liao et al., 1999; Vit and Rosselli, 2003). Cette voie de génération du céramide est une voie différente de celle de l'ASMase. La céramide synthase, principalement localisée au niveau du réticulum endoplasmique, induit la synthèse de céramide *de novo* à partir de sphinganine et d'acétyl-CoA (Kolesnick and Fuks, 2003). Elle est induite plus tardivement après irradiation (18 à 24h post-irradiation) et elle est dépendante des dommages à l'ADN (Vit and Rosselli, 2003). Actuellement, aucune étude ne met en évidence une implication de la voie de l'ASMase dans la réponse aux dommages à l'ADN. Il est connu que le céramide peut aussi favoriser l'induction d'un phénotype sénescence (Venable et al., 1995). Notamment, il a pu être démontré que le céramide induit une inhibition de la télomérase (Ogretmen et al., 2001) favorisant l'érosion des télomères et la sénescence (Campisi, 2013). Le raccourcissement des télomères n'est pas le seul facteur d'induction de la sénescence, les dommages à l'ADN et l'altération du remodelage la chromatine sont également des facteurs favorisant la sénescence (Campisi, 2013), facteurs pouvant impliquer NPM. La sénescence endothéliale se caractérise par une dérégulation de l'expression des gènes et des protéines conduisant à une dérégulation des fonctions endothéliales (Erusalimsky, 2009). Cette dysfonction endothéliale peut favoriser des processus pathologiques comme la

fibrose radio-induite délétère pour le bon fonctionnement des organes lésés (Milliat et al., 2008).

- Le ciblage de la voie ASMase/céramide comme stratégie thérapeutique pour protéger les cellules endothéliales des effets du stress oxydant

Les cellules endothéliales sont riches en ASMase (Marathe et al., 1998). Il serait donc intéressant de pouvoir cibler l'ASMase et ainsi inhiber la génération de céramide. Il existe déjà des inhibiteurs de l'ASMase, la désipramine que nous utilisons dans nos expériences. Cet inhibiteur fait partie de la famille des FIASMA (Functional inhibitor of acid sphingomyelinase) et inhibe l'ASMase en favorisant son détachement de la membrane lysosomale conduisant à sa dégradation (Kornhuber et al., 2011). Ces inhibiteurs ont démontré une certaine efficacité dans la protection des lésions radio-induite du tissu intestinal (Paris et al., 2001) et dans le traitement de la mucoviscidose (Becker et al., 2010; Riethmüller et al., 2009). Cependant, le manque de spécificité de ces molécules pour l'ASMase constitue un frein à leur développement (Kornhuber et al., 2011). Ces molécules encore récentes demandent davantage de caractérisation afin de pouvoir développer une stratégie thérapeutique.

Des traitements à la sphingosine-1-phosphate (S1P), facteur de survie, permettent aussi de protéger les cellules endothéliales de la mort précoce radio-induite dépendante du céramide (Bonnaud et al., 2007, 2010). Cependant, la S1P, métabolite du céramide, est un phospholipide impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la différenciation, l'inflammation et la migration, favorables à la dysfonction endothéliale (Maceyka et al., 2012). De plus, le traitement à la S1P favorise l'activation de la voie pro-survie Akt (Bonnaud et al., 2010) mais ne protège pas de la mort mitotique induite par les dommages à l'ADN (Bonnaud et al., 2007). D'après nos résultats, NPM favorise la persistance des dommages à l'ADN pouvant conduire à la mort mitotique des cellules. La S1P en traitement seul ne semble donc pas être la meilleure stratégie thérapeutique.

Récemment, il a été démontré que l'utilisation d'anticorps anti-céramide empêche la formation des plateformes riches en céramide, protégeant ainsi le tissu intestinal des lésions radio-induites (Rotolo et al., 2012). Du fait des progrès de l'ingénierie des anticorps et des immunothérapies dans le cadre des traitements des cancers (Lameris et al., 2014), il serait potentiellement envisageable de cibler spécifiquement le céramide des cellules endothéliales grâce à l'utilisation d'anticorps

bi-spécifiques. Ce ciblage spécifique du céramide des cellules endothéliales permettrait ainsi de protéger les cellules endothéliales de l'activation de la voie du céramide, empêchant ainsi la mort et la sénescence des cellules. Cette protection permettrait donc de maintenir un endothélium fonctionnel essentiel pour le bon fonctionnement des tissus. De plus, comme nous avons déjà pu le voir, l'inhibition de la mort des cellules endothéliales protège les tissus sains des lésions radio-induites (Paris et al., 2001), lésions responsables des effets secondaires de la radiothérapie et principale limite à l'amélioration de la radiothérapie.

Modèle proposé pour la voie NPM/p38/PP2a activée dans les cellules endothéliales en réponse au stress oxydant aigu.

Au vue de ces résultats et des données de la littérature, voici une proposition de modèle d'activation de la voie NPM/p38/PP2a en réponse au stress oxydant (Figure 5-1) : Dans les cellules endothéliales quiescentes, NPM phosphorylée sur T199 est localisée au niveau du cytoplasme via son interaction avec p38 et PP2a. En réponse au stress oxydant, la génération de céramide par l'ASMase au niveau de la membrane plasmique permet l'activation de p38, conduisant ainsi à la transduction de signaux pro-apoptotiques, possiblement via l'activation de la voie mitochondriale. Le céramide va également permettre l'activation de PP2a complexée à NPM dans le cytoplasme grâce à p38. Cette activation de PP2a va favoriser la déphosphorylation de NPM sur T199. La NPM déphosphorylée est alors dissociée du complexe et transloque au noyau. La NPM non phosphorylée au noyau altère la détection des dommages à l'ADN induit par le stress oxydant. La persistance de ces dommages non réparés va contribuer à la mort mitotique des cellules ou à l'induction de la sénescence empêchant ainsi la transmission des dommages cellulaires aux cellules filles.

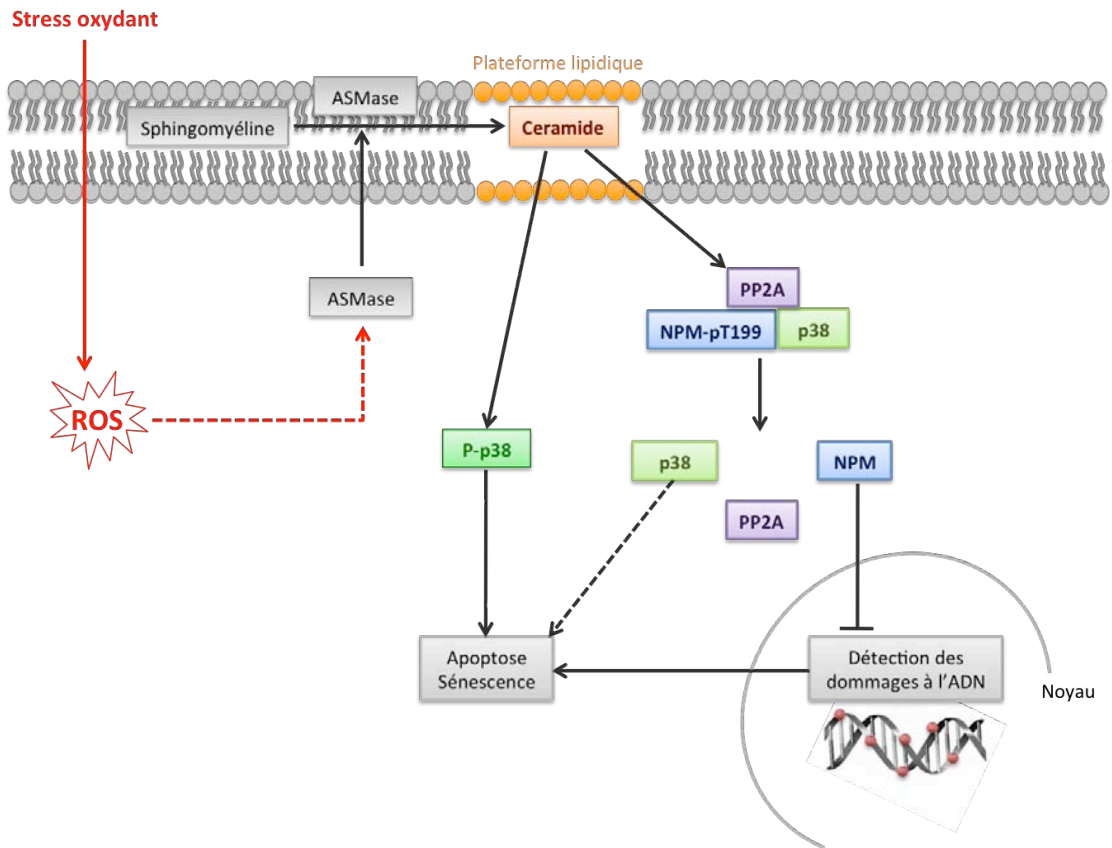


Figure 5-1 : Modèle proposé pour l'activation voie p38/NPM/PP2a par le stress oxydant dans les cellules endothéliales.

Conclusion générale

Ce travail de thèse montre l'implication du complexe NPM/p38/PP2A dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant aigu, possiblement régulé par la voie ASMase/céramide. Ce complexe hétérotrimérique pourrait être impliqué dans l'apoptose et/ou la sénescence prématurée des cellules endothéliales via notamment l'inhibition de la détection des dommages à l'ADN par NPM, avec pour conséquence une persistance des dommages. NPM est également impliquée dans le remodelage de chromatine. Ces événements participent à l'induction de la mort des cellules mais également de la sénescence. L'apoptose et la sénescence des cellules endothéliales contribuent aux lésions tissulaires radio-induites à l'origine des effets secondaires de la radiothérapie. Ce travail de thèse a donc apporté une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant, en identifiant une nouvelle voie de signalisation NPM/p38/PP2a, dans laquelle le céramide généré par l'ASMase semble aussi être impliqué.

Il existe déjà des inhibiteurs ciblant préférentiellement la NPM phosphorylée sur T199, il est donc envisageable de pouvoir cibler spécifiquement NPM non phosphorylée sur T199, qui en combinaison avec d'autre traitement permettrait l'inhibition de ces voies. Des stratégies de ciblage de la voie céramide par l'inhibition de l'activité de l'ASMase ou par l'utilisation d'anticorps anti-céramide semblent des approches également envisageables pour cibler l'activation de ces voies. Ces approches thérapeutiques pourraient permettre de prévenir les dysfonctions endothéliales telles que la mort et/ou la sénescence des cellules endothéliales et ainsi protéger le tissu sain des effets délétères du stress oxydant, tel que celui subit par les tissus au cours des approches radiothérapeutiques.

Perspectives

En perspectives de ce projet, il serait intéressant dans un premier temps de poursuivre la caractérisation de l'interaction NPM en identifiant le statut de phosphorylation des partenaires dans l'interaction mais aussi les sites d'interaction entre les protéines NPM et p38. De plus, il serait important de confirmer le rôle du céramide dans la régulation de PP2a dans le contexte de l'association NPM/p38.

L'étude de la persistance des dommages à l'ADN est également une perspective intéressante. Après confirmation de la présence de dommages à l'ADN persistants, la poursuite logique de cette étude nous amènerait à identifier l'implication de ces dommages dans l'induction de l'apoptose et la sénescence des cellules endothéliales.

Enfin, en terme de perspectives à plus long terme, il serait très intéressant de se placer en condition réelle d'irradiation. De plus, nous avons la chance de pouvoir avoir accès à des échantillons de tissu sain péri-tumoral non-irradié et irradié, il serait donc très enrichissant de vérifier la présence de nos protéines d'intérêts dans ces tissus.

Références

- Adams, J.L., Boehm, J.C., Kassis, S., Gorycki, P.D., Webb, E.F., Hall, R., Sorenson, M., Lee, J.C., Ayrton, A., Griswold, D.E., et al. (1998). Pyrimidinylimidazole inhibitors of CSBP/p38 kinase demonstrating decreased inhibition of hepatic cytochrome P450 enzymes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *8*, 3111–3116.
- Ago, T., Kitazono, T., Ooboshi, H., Iyama, T., Han, Y.H., Takada, J., Wakisaka, M., Ibayashi, S., Utsumi, H., and Iida, M. (2004). Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* *109*, 227–233.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Blood Vessels and Endothelial Cells*.
- Alimbetov, D., Davis, T., Brook, A.J.C., Cox, L.S., Faragher, R.G.A., Nurgozhin, T., Zhumadilov, Z., and Kipling, D. (2015). Suppression of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fibroblasts using small molecule inhibitors of p38 MAP kinase and MK2. *Biogerontology*.
- Alom-Ruiz, S.P., Anilkumar, N., and Shah, A.M. (2008a). Reactive oxygen species and endothelial activation. *Antioxid. Redox Signal.* *10*, 1089–1100.
- Alom-Ruiz, S.P., Anilkumar, N., and Shah, A.M. (2008b). Reactive oxygen species and endothelial activation. *Antioxid. Redox Signal.* *10*, 1089–1100.
- Ameziane-El-Hassani, R., Talbot, M., de Souza Dos Santos, M.C., Al Ghuzlan, A., Hartl, D., Bidart, J.-M., De Deken, X., Miot, F., Diallo, I., de Vathaire, F., et al. (2015). NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 5051–5056.
- An, J., Huang, Y.-C., Xu, Q.-Z., Zhou, L.-J., Shang, Z.-F., Huang, B., Wang, Y., Liu, X.-D., Wu, D.-C., and Zhou, P.-K. (2010). DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC Mol. Biol.* *11*, 18.
- Aparicio, T., Baer, R., and Gautier, J. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair* *19*, 169–175.
- Arora, D.K., Machhadieh, B., Matti, A., Wadzinski, B.E., Ramanadham, S., and Kowluru, A. (2014). High glucose exposure promotes activation of protein phosphatase 2A in rodent islets and INS-1 832/13 β -cells by increasing the posttranslational carboxymethylation of its catalytic subunit. *Endocrinology* *155*, 380–391.
- Ashwell, J.D. (2006). The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 532–540.
- Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.-P., and Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* *327*, 48–60.

- Babu, D., Leclercq, G., Goossens, V., Vanden Berghe, T., Van Hamme, E., Vandenabeele, P., and Lefebvre, R.A. (2015). Mitochondria and NADPH oxidases are the major sources of TNF- α /cycloheximide-induced oxidative stress in murine intestinal epithelial MODE-K cells. *Cell. Signal.* 27, 1141–1158.
- Barascu, A., Le Chalony, C., Pennarun, G., Genet, D., Imam, N., Lopez, B., and Bertrand, P. (2012). Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J.* 31, 1080–1094.
- Barnett, G.C., West, C.M.L., Dunning, A.M., Elliott, R.M., Coles, C.E., Pharoah, P.D.P., and Burnet, N.G. (2009). Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat. Rev. Cancer* 9, 134–142.
- Becker, K.A., Riethmüller, J., Lüth, A., Döring, G., Kleuser, B., and Gulbins, E. (2010). Acid sphingomyelinase inhibitors normalize pulmonary ceramide and inflammation in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42, 716–724.
- Benderitter, M., Vincent-Genod, L., Berroud, A., Muller, S., Donner, M., and Voisin, P. (1999). Radio-induced structural membrane modifications: a potential bioindicator of ionizing radiation exposure? *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 1043–1053.
- Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H.F., and Marshall, C.J. (1998). Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr. Biol. CB* 8, 1049–1057.
- Bentzen, S.M. (2006). Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat. Rev. Cancer* 6, 702–713.
- Bertwistle, D., Sugimoto, M., and Sherr, C.J. (2004). Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol. Cell. Biol.* 24, 985–996.
- Bharath, L.P., Ruan, T., Li, Y., Ravindran, A., Wan, X., Nhan, J.K., Walker, M.L., Deeter, L., Goodrich, R., Johnson, E., et al. (2015). Ceramide initiated protein phosphatase 2A activation contributes to arterial dysfunction in vivo. *Diabetes*.
- Bhayadia, R., Schmidt, B.M.W., Melk, A., and Hömme, M. (2015). Senescence-Induced Oxidative Stress Causes Endothelial Dysfunction. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*
- Bhide, S.A., and Nutting, C.M. (2010). Recent advances in radiotherapy. *BMC Med.* 8, 25.
- Biondi, R.M., and Nebreda, A.R. (2003). Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem. J.* 372, 1–13.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19.

- Bischof, D., Pulford, K., Mason, D.Y., and Morris, S.W. (1997). Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 2312–2325.
- Bodennec, J., Koul, O., Aguado, I., Brichon, G., Zwingelstein, G., and Portoukalian, J. (2000). A procedure for fractionation of sphingolipid classes by solid-phase extraction on aminopropyl cartridges. *J. Lipid Res.* *41*, 1524–1531.
- Bonnaud, S., Niaudet, C., Pottier, G., Gaugler, M.-H., Millour, J., Barbet, J., Sabatier, L., and Paris, F. (2007). Sphingosine-1-phosphate protects proliferating endothelial cells from ceramide-induced apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death. *Cancer Res.* *67*, 1803–1811.
- Bonnaud, S., Niaudet, C., Legoux, F., Corre, I., Delpon, G., Saulquin, X., Fuks, Z., Gaugler, M.-H., Kolesnick, R., and Paris, F. (2010). Sphingosine-1-phosphate activates the AKT pathway to protect small intestines from radiation-induced endothelial apoptosis. *Cancer Res.* *70*, 9905–9915.
- Boudreau, R.T.M., Conrad, D.M., and Hoskin, D.W. (2007). Apoptosis induced by protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition in T leukemia cells is negatively regulated by PP2A-associated p38 mitogen-activated protein kinase. *Cell. Signal.* *19*, 139–151.
- Boueiz, A., and Hassoun, P.M. (2009). Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc. Res.* *77*, 26–34.
- Boutros, T., Chevet, E., and Metrakos, P. (2008). Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol. Rev.* *60*, 261–310.
- Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J.-J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2003). Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev.* *17*, 1969–1978.
- Brandes, R.P., Weissmann, N., and Schröder, K. (2014). Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic. Biol. Med.* *76*, 208–226.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 297–308.
- Bretón-Romero, R., and Lamas, S. (2013). Hydrogen peroxide signaling mediator in the activation of p38 MAPK in vascular endothelial cells. *Methods Enzymol.* *528*, 49–59.
- Briones, A.M., and Touyz, R.M. (2010). Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr. Hypertens. Rep.* *12*, 135–142.
- Buxadé, M., Parra, J.L., Rousseau, S., Shpiro, N., Marquez, R., Morrice, N., Bain, J., Espel, E., and Proud, C.G. (2005). The Mnks are novel components in the control of TNF alpha biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1. *Immunity* *23*, 177–189.

- Cai, H., and Harrison, D.G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87, 840–844.
- Caja, L., Sancho, P., Bertran, E., Iglesias-Serret, D., Gil, J., and Fabregat, I. (2009). Overactivation of the MEK/ERK pathway in liver tumor cells confers resistance to TGF- β -induced cell death through impairing up-regulation of the NADPH oxidase NOX4. *Cancer Res.* 69, 7595–7602.
- Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 685–705.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677–1679.
- Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 75, 50–83.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307.
- Carmona-Cuenca, I., Roncero, C., Sancho, P., Caja, L., Fausto, N., Fernández, M., and Fabregat, I. (2008). Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF- β in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity. *J. Hepatol.* 49, 965–976.
- Cha, H., Wang, X., Li, H., and Fornace, A.J., Jr (2007). A functional role for p38 MAPK in modulating mitotic transit in the absence of stress. *J. Biol. Chem.* 282, 22984–22992.
- Chan, N., and Meng Lim, T. (2015). Cytoplasmic nucleophosmin has elevated T199 phosphorylation upon which G2/M phase progression is dependent. *Sci. Rep.* 5, 11777.
- Chang, T.-M., Shi, G.-Y., Wu, H.-L., Wu, C.-H., Su, Y.-D., Wang, H.-L., Wen, H.-Y., and Huang, H.-C. (2011). Effects of salvianolic Acid B on protein expression in human umbilical vein endothelial cells. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2011, 213050.
- Charruyer, A., Grazide, S., Bezombes, C., Müller, S., Laurent, G., and Jaffrézou, J.-P. (2005). UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal. *J. Biol. Chem.* 280, 19196–19204.
- Chaudhry, M.A. (2008). Analysis of gene expression in normal and cancer cells exposed to gamma-radiation. *J. Biomed. Biotechnol.* 2008, 541678.
- Chen, B.P.C., Uematsu, N., Kobayashi, J., Lerenthal, Y., Krempler, A., Yajima, H., Löbrich, M., Shiloh, Y., and Chen, D.J. (2007). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J. Biol. Chem.* 282, 6582–6587.

- Chen, B.P.C., Li, M., and Asaithamby, A. (2012). New insights into the roles of ATM and DNA-PKcs in the cellular response to oxidative stress. *Cancer Lett.* 327, 103–110.
- Chen, C.-L., Lin, C.-F., Chang, W.-T., Huang, W.-C., Teng, C.-F., and Lin, Y.-S. (2008). Ceramide induces p38 MAPK and JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway. *Blood* 111, 4365–4374.
- Chen, L., Liu, L., Yin, J., Luo, Y., and Huang, S. (2009). Hydrogen peroxide-induced neuronal apoptosis is associated with inhibition of protein phosphatase 2A and 5, leading to activation of MAPK pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1284–1295.
- Chiu, S.-J., Chao, J.-I., Lee, Y.-J., and Hsu, T.-S. (2008). Regulation of gamma-H2AX and securin contribute to apoptosis by oxaliplatin via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human colorectal cancer cells. *Toxicol. Lett.* 179, 63–70.
- Choi, H., Dikalova, A., Stark, R.J., and Lamb, F.S. (2015). c-Jun N-terminal kinase attenuates TNF α signaling by reducing Nox1-dependent endosomal ROS production in vascular smooth muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 86, 219–227.
- Choi, S.-Y., Kim, M.-J., Kang, C.-M., Bae, S., Cho, C.-K., Soh, J.-W., Kim, J.-H., Kang, S., Chung, H.Y., Lee, Y.-S., et al. (2006). Activation of Bak and Bax through c-abl-protein kinase Cdelta-p38 MAPK signaling in response to ionizing radiation in human non-small cell lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* 281, 7049–7059.
- Chuong Nguyen, M.V., Lardy, B., Paclet, M.-H., Rousset, F., Berthier, S., Baillet, A., Grange, L., Gaudin, P., and Morel, F. (2015). [NADPH oxidases, Nox: new isoenzymes family]. *Médecine Sci. MS* 31, 43–52.
- Cicchillitti, L., Fasanaro, P., Biglioli, P., Capogrossi, M.C., and Martelli, F. (2003). Oxidative stress induces protein phosphatase 2A-dependent dephosphorylation of the pocket proteins pRb, p107, and p130. *J. Biol. Chem.* 278, 19509–19517.
- Cilloni, D., Messa, F., Rosso, V., Arruga, F., Defilippi, I., Carturan, S., Catalano, R., Pautasso, M., Panuzzo, C., Nicoli, P., et al. (2008). Increase sensitivity to chemotherapeutical agents and cytoplasmatic interaction between NPM leukemic mutant and NF-kappaB in AML carrying NPM1 mutations. *Leukemia* 22, 1234–1240.
- Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., et al. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527–3561.
- Clough, G. (1991). Relationship between microvascular permeability and ultrastructure. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 55, 47–69.
- Collins-Underwood, J.R., Zhao, W., Sharpe, J.G., and Robbins, M.E. (2008). NADPH oxidase mediates radiation-induced oxidative stress in rat brain microvascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 929–938.

- Colombo, E., Marine, J.-C., Danovi, D., Falini, B., and Pelicci, P.G. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat. Cell Biol.* *4*, 529–533.
- Colombo, E., Bonetti, P., Lazzerini Denchi, E., Martinelli, P., Zamponi, R., Marine, J.-C., Helin, K., Falini, B., and Pelicci, P.G. (2005). Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 8874–8886.
- Colombo, E., Martinelli, P., Zamponi, R., Shing, D.C., Bonetti, P., Luzi, L., Volorio, S., Bernard, L., Pruneri, G., Alcalay, M., et al. (2006). Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant. *Cancer Res.* *66*, 3044–3050.
- Corre, I., Guillonnet, M., and Paris, F. (2013). Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 22678–22696.
- Côté, M.C., Lavoie, J.R., Houle, F., Poirier, A., Rousseau, S., and Huot, J. (2010). Regulation of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by LIM kinase 1-mediated phosphorylation of annexin 1. *J. Biol. Chem.* *285*, 8013–8021.
- Coulthard, L.R., White, D.E., Jones, D.L., McDermott, M.F., and Burchill, S.A. (2009). p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol. Med.* *15*, 369–379.
- Cremesti, A.E., Goni, F.M., and Kolesnick, R. (2002). Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Lett.* *531*, 47–53.
- Csiszar, A., Wang, M., Lakatta, E.G., and Ungvari, Z. (2008). Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *105*, 1333–1341.
- Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* *429*, 403–417.
- Cuenda, A., and Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1358–1375.
- Cuevas, B.D., Abell, A.N., and Johnson, G.L. (2007). Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene* *26*, 3159–3171.
- Davidson, W., Frego, L., Peet, G.W., Kroe, R.R., Labadia, M.E., Lukas, S.M., Snow, R.J., Jakes, S., Grygon, C.A., Pargellis, C., et al. (2004). Discovery and characterization of a substrate selective p38alpha inhibitor. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 11658–11671.
- Davies, K.J. (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* *83*, 301–310.

- Davies, K.J., and Delsignore, M.E. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* 262, 9908–9913.
- Davies, K.J., Lin, S.W., and Pacifici, R.E. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J. Biol. Chem.* 262, 9914–9920.
- Davis, A.J., and Chen, D.J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl. Cancer Res.* 2, 130–143.
- Delanian, S., and Lefaix, J.-L. (2004). The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 73, 119–131.
- DeMartino, G.N., and Slaughter, C.A. (1999). The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274, 22123–22126.
- Denham, J.W., and Hauer-Jensen, M. (2002). The radiotherapeutic injury--a complex "wound." *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 63, 129–145.
- De Nicola, G.F., Martin, E.D., Chaikuad, A., Bassi, R., Clark, J., Martino, L., Verma, S., Sicard, P., Tata, R., Atkinson, R.A., et al. (2013). Mechanism and consequence of the autoactivation of p38 α mitogen-activated protein kinase promoted by TAB1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1182–1190.
- Dent, P., Yacoub, A., Contessa, J., Caron, R., Amorino, G., Valerie, K., Hagan, M.P., Grant, S., and Schmidt-Ullrich, R. (2003a). Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat. Res.* 159, 283–300.
- Dent, P., Yacoub, A., Fisher, P.B., Hagan, M.P., and Grant, S. (2003b). MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* 22, 5885–5896.
- Dhar, S.K., Lynn, B.C., Daosukho, C., and St Clair, D.K. (2004). Identification of nucleophosmin as an NF-kappaB co-activator for the induction of the human SOD2 gene. *J. Biol. Chem.* 279, 28209–28219.
- Dimozi, A., Mavrogonatou, E., Sklirou, A., and Kletsas, D. (2015). Oxidative stress inhibits the proliferation, induces premature senescence and promotes a catabolic phenotype in human nucleus pulposus intervertebral disc cells. *Eur. Cell. Mater.* 30, 89–103.
- Dizdaroglu, M., and Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic. Res.* 46, 382–419.
- Dodson, M., Darley-Usmar, V., and Zhang, J. (2013). Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 63, 207–221.

- Dong, Y., Xiong, M., Duan, L., Liu, Z., Niu, T., Luo, Y., Wu, X., Xu, C., and Lu, C. (2014). H2AX phosphorylation regulated by p38 is involved in Bim expression and apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells induced by imatinib. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *19*, 1281–1292.
- Driessens, N., Versteyhe, S., Ghaddhab, C., Burniat, A., De Deken, X., Van Sande, J., Dumont, J.-E., Miot, F., and Corvilain, B. (2009). Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocr. Relat. Cancer* *16*, 845–856.
- Du, W., Zhou, Y., Pike, S., and Pang, Q. (2010). NPM phosphorylation stimulates Cdk1, overrides G2/M checkpoint and increases leukemic blasts in mice. *Carcinogenesis* *31*, 302–310.
- Dwyer, S.F., and Gelman, I.H. (2014). Cross-Phosphorylation and Interaction between Src/FAK and MAPKAP5/PRAK in Early Focal Adhesions Controls Cell Motility. *J. Cancer Biol. Res.* *2*.
- Engelhardt, B., and Sorokin, L. (2009). The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin. Immunopathol.* *31*, 497–511.
- Enomoto, T., Lindström, M.S., Jin, A., Ke, H., and Zhang, Y. (2006). Essential role of the B23/NPM core domain in regulating ARF binding and B23 stability. *J. Biol. Chem.* *281*, 18463–18472.
- Eriksson, D., Löfroth, P.-O., Johansson, L., Riklund, K.A., and Stigbrand, T. (2007). Cell cycle disturbances and mitotic catastrophes in HeLa Hep2 cells following 2.5 to 10 Gy of ionizing radiation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 5501s – 5508s.
- Ermak, G., and Davies, K.J.A. (2002). Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol. Immunol.* *38*, 713–721.
- Erusalimsky, J.D. (2009). Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *106*, 326–332.
- Evangelista, A.M., Thompson, M.D., Bolotina, V.M., Tong, X., and Cohen, R.A. (2012). Nox4- and Nox2-dependent oxidant production is required for VEGF-induced SERCA cysteine-674 S-glutathiolation and endothelial cell migration. *Free Radic. Biol. Med.* *53*, 2327–2334.
- Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., et al. (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N. Engl. J. Med.* *352*, 254–266.
- Falini, B., Bolli, N., Liso, A., Martelli, M.P., Mannucci, R., Pileri, S., and Nicoletti, I. (2009). Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. *Leukemia* *23*, 1731–1743.

- Fan, L., Yang, X., Du, J., Marshall, M., Blanchard, K., and Ye, X. (2005). A novel role of p38 alpha MAPK in mitotic progression independent of its kinase activity. *Cell Cycle Georget. Tex* 4, 1616–1624.
- Fauquette, W., Amourette, C., Dehouck, M.-P., and Diserbo, M. (2012). Radiation-induced blood-brain barrier damages: an in vitro study. *Brain Res.* 1433, 114–126.
- Faust, D., Dolado, I., Cuadrado, A., Oesch, F., Weiss, C., Nebreda, A.R., and Dietrich, C. (2005). p38alpha MAPK is required for contact inhibition. *Oncogene* 24, 7941–7945.
- Félétou, M., and Vanhoutte, P.M. (2006). Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, H985–H1002.
- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 248–253.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Förstermann, U. (2010). Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 459, 923–939.
- Franklin, C.C., Rosenfeld-Franklin, M.E., White, C., Kavanagh, T.J., and Fausto, N. (2003). TGFbeta1-induced suppression of glutathione antioxidant defenses in hepatocytes: caspase-dependent post-translational and caspase-independent transcriptional regulatory mechanisms. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 1535–1537.
- Freund, A., Patil, C.K., and Campisi, J. (2011). p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* 30, 1536–1548.
- Fuks, Z., and Kolesnick, R. (2005). Engaging the vascular component of the tumor response. *Cancer Cell* 8, 89–91.
- Gaboury, J.P., Anderson, D.C., and Kubes, P. (1994). Molecular mechanisms involved in superoxide-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo. *Am. J. Physiol.* 266, H637–H642.
- Gabryś, D., Greco, O., Patel, G., Prise, K.M., Tozer, G.M., and Kanthou, C. (2007). Radiation effects on the cytoskeleton of endothelial cells and endothelial monolayer permeability. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 69, 1553–1562.
- Gadad, S.S., Senapati, P., Syed, S.H., Rajan, R.E., Shandilya, J., Swaminathan, V., Chatterjee, S., Colombo, E., Dimitrov, S., Pelicci, P.G., et al. (2011). The multifunctional protein nucleophosmin (NPM1) is a human linker histone H1 chaperone. *Biochemistry (Mosc.)* 50, 2780–2789.

Garcia-Barros, M., Paris, F., Cordon-Cardo, C., Lyden, D., Rafii, S., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (2003). Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 300, 1155–1159.

Gardai, S.J., Whitlock, B.B., Xiao, Y.Q., Bratton, D.B., and Henson, P.M. (2004). Oxidants inhibit ERK/MAPK and prevent its ability to delay neutrophil apoptosis downstream of mitochondrial changes and at the level of XIAP. *J. Biol. Chem.* 279, 44695–44703.

Gaugler, M.H., Squiban, C., van der Meeren, A., Bertho, J.M., Vandamme, M., and Mouthon, M.A. (1997). Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* 72, 201–209.

Gaugler, M.-H., Vereycken-Holler, V., Squiban, C., and Aigueperse, J. (2004). PECAM-1 (CD31) is required for interactions of platelets with endothelial cells after irradiation. *J. Thromb. Haemost. JTH* 2, 2020–2026.

Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R.J., Luo, Y., and Han, J. (2002). MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 295, 1291–1294.

Gerits, N., Kostenko, S., and Moens, U. (2007). In vivo functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice. *Transgenic Res.* 16, 281–314.

Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., and Pelicci, P.G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 722–728.

Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82, 373–428.

Goedert, M., Hasegawa, M., Jakes, R., Lawler, S., Cuenda, A., and Cohen, P. (1997). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 409, 57–62.

Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2008). Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol.* 18, 165–173.

Goldin-Lang, P., Niebergall, F., Antoniak, S., Szotowski, B., Rosenthal, P., Pels, K., Schultheiss, H.-P., and Rauch, U. (2007). Ionizing radiation induces upregulation of cellular procoagulability and tissue factor expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Thromb. Res.* 120, 857–864.

Golstein, P., and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 32, 37–43.

Gong, X., Ming, X., Deng, P., and Jiang, Y. (2010). Mechanisms regulating the nuclear translocation of p38 MAP kinase. *J. Cell. Biochem.* 110, 1420–1429.

- Gout, S., Tremblay, P.-L., and Huot, J. (2008). Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 25, 335–344.
- Grassme, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2001). CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 276, 20589–20596.
- Grethe, S., and Pörn-Ares, M.I. (2006). p38 MAPK regulates phosphorylation of Bad via PP2A-dependent suppression of the MEK1/2-ERK1/2 survival pathway in TNF- α induced endothelial apoptosis. *Cell. Signal.* 18, 531–540.
- Grisendi, S., Bernardi, R., Rossi, M., Cheng, K., Khandker, L., Manova, K., and Pandolfi, P.P. (2005). Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 437, 147–153.
- Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B., and Pandolfi, P.P. (2006). Nucleophosmin and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 493–505.
- Grishin, A.V., Wang, J., Potoka, D.A., Hackam, D.J., Upperman, J.S., Boyle, P., Zamora, R., and Ford, H.R. (2006). Lipopolysaccharide induces cyclooxygenase-2 in intestinal epithelium via a noncanonical p38 MAPK pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 176, 580–588.
- Guicheux, J., Lemonnier, J., Ghayor, C., Suzuki, A., Palmer, G., and Caverzasio, J. (2003). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 18, 2060–2068.
- Gulbins, E., and Kolesnick, R. (2003). Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* 22, 7070–7077.
- Gum, R.J., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Wang, Z., Bower, M.J., Lee, J.C., Adams, J.L., Livi, G.P., Goldsmith, E.J., and Young, P.R. (1998). Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket. *J. Biol. Chem.* 273, 15605–15610.
- Guo, C., Tang, T.-S., and Friedberg, E.C. (2010a). SnapShot: nucleotide excision repair. *Cell* 140, 754–754.e1.
- Guo, R., Chen, J., Zhu, F., Biswas, A.K., Berton, T.R., Mitchell, D.L., and Johnson, D.G. (2010b). E2F1 localizes to sites of UV-induced DNA damage to enhance nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 285, 19308–19315.
- Haimovitz-Friedman, A., Kan, C.C., Ehleiter, D., Persaud, R.S., McLoughlin, M., Fuks, Z., and Kolesnick, R.N. (1994). Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.* 180, 525–535.

- Hallahan, D.E., and Virudachalam, S. (1997). Intercellular adhesion molecule 1 knockout abrogates radiation induced pulmonary inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 6432–6437.
- Halle, M., Ekström, M., Farnebo, F., and Tornvall, P. (2010). Endothelial activation with prothrombotic response in irradiated microvascular recipient veins. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg. JPRAS* *63*, 1910–1916.
- Hamilton, G., Abraham, A.G., Morton, J., Sampson, O., Pefani, D.E., Khoronenkova, S., Grawenda, A., Papaspyropoulos, A., Jamieson, N., McKay, C., et al. (2014). AKT regulates NPM dependent ARF localization and p53mut stability in tumors. *Oncotarget*.
- Hampton, M.B., Fadeel, B., and Orrenius, S. (1998). Redox regulation of the caspases during apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *854*, 328–335.
- Hara, A., and Radin, N.S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* *90*, 420–426.
- Hari, D., Beckett, M.A., Sukhatme, V.P., Dhanabal, M., Nodzenski, E., Lu, H., Mauceri, H.J., Kufe, D.W., and Weichselbaum, R.R. (2000). Angiostatin induces mitotic cell death of proliferating endothelial cells. *Mol. Cell Biol. Res. Commun. MCBRC* *3*, 277–282.
- Hatoum, O.A., Otterson, M.F., Kopelman, D., Miura, H., Sukhotnik, I., Larsen, B.T., Selle, R.M., Moulder, J.E., and Gutterman, D.D. (2006). Radiation induces endothelial dysfunction in murine intestinal arterioles via enhanced production of reactive oxygen species. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 287–294.
- Herman, M., Ori, Y., Chagnac, A., Weinstein, T., Korzets, A., Zevin, D., Malachi, T., and Gafer, U. (2002). DNA repair in mononuclear cells: role of serine/threonine phosphatases. *J. Lab. Clin. Med.* *140*, 255–262.
- Hiraga, R., Kato, M., Miyagawa, S., and Kamata, T. (2013). Nox4-derived ROS signaling contributes to TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* *33*, 4431–4438.
- 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.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* *411*, 366–374.
- Holley, A.K., Miao, L., St Clair, D.K., and St Clair, W.H. (2014). Redox-modulated phenomena and radiation therapy: the central role of superoxide dismutases. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 1567–1589.
- Holmström, K.M., and Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 411–421.

- Hong, C.-W., Kim, Y.-M., Pyo, H., Lee, J.-H., Kim, S., Lee, S., and Noh, J.M. (2013). Involvement of inducible nitric oxide synthase in radiation-induced vascular endothelial damage. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *54*, 1036–1042.
- Houle, F., and Huot, J. (2006a). Dysregulation of the endothelial cellular response to oxidative stress in cancer. *Mol. Carcinog.* *45*, 362–367.
- Houle, F., and Huot, J. (2006b). Dysregulation of the endothelial cellular response to oxidative stress in cancer. *Mol. Carcinog.* *45*, 362–367.
- van der Houven van Oordt, W., Diaz-Meco, M.T., Lozano, J., Krainer, A.R., Moscat, J., and Cáceres, J.F. (2000). The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *J. Cell Biol.* *149*, 307–316.
- Hsiao, P.-W., Chang, C.-C., Liu, H.-F., Tsai, C.-M., Chiu, T.H., and Chao, J.-I. (2007). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by celecoxib oppositely regulates survivin and gamma-H2AX in human colorectal cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *222*, 97–104.
- Hu, T., Ramachandrarao, S.P., Siva, S., Valancius, C., Zhu, Y., Mahadev, K., Toh, I., Goldstein, B.J., Woolkalis, M., and Sharma, K. (2005). Reactive oxygen species production via NADPH oxidase mediates TGF-beta-induced cytoskeletal alterations in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *289*, F816–F825.
- Huet, O., Dupic, L., Harrois, A., and Duranteau, J. (2011). Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *16*, 1986–1995.
- Huot, J., Houle, F., Marceau, F., and Landry, J. (1997). Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* *80*, 383–392.
- Huot, J., Houle, F., Rousseau, S., Deschesnes, R.G., Shah, G.M., and Landry, J. (1998). SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* *143*, 1361–1373.
- Ianzini, F., and Mackey, M.A. (1998). Delayed DNA damage associated with mitotic catastrophe following X-irradiation of HeLa S3 cells. *Mutagenesis* *13*, 337–344.
- Igarashi, K., Sakimoto, I., Kataoka, K., Ohta, K., and Miura, M. (2007). Radiation-induced senescence-like phenotype in proliferating and plateau-phase vascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* *313*, 3326–3336.
- Inder, K.L., Lau, C., Loo, D., Chaudhary, N., Goodall, A., Martin, S., Jones, A., van der Hoeven, D., Parton, R.G., Hill, M.M., et al. (2009). Nucleophosmin and nucleolin regulate K-Ras plasma membrane interactions and MAPK signal transduction. *J. Biol. Chem.* *284*, 28410–28419.

Ishitsuka, K., Hideshima, T., Neri, P., Vallet, S., Shiraishi, N., Okawa, Y., Shen, Z., Raje, N., Kiziltepe, T., Ocio, E.M., et al. (2008). p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor LY2228820 enhances bortezomib-induced cytotoxicity and inhibits osteoclastogenesis in multiple myeloma; therapeutic implications. *Br. J. Haematol.* *141*, 598–606.

Iwasa, H., Han, J., and Ishikawa, F. (2003). Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *8*, 131–144.

Iyama, T., and Wilson, D.M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair* *12*, 620–636.

Janssens, V., and Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* *353*, 417–439.

Javeshghani, D., Schiffrin, E.L., Sairam, M.R., and Touyz, R.M. (2009). Potentiation of vascular oxidative stress and nitric oxide-mediated endothelial dysfunction by high-fat diet in a mouse model of estrogen deficiency and hyperandrogenemia. *J. Am. Soc. Hypertens. JASH* *3*, 295–305.

Jenkins, R.W., Idkowiak-Baldys, J., Simbari, F., Canals, D., Roddy, P., Riner, C.D., Clarke, C.J., and Hannun, Y.A. (2011). A novel mechanism of lysosomal acid sphingomyelinase maturation: requirement for carboxyl-terminal proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* *286*, 3777–3788.

Jette, N., and Lees-Miller, S.P. (2015). The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *117*, 194–205.

Jin Jung, K., Hyun Kim, D., Kyeong Lee, E., Woo Song, C., Pal Yu, B., and Young Chung, H. (2013). Oxidative stress induces inactivation of protein phosphatase 2A, promoting proinflammatory NF- κ B in aged rat kidney. *Free Radic. Biol. Med.* *61*, 206–217.

Jones, D.P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *295*, C849–C868.

Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., and Krysko, D.V. (2013). Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* *38*, 209–223.

Kamata, H., Honda, S.-I., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., and Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* *120*, 649–661.

Kanellis, D.C., Bursac, S., Tsiichlis, P.N., Volarevic, S., and Eliopoulos, A.G. (2014). Physical and functional interaction of the TPL2 kinase with nucleophosmin. *Oncogene*.

- Kang, Y.J., Seit-Nebi, A., Davis, R.J., and Han, J. (2006). Multiple activation mechanisms of p38alpha mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* *281*, 26225–26234.
- Kang, Y.J., Chen, J., Otsuka, M., Mols, J., Ren, S., Wang, Y., and Han, J. (2008). Macrophage deletion of p38alpha partially impairs lipopolysaccharide-induced cellular activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 5075–5082.
- 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.
- Kawagishi, H., Nakamura, H., Maruyama, M., Mizutani, S., Sugimoto, K., Takagi, M., and Sugimoto, M. (2010). ARF suppresses tumor angiogenesis through translational control of VEGFA mRNA. *Cancer Res.* *70*, 4749–4758.
- Kerr, L.E., Birse-Archbold, J.-L.A., Short, D.M., McGregor, A.L., Heron, I., Macdonald, D.C., Thompson, J., Carlson, G.J., Kelly, J.S., McCulloch, J., et al. (2007). Nucleophosmin is a novel Bax chaperone that regulates apoptotic cell death. *Oncogene* *26*, 2554–2562.
- Khandelwal, N., Simpson, J., Taylor, G., Rafique, S., Whitehouse, A., Hiscox, J., and Stark, L.A. (2011). Nucleolar NF- κ B/RelA mediates apoptosis by causing cytoplasmic relocalization of nucleophosmin. *Cell Death Differ.* *18*, 1889–1903.
- Kim, A.L., Labasi, J.M., Zhu, Y., Tang, X., McClure, K., Gabel, C.A., Athar, M., and Bickers, D.R. (2005). Role of p38 MAPK in UVB-induced inflammatory responses in the skin of SKH-1 hairless mice. *J. Invest. Dermatol.* *124*, 1318–1325.
- Kim, H.J., Oh, J.E., Kim, S.W., Chun, Y.J., and Kim, M.Y. (2008). Ceramide induces p38 MAPK-dependent apoptosis and Bax translocation via inhibition of Akt in HL-60 cells. *Cancer Lett.* *260*, 88–95.
- Kim, H.-J., Ha, S., Lee, H.Y., and Lee, K.-J. (2015). ROSics: chemistry and proteomics of cysteine modifications in redox biology. *Mass Spectrom. Rev.* *34*, 184–208.
- Kim, J.J., Lee, S.B., Park, J.K., and Yoo, Y.D. (2010). TNF-alpha-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X(L). *Cell Death Differ.* *17*, 1420–1434.
- Kinumi, T., Ogawa, Y., Kimata, J., Saito, Y., Yoshida, Y., and Niki, E. (2005). Proteomic characterization of oxidative dysfunction in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by exposure to oxidized LDL. *Free Radic. Res.* *39*, 1335–1344.
- Klaunig, J.E., Wang, Z., Pu, X., and Zhou, S. (2011). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *254*, 86–99.

- Kobayashi, M., Nishita, M., Mishima, T., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2006). MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration. *EMBO J.* 25, 713–726.
- Koike, A., Nishikawa, H., Wu, W., Okada, Y., Venkitaraman, A.R., and Ohta, T. (2010). Recruitment of phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage through RNF8-dependent ubiquitin conjugates. *Cancer Res.* 70, 6746–6756.
- Kolesnick, R., and Fuks, Z. (2003). Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 22, 5897–5906.
- Kolesnick, R.N., Goñi, F.M., and Alonso, A. (2000). Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J. Cell. Physiol.* 184, 285–300.
- Kornhuber, J., Tripal, P., Reichel, M., Mühle, C., Rhein, C., Muehlbacher, M., Groemer, T.W., and Gulbins, E. (2010). Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMA)s: a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 26, 9–20.
- Kornhuber, J., Muehlbacher, M., Trapp, S., Pechmann, S., Friedl, A., Reichel, M., Mühle, C., Terfloth, L., Groemer, T.W., Spitzer, G.M., et al. (2011). Identification of novel functional inhibitors of acid sphingomyelinase. *PloS One* 6, e23852.
- Korpela, E., and Liu, S.K. (2014). Endothelial perturbations and therapeutic strategies in normal tissue radiation damage. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 9, 266.
- Kwak, Y.-D., Wang, B., Li, J.J., Wang, R., Deng, Q., Diao, S., Chen, Y., Xu, R., Masliah, E., Xu, H., et al. (2012). Upregulation of the E3 ligase NEDD4-1 by oxidative stress degrades IGF-1 receptor protein in neurodegeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 10971–10981.
- Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2012). Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol. Rev.* 92, 689–737.
- Labay, E., Efimova, E.V., Quarshie, B.K., Golden, D.W., Weichselbaum, R.R., and Kron, S.J. (2011). Ionizing radiation-induced foci persistence screen to discover enhancers of accelerated senescence. *Int. J. High Throughput Screen.* 2, 1–13.
- Lameris, R., de Bruin, R.C.G., Schneiders, F.L., van Bergen en Henegouwen, P.M.P., Verheul, H.M.W., de Gruijl, T.D., and van der Vliet, H.J. (2014). Bispecific antibody platforms for cancer immunotherapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 92, 153–165.
- Landis, G.N., and Tower, J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev.* 126, 365–379.
- Landmesser, U., Spiekermann, S., Preuss, C., Sorrentino, S., Fischer, D., Manes, C., Mueller, M., and Drexler, H. (2007). Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 943–948.

- Lapenna, S., and Giordano, A. (2009). Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 547–566.
- Lauretti, E., and Praticò, D. (2015). Glucose deprivation increases tau phosphorylation via P38 mitogen-activated protein kinase. *Aging Cell.*
- Lavelle, C., and Foray, N. (2014). Chromatin structure and radiation-induced DNA damage: from structural biology to radiobiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 49, 84–97.
- Lavoie, J.N., Hickey, E., Weber, L.A., and Landry, J. (1993). Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Biol. Chem.* 268, 24210–24214.
- Law, A.H.Y., Tam, A.H.M., Lee, D.C.W., and Lau, A.S.Y. (2013). A Role for Protein Phosphatase 2A in Regulating p38 Mitogen Activated Protein Kinase Activation and Tumor Necrosis Factor-Alpha Expression during Influenza Virus Infection. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 7327–7340.
- Leach, J.K., Van Tuyle, G., Lin, P.S., Schmidt-Ullrich, R., and Mikkelsen, R.B. (2001). Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res.* 61, 3894–3901.
- Leach, J.K., Black, S.M., Schmidt-Ullrich, R.K., and Mikkelsen, R.B. (2002). Activation of constitutive nitric-oxide synthase activity is an early signaling event induced by ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* 277, 15400–15406.
- Leal, E.C., Aveleira, C.A., Castilho, A.F., Serra, A.M., Baptista, F.I., Hosoya, K.-I., Forrester, J.V., and Ambrósio, A.F. (2009). High glucose and oxidative/nitrosative stress conditions induce apoptosis in retinal endothelial cells by a caspase-independent pathway. *Exp. Eye Res.* 88, 983–991.
- 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.
- Lee, T., Kim, S.J., and Sumpio, B.E. (2003). Role of PP2A in the regulation of p38 MAPK activation in bovine aortic endothelial cells exposed to cyclic strain. *J. Cell. Physiol.* 194, 349–355.
- Lee, Y.-C., Chang, A.-Y., Lin-Feng, M.-H., Tsou, W.-I., Chiang, I.-H., and Lai, M.-Z. (2012). Paxillin phosphorylation by JNK and p38 is required for NFAT activation. *Eur. J. Immunol.* 42, 2165–2175.
- Levinthal, D.J., and Defranco, D.B. (2005). Reversible oxidation of ERK-directed protein phosphatases drives oxidative toxicity in neurons. *J. Biol. Chem.* 280, 5875–5883.
- Li, Z., and Hann, S.R. (2013). Nucleophosmin is essential for c-Myc nucleolar localization and c-Myc-mediated rDNA transcription. *Oncogene* 32, 1988–1994.

- Li, J., Gorospe, M., Hutter, D., Barnes, J., Keyse, S.M., and Liu, Y. (2001). Transcriptional induction of MKP-1 in response to stress is associated with histone H3 phosphorylation-acetylation. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 8213–8224.
- Li, J., Zhang, X., Sejas, D.P., Bagby, G.C., and Pang, Q. (2004). Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J. Biol. Chem.* *279*, 41275–41279.
- Li, J., Zhang, X., Sejas, D.P., and Pang, Q. (2005). Negative regulation of p53 by nucleophosmin antagonizes stress-induced apoptosis in human normal and malignant hematopoietic cells. *Leuk. Res.* *29*, 1415–1423.
- Li, J., Sejas, D.P., Burma, S., Chen, D.J., and Pang, Q. (2007). Nucleophosmin suppresses oncogene-induced apoptosis and senescence and enhances oncogenic cooperation in cells with genomic instability. *Carcinogenesis* *28*, 1163–1170.
- Li, X., Gulbins, E., and Zhang, Y. (2012). Oxidative stress triggers Ca-dependent lysosome trafficking and activation of acid sphingomyelinase. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *30*, 815–826.
- Liao, L., Zhou, Q., Song, Y., Wu, W., Yu, H., Wang, S., Chen, Y., Ye, M., and Lu, L. (2013). Ceramide mediates Ox-LDL-induced human vascular smooth muscle cell calcification via p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *PloS One* *8*, e82379.
- Liao, W.C., Haimovitz-Friedman, A., Persaud, R.S., McLoughlin, M., Ehleiter, D., Zhang, N., Gatei, M., Lavin, M., Kolesnick, R., and Fuks, Z. (1999). Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. *J. Biol. Chem.* *274*, 17908–17917.
- Lim, M.J., and Wang, X.W. (2006). Nucleophosmin and human cancer. *Cancer Detect. Prev.* *30*, 481–490.
- Lin, C.P., Lynch, M.C., and Kochevar, I.E. (2000). Reactive oxidizing species produced near the plasma membrane induce apoptosis in bovine aorta endothelial cells. *Exp. Cell Res.* *259*, 351–359.
- Lin, C.Y., Liang, Y.C., and Yung, B.Y.-M. (2006). Nucleophosmin/B23 regulates transcriptional activation of E2F1 via modulating the promoter binding of NF-kappaB, E2F1 and pRB. *Cell. Signal.* *18*, 2041–2048.
- Lin, C.Y., Tan, B.C.-M., Liu, H., Shih, C.-J., Chien, K.-Y., Lin, C.-L., and Yung, B.Y.-M. (2010). Dephosphorylation of nucleophosmin by PP1 β facilitates pRB binding and consequent E2F1-dependent DNA repair. *Mol. Biol. Cell* *21*, 4409–4417.
- Lin, S.-P., Lee, Y.-T., Wang, J.-Y., Miller, S.A., Chiou, S.-H., Hung, M.-C., and Hung, S.-C. (2012). Survival of cancer stem cells under hypoxia and serum depletion via decrease in PP2A activity and activation of p38-MAPKAPK2-Hsp27. *PloS One* *7*, e49605.

- Lindahl, T., and Wood, R.D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science* 286, 1897–1905.
- Lindström, M.S. (2011). NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochem. Res. Int.* 2011, 195209.
- Liu, Q., and Hofmann, P.A. (2004). Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H2204–H2212.
- Liu, R.-M., Choi, J., Wu, J.-H., Gaston Pravia, K.A., Lewis, K.M., Brand, J.D., Mochel, N.S.R., Krzywanski, D.M., Lambeth, J.D., Hagood, J.S., et al. (2010). Oxidative modification of nuclear mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is involved in transforming growth factor beta1-induced expression of plasminogen activator inhibitor 1 in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 285, 16239–16247.
- Liu, W.-H., Chou, W.-M., and Chang, L.-S. (2013). p38 MAPK/PP2A α /TTP pathway on the connection of TNF- α and caspases activation on hydroquinone-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 34, 818–827.
- Liu, X., Liu, D., Qian, D., Dai, J., An, Y., Jiang, S., Stanley, B., Yang, J., Wang, B., Liu, X., et al. (2012). Nucleophosmin (NPM1/B23) interacts with activating transcription factor 5 (ATF5) protein and promotes proteasome- and caspase-dependent ATF5 degradation in hepatocellular carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 287, 19599–19609.
- Lo, S.K., Janakidevi, K., Lai, L., and Malik, A.B. (1993). Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. *Am. J. Physiol.* 264, L406–L412.
- Lomax, M.E., Folkes, L.K., and O'Neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* 25, 578–585.
- Loubeau, G., Boudra, R., Maquaire, S., Lours-Calet, C., Beaudoin, C., Verrelle, P., and Morel, L. (2014). NPM1 Silencing Reduces Tumour Growth and MAPK Signalling in Prostate Cancer Cells. *PLoS One* 9, e96293.
- Lu, C.Y., Lee, H.C., Fahn, H.J., and Wei, Y.H. (1999). Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutat. Res.* 423, 11–21.
- Lu, G., Kang, Y.J., Han, J., Herschman, H.R., Stefani, E., and Wang, Y. (2006). TAB-1 modulates intracellular localization of p38 MAP kinase and downstream signaling. *J. Biol. Chem.* 281, 6087–6095.
- Lum, H., and Malik, A.B. (1994). Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am. J. Physiol.* 267, L223–L241.
- Lum, H., and Roebuck, K.A. (2001). Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C719–C741.

- Ma, Z., Kanai, M., Kawamura, K., Kaibuchi, K., Ye, K., and Fukasawa, K. (2006). Interaction between ROCK II and nucleophosmin/B23 in the regulation of centrosome duplication. *Mol. Cell. Biol.* 26, 9016–9034.
- Maalouf, M., and Rho, J.M. (2008). Oxidative impairment of hippocampal long-term potentiation involves activation of protein phosphatase 2A and is prevented by ketone bodies. *J. Neurosci. Res.* 86, 3322–3330.
- Maalouf, M., Alphonse, G., Colliaux, A., Beuve, M., Trajkovic-Bodenec, S., Battiston-Montagne, P., Testard, I., Chapet, O., Bajard, M., Taucher-Scholz, G., et al. (2009). Different mechanisms of cell death in radiosensitive and radioresistant p53 mutated head and neck squamous cell carcinoma cell lines exposed to carbon ions and x-rays. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 74, 200–209.
- Maceyka, M., Harikumar, K.B., Milstien, S., and Spiegel, S. (2012). Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* 22, 50–60.
- Madamanchi, N.R., Vendrov, A., and Runge, M.S. (2005). Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 29–38.
- Mahaney, B.L., Meek, K., and Lees-Miller, S.P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem. J.* 417, 639–650.
- Mauguel, D.A., Jones, L., Chakravarty, D., Yang, C., and Carrier, F. (2004). Nucleophosmin sets a threshold for p53 response to UV radiation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3703–3711.
- Makni-Maalej, K., Chiandotto, M., Hurtado-Nedelec, M., Bedouhene, S., Gougerot-Pocidalo, M.-A., Dang, P.M.-C., and El-Benna, J. (2013). Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochem. Pharmacol.* 85, 92–100.
- Maraldi, T., Prata, C., Caliceti, C., Vieceli Dalla Sega, F., Zambonin, L., Fiorentini, D., and Hakim, G. (2010). VEGF-induced ROS generation from NAD(P)H oxidases protects human leukemic cells from apoptosis. *Int. J. Oncol.* 36, 1581–1589.
- Marampon, F., Gravina, G.L., Festuccia, C., Popov, V.M., Colapietro, E.A., Sanità, P., Musio, D., De Felice, F., Lenzi, A., Jannini, E.A., et al. (2015). Vitamin D protects endothelial cells from irradiation-induced senescence and apoptosis by modulating MAPK/Sirt1 axis. *J. Endocrinol. Invest.*
- Marathe, S., Schissel, S.L., Yellin, M.J., Beatini, N., Mintzer, R., Williams, K.J., and Tabas, I. (1998). Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 4081–4088.

- Martín, M., Terradas, M., Tusell, L., and Genescà, A. (2012). ATM and DNA-PKcs make a complementary couple in DNA double strand break repair. *Mutat. Res.*
- Mathias, S., Peña, L.A., and Kolesnick, R.N. (1998). Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.* 335 (Pt 3), 465–480.
- Matsumoto, T., Turesson, I., Book, M., Gerwins, P., and Claesson-Welsh, L. (2002). p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *J. Cell Biol.* 156, 149–160.
- Maynard, S., Schurman, S.H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N.C., and Bohr, V.A. (2009). Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 30, 2–10.
- Mazón, G., Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2010). SnapShot: Homologous recombination in DNA double-strand break repair. *Cell* 142, 646, 646.e1.
- Meijer, L. (2006). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Bull. Cancer (Paris)* 93, 41–53.
- Mendonca, M.S., Chin-Sinex, H., Dhaemers, R., Mead, L.E., Yoder, M.C., and Ingram, D.A. (2011). Differential mechanisms of x-ray-induced cell death in human endothelial progenitor cells isolated from cord blood and adults. *Radiat. Res.* 176, 208–216.
- Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol.* 196, 430–443.
- Mihaescu, A., Santén, S., Jeppsson, B., and Thorlacius, H. (2011). Rho kinase signalling mediates radiation-induced inflammation and intestinal barrier dysfunction. *Br. J. Surg.* 98, 124–131.
- Mikkelsen, R.B., and Wardman, P. (2003). Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22, 5734–5754.
- Mikule, K., Delaval, B., Kaldis, P., Jurczyk, A., Hergert, P., and Doxsey, S. (2007). Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest. *Nat. Cell Biol.* 9, 160–170.
- Milhas, D., Clarke, C.J., and Hannun, Y.A. (2010). Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids. *FEBS Lett.* 584, 1887–1894.
- Milliat, F., François, A., Tamarat, R., and Benderitter, M. (2008). [Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages]. *Ann. Cardiol. Angéiologie* 57, 139–148.
- Mirzapoiazova, T., Kolosova, I.A., Romer, L., Garcia, J.G.N., and Verin, A.D. (2005). The role of caldesmon in the regulation of endothelial cytoskeleton and migration. *J. Cell. Physiol.* 203, 520–528.

- Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., Wang, Y.W., and Murray, D. (2013). Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 22409–22435.
- Mollà, M., Gironella, M., Miquel, R., Tovar, V., Engel, P., Biete, A., Piqué, J.M., and Panés, J. (2003). Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *57*, 264–273.
- Mondal, S., Mandal, C., Sangwan, R., Chandra, S., and Mandal, C. (2010). Withanolide D induces apoptosis in leukemia by targeting the activation of neutral sphingomyelinase-ceramide cascade mediated by synergistic activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cancer* *9*, 239.
- Morgan, M.J., Kim, Y.-S., and Liu, Z. (2008). TNF α and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Res.* *18*, 343–349.
- Morris, S.W., Kirstein, M.N., Valentine, M.B., Dittmer, K., Shapiro, D.N., Look, A.T., and Saltman, D.L. (1995). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* *267*, 316–317.
- Mouthon, M.-A., Vereycken-Holler, V., Van der Meeren, A., and Gaugler, M.-H. (2003). Irradiation increases the interactions of platelets with the endothelium in vivo: analysis by intravital microscopy. *Radiat. Res.* *160*, 593–599.
- Muller, M. (2009). Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxid. Redox Signal.* *11*, 59–98.
- Nathan, C., and Ding, A. (2010). SnapShot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI). *Cell* *140*, 951–951.e2.
- Nebreda, A.R., and Porras, A. (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 257–260.
- Negi, S.S., and Olson, M.O.J. (2006). Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23. *J. Cell Sci.* *119*, 3676–3685.
- Niemöller, O., and Belka, C. (2009). Targeting death-receptors in radiation therapy. *Results Probl. Cell Differ.* *49*, 219–239.
- Noel, J.K., Crean, S., Claflin, J.E., Ranganathan, G., Linz, H., and Lahn, M. (2008). Systematic review to establish the safety profiles for direct and indirect inhibitors of p38 Mitogen-activated protein kinases for treatment of cancer. A systematic review of the literature. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* *25*, 323–330.
- Oaks, J., and Ogretmen, B. (2014). Regulation of PP2A by Sphingolipid Metabolism and Signaling. *Front. Oncol.* *4*, 388.

- Obin, M., Shang, F., Gong, X., Handelman, G., Blumberg, J., and Taylor, A. (1998). Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mechanistic insights using the thiol-specific oxidant diamide. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *12*, 561–569.
- Ogretmen, B., Schady, D., Usta, J., Wood, R., Kraveka, J.M., Luberto, C., Birbes, H., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2001). Role of ceramide in mediating the inhibition of telomerase activity in A549 human lung adenocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 24901–24910.
- Oh, C.W., Bump, E.A., Kim, J.S., Janigro, D., and Mayberg, M.R. (2001). Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation. *Radiat. Res.* *156*, 232–240.
- Okuda, M., Horn, H.F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A.G., Chan, P.K., Knudsen, E.S., Hofmann, I.A., Snyder, J.D., Bove, K.E., et al. (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* *103*, 127–140.
- Okuno, Y., Nakamura-Ishizu, A., Otsu, K., Suda, T., and Kubota, Y. (2012). Pathological neoangiogenesis depends on oxidative stress regulation by ATM. *Nat. Med.* *18*, 1208–1216.
- Okuwaki, M. (2008). The structure and functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *J. Biochem. (Tokyo)* *143*, 441–448.
- Okuwaki, M., Tsujimoto, M., and Nagata, K. (2002). The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. *Mol. Biol. Cell* *13*, 2016–2030.
- Oshikawa, J., Kim, S.-J., Furuta, E., Caliceti, C., Chen, G.-F., McKinney, R.D., Kuhr, F., Levitan, I., Fukai, T., and Ushio-Fukai, M. (2012). Novel role of p66Shc in ROS-dependent VEGF signaling and angiogenesis in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *302*, H724–H732.
- Owens, D.M., and Keyse, S.M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* *26*, 3203–3213.
- Pajares, M., Jiménez-Moreno, N., Dias, I.H.K., Debelec, B., Vucetic, M., Fladmark, K.E., Basaga, H., Ribaric, S., Milisav, I., and Cuadrado, A. (2015). Redox control of protein degradation. *Redox Biol.* *6*, 409–420.
- Panganiban, R.A.M., and Day, R.M. (2013). Inhibition of IGF-1R prevents ionizing radiation-induced primary endothelial cell senescence. *PloS One* *8*, e78589.
- Panganiban, R.-A.M., Snow, A.L., and Day, R.M. (2013a). Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 15931–15958.

- Panganiban, R.A.M., Mungunsukh, O., and Day, R.M. (2013b). X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells. *Int. J. Radiat. Biol.* *89*, 656–667.
- Papaharalambus, C.A., and Griendling, K.K. (2007). Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc. Med.* *17*, 48–54.
- Paris, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodiecici, P., Juan, G., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., and Kolesnick, R. (2001). Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* *293*, 293–297.
- Paron, I., D’Elia, A., D’Ambrosio, C., Scaloni, A., D’Aurizio, F., Prescott, A., Damante, G., and Tell, G. (2004). A proteomic approach to identify early molecular targets of oxidative stress in human epithelial lens cells. *Biochem. J.* *378*, 929–937.
- Peña, L.A., Fuks, Z., and Kolesnick, R.N. (2000). Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res.* *60*, 321–327.
- Peng, Y., Woods, R.G., Beamish, H., Ye, R., Lees-Miller, S.P., Lavin, M.F., and Bedford, J.S. (2005). Deficiency in the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase causes down-regulation of ATM. *Cancer Res.* *65*, 1670–1677.
- Penthala, N.R., Crooks, P.A., Freeman, M.L., and Sekhar, K.R. (2015). Development and validation of a novel assay to identify radiosensitizers that target nucleophosmin 1. *Bioorg. Med. Chem.*
- Peregrin, S., Jurado-Pueyo, M., Campos, P.M., Sanz-Moreno, V., Ruiz-Gomez, A., Crespo, P., Mayor, F., and Murga, C. (2006). Phosphorylation of p38 by GRK2 at the docking groove unveils a novel mechanism for inactivating p38MAPK. *Curr. Biol. CB* *16*, 2042–2047.
- Pietersma, A., Tilly, B.C., Gaestel, M., de Jong, N., Lee, J.C., Koster, J.F., and Sluiter, W. (1997). p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *230*, 44–48.
- Pin, A.-L., Houle, F., Guillonneau, M., Paquet, E.R., Simard, M.J., and Huot, J. (2012). miR-20a represses endothelial cell migration by targeting MKK3 and inhibiting p38 MAP kinase activation in response to VEGF. *Angiogenesis* *15*, 593–608.
- Pober, J.S., Min, W., and Bradley, J.R. (2009). Mechanisms of endothelial dysfunction, injury, and death. *Annu. Rev. Pathol.* *4*, 71–95.
- Poletto, M., Lirussi, L., Wilson, D.M., and Tell, G. (2014). Nucleophosmin modulates stability, activity, and nucleolar accumulation of base excision repair proteins. *Mol. Biol. Cell* *25*, 1641–1652.

- Prinos, P., Lacoste, M.-C., Wong, J., Bonneau, A.-M., and Georges, E. (2011). Mutation of cysteine 21 inhibits nucleophosmin/B23 oligomerization and chaperone activity. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2, 24–30.
- Prise, K.M., Schettino, G., Folkard, M., and Held, K.D. (2005). New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol.* 6, 520–528.
- Qi, M., and Elion, E.A. (2005). MAP kinase pathways. *J. Cell Sci.* 118, 3569–3572.
- Qi, W., Shakalya, K., Stejskal, A., Goldman, A., Beeck, S., Cooke, L., and Mahadevan, D. (2008). NSC348884, a nucleophosmin inhibitor disrupts oligomer formation and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene* 27, 4210–4220.
- Qiu, H., Edmunds, T., Baker-Malcolm, J., Karey, K.P., Estes, S., Schwarz, C., Hughes, H., and Van Patten, S.M. (2003). Activation of human acid sphingomyelinase through modification or deletion of C-terminal cysteine. *J. Biol. Chem.* 278, 32744–32752.
- Racz, B., Hanto, K., Tapodi, A., Solti, I., Kalman, N., Jakus, P., Kovacs, K., Debreceni, B., Gallyas, F., and Sumegi, B. (2010). Regulation of MKP-1 expression and MAPK activation by PARP-1 in oxidative stress: a new mechanism for the cytoplasmic effect of PARP-1 activation. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1978–1988.
- Ramos-Echazábal, G., China, G., García-Fernández, R., and Pons, T. (2012). In silico studies of potential phosphoresidues in the human nucleophosmin/B23: its kinases and related biological processes. *J. Cell. Biochem.* 113, 2364–2374.
- Ramsamooj, P., Notario, V., and Dritschilo, A. (1995). Modification of nucleolar protein B23 after exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 143, 158–164.
- Rao, R.K., and Clayton, L.W. (2002). Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 610–616.
- Ray, P.D., Huang, B.-W., and Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24, 981–990.
- Reboutier, D., Troadec, M.-B., Cremet, J.-Y., Fukasawa, K., and Prigent, C. (2012). Nucleophosmin/B23 activates Aurora A at the centrosome through phosphorylation of serine 89. *J. Cell Biol.* 197, 19–26.
- Ren, Z., Aerts, J.L., Pen, J.J., Heirman, C., Breckpot, K., and De Grève, J. (2014). Phosphorylated STAT3 physically interacts with NPM and transcriptionally enhances its expression in cancer. *Oncogene*.
- Rhee, S.G., Chang, T.-S., Bae, Y.S., Lee, S.-R., and Kang, S.W. (2003). Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 14, S211–S215.
- Riethmüller, J., Anthonysamy, J., Serra, E., Schwab, M., Döring, G., and Gulbins, E. (2009). Therapeutic efficacy and safety of amitriptyline in patients with cystic fibrosis. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 24, 65–72.

- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671–674.
- Rithidech, K.N., Honikel, L., Rieger, R., Xie, W., Fischer, T., and Simon, S.R. (2009). Protein-expression profiles in mouse blood-plasma following acute whole-body exposure to (137)Cs gamma rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 85, 432–447.
- Robbins, M.E.C., and Zhao, W. (2004). Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review. *Int. J. Radiat. Biol.* 80, 251–259.
- Rossetto, D., Truman, A.W., Kron, S.J., and Côté, J. (2010). Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 4543–4552.
- Rotolo, J., Stancevic, B., Zhang, J., Hua, G., Fuller, J., Yin, X., Haimovitz-Friedman, A., Kim, K., Qian, M., Cardó-Vila, M., et al. (2012). Anti-ceramide antibody prevents the radiation gastrointestinal syndrome in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 1786–1790.
- Rousseau, M., Gaugler, M.-H., Rodallec, A., Bonnaud, S., Paris, F., and Corre, I. (2011). RhoA GTPase regulates radiation-induced alterations in endothelial cell adhesion and migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 750–755.
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., and Huot, J. (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 15, 2169–2177.
- Roussel, L., Houle, F., Chan, C., Yao, Y., Bérubé, J., Olivenstein, R., Martin, J.G., Huot, J., Hamid, Q., Ferri, L., et al. (2010). IL-17 promotes p38 MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 4531–4537.
- Rubanyi, G.M., and Botelho, L.H. (1991). Endothelins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 5, 2713–2720.
- Sahni, A., Arévalo, M.T., Sahni, S.K., and Simpson-Haidaris, P.J. (2009). The VE-cadherin binding domain of fibrinogen induces endothelial barrier permeability and enhances transendothelial migration of malignant breast epithelial cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 125, 577–584.
- Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Guszczynski, T., Copeland, T.D., Yamaguchi, H., Appella, E., Fornace, A.J., and Ashwell, J.D. (2005). Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat. Immunol.* 6, 390–395.
- Sancho, P., Bertran, E., Caja, L., Carmona-Cuenca, I., Murillo, M.M., and Fabregat, I. (2009). The inhibition of the epidermal growth factor (EGF) pathway enhances TGF-beta-induced apoptosis in rat hepatoma cells through inducing oxidative stress coincident with a change in the expression pattern of the NADPH oxidases (NOX) isoforms. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 253–263.

- Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *11*, 173–186.
- Schaeffer, H.J., and Weber, M.J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2435–2444.
- Schweitzer, K.S., Hatoum, H., Brown, M.B., Gupta, M., Justice, M.J., Beteck, B., Van Demark, M., Gu, Y., Presson, R.G., Hubbard, W.C., et al. (2011). Mechanisms of lung endothelial barrier disruption induced by cigarette smoke: role of oxidative stress and ceramides. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *301*, L836–L846.
- Scully, R., and Xie, A. (2013). Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat. Res.* *750*, 5–14.
- Sekhar, K.R., Reddy, Y.T., Reddy, P.N., Crooks, P.A., Venkateswaran, A., McDonald, W.H., Geng, L., Sasi, S., Van Der Waal, R.P., Roti, J.L.R., et al. (2011). The novel chemical entity YTR107 inhibits recruitment of nucleophosmin to sites of DNA damage, suppressing repair of DNA double-strand breaks and enhancing radiosensitization. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 6490–6499.
- Sekhar, K.R., Benamar, M., Venkateswaran, A., Sasi, S., Penthala, N.R., Crooks, P.A., Hann, S.R., Geng, L., Balusu, R., Abbas, T., et al. (2014). Targeting nucleophosmin 1 represents a rational strategy for radiation sensitization. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *89*, 1106–1114.
- Shadyro, O.I., Yurkova, I.L., and Kisel, M.A. (2002). Radiation-induced peroxidation and fragmentation of lipids in a model membrane. *Int. J. Radiat. Biol.* *78*, 211–217.
- Shandilya, J., Senapati, P., Dhanasekaran, K., Bangalore, S.S., Kumar, M., Hari Kishore, A., Bhat, A., Kodaganur, G.S., and Kundu, T.K. (2014). Phosphorylation of multifunctional nucleolar protein nucleophosmin (NPM1) by aurora kinase B is critical for mitotic progression. *FEBS Lett.* *588*, 2198–2205.
- Shang, Z., Yu, L., Lin, Y.-F., Matsunaga, S., Shen, C.-Y., and Chen, B.P.C. (2014). DNA-PKcs activates the Chk2-Brcal pathway during mitosis to ensure chromosomal stability. *Oncogenesis* *3*, e85.
- Shang, Z.-F., Huang, B., Xu, Q.-Z., Zhang, S.-M., Fan, R., Liu, X.-D., Wang, Y., and Zhou, P.-K. (2010). Inactivation of DNA-dependent protein kinase leads to spindle disruption and mitotic catastrophe with attenuated checkpoint protein 2 Phosphorylation in response to DNA damage. *Cancer Res.* *70*, 3657–3666.
- Shibata, A., and Jeggo, P.A. (2014). DNA double-strand break repair in a cellular context. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* *26*, 243–249.
- Shimada, N., Rios, I., Moran, H., Sayers, B., and Hubbard, K. (2009). p38 MAP kinase-dependent regulation of the expression level and subcellular distribution of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and its involvement in cellular senescence in normal human fibroblasts. *RNA Biol.* *6*, 293–304.

Shimokawa, H., and Takeshita, A. (1995). Endothelium-dependent regulation of the cardiovascular system. *Intern. Med. Tokyo Jpn.* 34, 939–946.

Shrivastav, M., De Haro, L.P., and Nickoloff, J.A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* 18, 134–147.

Simoneau, B., Houle, F., and Huot, J. (2012). Regulation of endothelial permeability and transendothelial migration of cancer cells by tropomyosin-1 phosphorylation. *Vasc. Cell* 4, 18.

Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572.

Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31–39.

Smith, J., Tho, L.M., Xu, N., and Gillespie, D.A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv. Cancer Res.* 108, 73–112.

Soloviev, A.I., Tishkin, S.M., Parshikov, A.V., Ivanova, I.V., Goncharov, E.V., and Gurney, A.M. (2003). Mechanisms of endothelial dysfunction after ionized radiation: selective impairment of the nitric oxide component of endothelium-dependent vasodilation. *Br. J. Pharmacol.* 138, 837–844.

Son, Y., Kim, S., Chung, H.-T., and Pae, H.-O. (2013). Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods Enzymol.* 528, 27–48.

Spitz, D.R., Azzam, E.I., Li, J.J., and Gius, D. (2004). Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev.* 23, 311–322.

Stevens, T., Garcia, J.G., Shasby, D.M., Bhattacharya, J., and Malik, A.B. (2000). Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, L419–L422.

Stiff, T., O’Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Löbrich, M., and Jeggo, P.A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 64, 2390–2396.

Stone, H.B., Coleman, C.N., Anscher, M.S., and McBride, W.H. (2003). Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol.* 4, 529–536.

Sullivan, J.C., and Pollock, J.S. (2006). Coupled and uncoupled NOS: separate but equal? Uncoupled NOS in endothelial cells is a critical pathway for intracellular signaling. *Circ. Res.* 98, 717–719.

Sumpio, B.E., Riley, J.T., and Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1508–1512.

- Sun, Y., Tang, S., Jin, X., Zhang, C., Zhao, W., and Xiao, X. (2013). Involvement of the p38 MAPK signaling pathway in S-phase cell-cycle arrest induced by Furazolidone in human hepatoma G2 cells. *J. Appl. Toxicol. JAT* 33, 1500–1505.
- Supiot, S., and Paris, F. (2012). [Radiobiology dedicated to endothelium]. *Cancer Radiothérapie J. Société Fr. Radiothérapie Oncol.* 16, 11–15.
- Swaminathan, V., Kishore, A.H., Febitha, K.K., and Kundu, T.K. (2005). Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7534–7545.
- Szebeni, A., and Olson, M.O. (1999). Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 8, 905–912.
- Takekawa, M., Adachi, M., Nakahata, A., Nakayama, I., Itoh, F., Tsukuda, H., Taya, Y., and Imai, K. (2000). p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J.* 19, 6517–6526.
- Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariati, S., Cohen, P., and Comb, M.J. (1996). FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J.* 15, 4629–4642.
- Tate, C.M., Blosser, W., Wyss, L., Evans, G., Xue, Q., Pan, Y., and Stancato, L. (2013). LY2228820 dimesylate, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, reduces angiogenic endothelial cord formation in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 288, 6743–6753.
- Tchkonia, T., Zhu, Y., van Deursen, J., Campisi, J., and Kirkland, J.L. (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J. Clin. Invest.* 123, 966–972.
- Thompson, J., Finlayson, K., Salvo-Chirnside, E., MacDonald, D., McCulloch, J., Kerr, L., and Sharkey, J. (2008). Characterisation of the Bax-nucleophosmin interaction: the importance of the Bax C-terminus. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 13, 394–403.
- Thornton, T.M., and Rincon, M. (2009). Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 44–51.
- Tokuyama, Y., Horn, H.F., Kawamura, K., Tarapore, P., and Fukasawa, K. (2001). Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J. Biol. Chem.* 276, 21529–21537.
- Trempelec, N., Dave-Coll, N., and Nebreda, A.R. (2013a). SnapShot: p38 MAPK substrates. *Cell* 152, 924–924.e1.
- Trempelec, N., Dave-Coll, N., and Nebreda, A.R. (2013b). SnapShot: p38 MAPK signaling. *Cell* 152, 656–656.e1.

- Truong, T.H., and Carroll, K.S. (2013). Redox regulation of protein kinases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *48*, 332–356.
- Uhlik, M.T., Abell, A.N., Johnson, N.L., Sun, W., Cuevas, B.D., Lobel-Rice, K.E., Horne, E.A., Dell'Acqua, M.L., and Johnson, G.L. (2003). Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat. Cell Biol.* *5*, 1104–1110.
- Ungvari, Z., Podlutzky, A., Sosnowska, D., Tucsek, Z., Toth, P., Deak, F., Gautam, T., Csiszar, A., and Sonntag, W.E. (2013). Ionizing radiation promotes the acquisition of a senescence-associated secretory phenotype and impairs angiogenic capacity in cerebrovascular endothelial cells: role of increased DNA damage and decreased DNA repair capacity in microvascular radiosensitivity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *68*, 1443–1457.
- Urushihara, Y., Kobayashi, J., Matsumoto, Y., Komatsu, K., Oda, S., and Mitani, H. (2012). DNA-PK inhibition causes a low level of H2AX phosphorylation and homologous recombination repair in Medaka (*Oryzias latipes*) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *429*, 131–136.
- Ushio-Fukai, M., Tang, Y., Fukai, T., Dikalov, S.I., Ma, Y., Fujimoto, M., Quinn, M.T., Pagano, P.J., Johnson, C., and Alexander, R.W. (2002). Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ. Res.* *91*, 1160–1167.
- Valerie, K., Yacoub, A., Hagan, M.P., Curiel, D.T., Fisher, P.B., Grant, S., and Dent, P. (2007). Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Mol. Cancer Ther.* *6*, 789–801.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* *160*, 1–40.
- Vandenbroucke, E., Mehta, D., Minshall, R., and Malik, A.B. (2008). Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1123*, 134–145.
- Van Der Meeren, A., Squiban, C., Gourmelon, P., Lafont, H., and Gaugler, M.H. (1999). Differential regulation by IL-4 and IL-10 of radiation-induced IL-6 and IL-8 production and ICAM-1 expression by human endothelial cells. *Cytokine* *11*, 831–838.
- Van der Meeren, A., Vandamme, M., Squiban, C., Gaugler, M.-H., and Mouthon, M.-A. (2003). Inflammatory reaction and changes in expression of coagulation proteins on lung endothelial cells after total-body irradiation in mice. *Radiat. Res.* *160*, 637–646.
- Vane, J.R., Anggård, E.E., and Botting, R.M. (1990). Regulatory functions of the vascular endothelium. *N. Engl. J. Med.* *323*, 27–36.

- Van Laethem, A., Van Kelst, S., Lippens, S., Declercq, W., Vandenabeele, P., Janssens, S., Vandenheede, J.R., Garmyn, M., and Agostinis, P. (2004). Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 1946–1948.
- Vaseva, A.V., and Moll, U.M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochim. Biophys. Acta* *1787*, 414–420.
- Venable, M.E., Lee, J.Y., Smyth, M.J., Bielawska, A., and Obeid, L.M. (1995). Role of ceramide in cellular senescence. *J. Biol. Chem.* *270*, 30701–30708.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., et al. (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* *380*, 75–79.
- Vit, J.-P., and Rosselli, F. (2003). Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis. *Oncogene* *22*, 8645–8652.
- Vuillez, J.-P. (2005). Radiothérapie métabolique: état et perspectives. *Médecin Nucléaire* *29*.
- Wagener, F.A., Feldman, E., de Witte, T., and Abraham, N.G. (1997). Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* *216*, 456–463.
- Wang, J.C., and Bennett, M. (2012). Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ. Res.* *111*, 245–259.
- Wang, X.Z., and Ron, D. (1996). Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* *272*, 1347–1349.
- Wang, H.-Y., Liu, Z.-S., Qiu, L., Guo, J., Li, Y.-F., Zhang, J., Wang, T.-J., and Liu, X.-D. (2015a). Knockdown of Wip1 Enhances Sensitivity to Radiation in HeLa Cells Through Activation of p38 MAPK. *Oncol. Res.* *22*, 225–233.
- Wang, Q., Zhou, S., Wang, J.-Y., Cao, J., Zhang, X., Wang, J., Han, K., Cheng, Q., Qiu, G., Zhao, Y., et al. (2015b). RACK1 antagonizes TNF- α -induced cell death by promoting p38 activation. *Sci. Rep.* *5*, 14298.
- Wang, Q.-Q., Zhang, Z.-Y., Xiao, J.-Y., Yi, C., Li, L.-Z., Huang, Y., and Yun, J.-P. (2011a). Knockdown of nucleophosmin induces S-phase arrest in HepG2 cells. *Chin. J. Cancer* *30*, 853–860.
- Wang, W., Budhu, A., Forgues, M., and Wang, X.W. (2005). Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat. Cell Biol.* *7*, 823–830.

Wang, Y., Zang, Q.S., Liu, Z., Wu, Q., Maass, D., Dulan, G., Shaul, P.W., Melito, L., Frantz, D.E., Kilgore, J.A., et al. (2011b). Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *301*, C695–C704.

Wang, Z., Gall, J.M., Bonegio, R., Havasi, A., Illanes, K., Schwartz, J.H., and Borkan, S.C. (2013). Nucleophosmin, a critical Bax cofactor in ischemia-induced cell death. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 1916–1924.

Wassmann, S., Wassmann, K., and Nickenig, G. (2004). Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* *44*, 381–386.

Wentworth, C.C., Alam, A., Jones, R.M., Nusrat, A., and Neish, A.S. (2011). Enteric commensal bacteria induce extracellular signal-regulated kinase pathway signaling via formyl peptide receptor-dependent redox modulation of dual specific phosphatase 3. *J. Biol. Chem.* *286*, 38448–38455.

Westermarck, J., Li, S.P., Kallunki, T., Han, J., and Kähäri, V.M. (2001). p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 2373–2383.

Whitmarsh, A.J. (2006). The JIP family of MAPK scaffold proteins. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 828–832.

Widlak, P., Jelonek, K., Wojakowska, A., Pietrowska, M., Polanska, J., Marczak, Ł., Miszczyk, L., and Składowski, K. (2015). Serum Proteome Signature of Radiation Response: Upregulation of Inflammation-Related Factors and Downregulation of Apolipoproteins and Coagulation Factors in Cancer Patients Treated With Radiation Therapy-A Pilot Study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *92*, 1108–1115.

Woo, R.A., McLure, K.G., Lees-Miller, S.P., Rancourt, D.E., and Lee, P.W. (1998). DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* *394*, 700–704.

Wood, C.D., Thornton, T.M., Sabio, G., Davis, R.A., and Rincon, M. (2009). Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage. *Int. J. Biol. Sci.* *5*, 428–437.

Wu, M.H., and Yung, B.Y.M. (2002). UV stimulation of nucleophosmin/B23 expression is an immediate-early gene response induced by damaged DNA. *J. Biol. Chem.* *277*, 48234–48240.

Wu, M.H., Chang, J.H., and Yung, B.Y.M. (2002). Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression. *Carcinogenesis* *23*, 93–100.

- Wu, X., Xiong, M., Xu, C., Duan, L., Dong, Y., Luo, Y., Niu, T., and Lu, C. (2015). Resveratrol induces apoptosis of human chronic myelogenous leukemia cells in vitro through p38 and JNK-regulated H2AX phosphorylation. *Acta Pharmacol. Sin.* *36*, 353–361.
- Xia, Z., Liu, M., Wu, Y., Sharma, V., Luo, T., Ouyang, J., and McNeill, J.H. (2006). N-acetylcysteine attenuates TNF- α -induced human vascular endothelial cell apoptosis and restores eNOS expression. *Eur. J. Pharmacol.* *550*, 134–142.
- Yan, F., Wang, Y., Wu, X., Peshavariya, H.M., Dusting, G.J., Zhang, M., and Jiang, F. (2014). Nox4 and redox signaling mediate TGF- β -induced endothelial cell apoptosis and phenotypic switch. *Cell Death Dis.* *5*, e1010.
- Yan, L., Guo, S., Brault, M., Harmon, J., Robertson, R.P., Hamid, R., Stein, R., and Yang, E. (2012). The B55 α -containing PP2A holoenzyme dephosphorylates FOXO1 in islet β -cells under oxidative stress. *Biochem. J.* *444*, 239–247.
- Yang, J., Yu, Y., Hamrick, H.E., and Duerksen-Hughes, P.J. (2003). ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* *24*, 1571–1580.
- Yao, J., Fu, C., Ding, X., Guo, Z., Zenreski, A., Chen, Y., Ahmed, K., Liao, J., Dou, Z., and Yao, X. (2004). Nek2A kinase regulates the localization of numatrin to centrosome in mitosis. *FEBS Lett.* *575*, 112–118.
- Yarnold, J., and Brotons, M.-C.V. (2010). Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* *97*, 149–161.
- Yazdanpanah, B., Wiegmann, K., Tchikov, V., Krut, O., Pongratz, C., Schramm, M., Kleinridders, A., Wunderlich, T., Kashkar, H., Utermöhlen, O., et al. (2009). Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase. *Nature* *460*, 1159–1163.
- Yi, S., Wen, L., He, J., Wang, Y., Zhao, F., Zhao, J., Zhao, Z., Cui, G., and Chen, Y. (2015). Deguelin, a selective silencer of the NPM1 mutant, potentiates apoptosis and induces differentiation in AML cells carrying the NPM1 mutation. *Ann. Hematol.* *94*, 201–210.
- Yin, Y., Liu, W., Ji, G., and Dai, Y. (2013). The essential role of p38 MAPK in mediating the interplay of oxLDL and IL-10 in regulating endothelial cell apoptosis. *Eur. J. Cell Biol.* *92*, 150–159.
- Yoshizuka, N., Chen, R.M., Xu, Z., Liao, R., Hong, L., Hu, W.-Y., Yu, G., Han, J., Chen, L., and Sun, P. (2012). A novel function of p38-regulated/activated kinase in endothelial cell migration and tumor angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 606–618.
- Zarubin, T., and Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* *15*, 11–18.
- Zehorai, E., and Seger, R. (2014). Beta-like importins mediate the nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 259–270.

- Zhan, H., Suzuki, T., Aizawa, K., Miyagawa, K., and Nagai, R. (2010). Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. *J. Biol. Chem.* 285, 29662–29670.
- Zhang, A.Y., Yi, F., Jin, S., Xia, M., Chen, Q.-Z., Gulbins, E., and Li, P.-L. (2007a). Acid sphingomyelinase and its redox amplification in formation of lipid raft redox signaling platforms in endothelial cells. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 817–828.
- Zhang, H., Shi, X., Paddon, H., Hampong, M., Dai, W., and Pelech, S. (2004). B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase 1. *J. Biol. Chem.* 279, 35726–35734.
- Zhang, J., Shen, B., and Lin, A. (2007b). Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 286–295.
- Zhang, W., Navenot, J.-M., Frilot, N.M., Fujii, N., and Peiper, S.C. (2007c). Association of nucleophosmin negatively regulates CXCR4-mediated G protein activation and chemotaxis. *Mol. Pharmacol.* 72, 1310–1321.
- Zhou, J.-Y., Liu, Y., and Wu, G.S. (2006). The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in oxidative damage-induced cell death. *Cancer Res.* 66, 4888–4894.
- Zhou, Q., Zhao, Y., Li, P., Bai, X., and Ruan, C. (1992). Thrombomodulin as a marker of radiation-induced endothelial cell injury. *Radiat. Res.* 131, 285–289.
- Ziaei, S., Shimada, N., Kucharavy, H., and Hubbard, K. (2012). MNK1 expression increases during cellular senescence and modulates the subcellular localization of hnRNP A1. *Exp. Cell Res.* 318, 500–508.
- Zou, M.-H., Cohen, R., and Ullrich, V. (2004). Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothel. J. Endothel. Cell Res.* 11, 89–97.
- Zoughlami, Y., van Stalborgh, A.M., van Hennik, P.B., and Hordijk, P.L. (2013). Nucleophosmin1 is a negative regulator of the small GTPase Rac1. *PloS One* 8, e68477.
- Zuluaga, S., Alvarez-Barrientos, A., Gutiérrez-Uzquiza, A., Benito, M., Nebreda, A.R., and Porras, A. (2007). Negative regulation of Akt activity by p38alpha MAP kinase in cardiomyocytes involves membrane localization of PP2A through interaction with caveolin-1. *Cell. Signal.* 19, 62–74.

Annexes

Listes des publications

Guillonneau M, Paris F, Estephan H, Bénéteau E, Huot J, Corre I. Oxidative stress disassembles the p38 /NPM/PP2a complex leading to the modulation of NPM-mediated signaling to DNA damage response. **En révision à FASEB Journal, 2015**

Corre I, **Guillonneau M**, Paris F. Membrane signaling induced by High doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity. **Int J Mol Sci, 2013**, 14(11) :22678-96

Pin AL, Houle F, Fournier P, **Guillonneau M**, Paquet ÉR, Simard MJ, Royal I, Huot J. Annexin-1-mediated endothelial cell migration and angiogenesis are regulated by vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced inhibition of miR-196a expression. **J Biol Chem. 2012**, 287(36):30541-51

Pin AL, Houle F, **Guillonneau M**, Paquet ER, Simard MJ, Huot J. miR-20a represses endothelial cell migration by targeting MKK3 and inhibiting p38 MAP kinase activation in response to VEGF. **Angiogenesis. 2012**, 15(4):593-608.

Communications scientifiques

Guillonneau M, Bénêteau E, Paris F, Huot J et Corre I. Nucleophosmin : a new p38 MAPK partner regulated by déphosphorylation and involved in oxidative stress-induced double strand break DNA repair. 15^{ème} Conférence internationale : Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis & Antioxydants. Institut Pasteur, Paris, 22-24 juin 2015.

Guillonneau M, Bénêteau E, Paris F, Huot J et Corre I. Role and régulation of nucleophosmin in endothelial cells response to oxidative stress and involvement of the p38 MAPK pathway. Journées de l'école doctorale biologie-santé (ED-502), Nantes, 2014

Guillonneau M, Bénêteau E, Paris F, Huot J et Corre I. Etude de la nucléophosmine dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant. Congrès Signalisation Québec 2014, Bécancourt, QC, Canada, 20-22 Juin 2014. Prix du Poster des étudiants en Doctorat

Guillonneau M, Bénêteau E, Paris F, Huot J et Corre I. Etude de la nucléophosmine dans la réponse des cellules endothéliales au stress oxydant. Journée de la recherche de l'université Laval, Québec, Canada, 2014

Guillonneau M, Pin AL, Côté MC, Houle F et Huot J. Identification des sites de phosphorylation et des partenaires de l'Annexine A1 acteur important de la migration endothéliale en réponse au VEGF. Journée scientifique du centre de recherche du CHUQ, Québec, Canada, 2011. Prix du Poster des Etudiants en Master1.

Revue : « Membrane Signaling Induced by High Doses of Ionizing Radiation in the Endothelial Compartment. Relevance in Radiation Toxicity »

Résumé

Les zones tumorales peuvent maintenant être délimitées de façon très précise grâce aux progrès techniques de l'imagerie et de la balistique. Ceci a aussi conduit au développement de nouveaux protocoles de radiothérapie, délivrant des doses plus élevées de rayonnements ionisants directement aux cellules cancéreuses. Malgré cela, la radio-toxicité du tissu sain demeure un problème majeur, en particulier avec l'escalade de doses utilisée dans ces nouveaux protocoles. Les dommages tissulaires aigus et tardifs induits par l'irradiation sont liés à l'endothélium qui irrigue les tissus normaux. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse endothéliale à l'irradiation fortes doses sont associés à la signalisation au niveau de la membrane plasmique, principalement par la voie de la sphingomyélinase acide/céramide. Cette revue décrit cette voie de signalisation et discute la pertinence du ciblage de la signalisation endothéliale pour protéger les tissus sains des effets délétères des fortes doses d'irradiation.

Mots-clés : radiothérapie ; radio-toxicité ; endothélium ; membrane plasmique ; sphingomyélinase acide ; céramide

Review

Membrane Signaling Induced by High Doses of Ionizing Radiation in the Endothelial Compartment. Relevance in Radiation Toxicity

Isabelle Corre *, **Maëva Guillonéau** and **François Paris**

CRCNA-UMR Inserm U892-CNRS 6299-Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, Nantes 44007, France; E-Mails: maeva.guillonéau@etu.univ-nantes.fr (M.G.); fparis@nantes.inserm.fr (F.P.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: isabelle.corre@inserm.fr; Tel.: +33-2-28-08-03-32; Fax: +33-2-28-08-02-04.

Received: 9 October 2013; in revised form: 1 November 2013 / Accepted: 6 November 2013 / Published: 18 November 2013

Abstract: Tumor areas can now be very precisely delimited thanks to technical progress in imaging and ballistics. This has also led to the development of novel radiotherapy protocols, delivering higher doses of ionizing radiation directly to cancer cells. Despite this, radiation toxicity in healthy tissue remains a major issue, particularly with dose-escalation in these new protocols. Acute and late tissue damage following irradiation have both been linked to the endothelium irrigating normal tissues. The molecular mechanisms involved in the endothelial response to high doses of radiation are associated with signaling from the plasma membrane, mainly via the acid sphingomyelinase/ceramide pathway. This review describes this signaling pathway and discusses the relevance of targeting endothelial signaling to protect healthy tissues from the deleterious effects of high doses of radiation.

Keywords: radiotherapy; radiation toxicity; endothelium; plasma membrane; acid sphingomyelinase; ceramide

Abbreviations: ASMase, acid sphingomyelinase; bFGF, basic fibroblast growth factor; CAPP, ceramide-activated protein phosphatase; EGF-R, epithelial growth factor-receptor; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; FIASMA, functional inhibitors of acid sphingomyelinase; GIS, gastrointestinal

syndrome; Gy, Gray; IGRT, image-guided radiotherapy; IMRT, intensity-modulated radiotherapy; KSR, kinase suppressor of Ras; ox-LDL, oxidized-low density lipoprotein; LRs, lipid rafts; LOX-1, oxidized-low density lipoprotein receptor; MAPK, mitogen activated protein kinase; M β CD, methyl- β -cyclodextrin; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NAC, *N*-acetylcysteine; NOX, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; SBRT, stereotactic body radiotherapy; S1P, sphingosine-1-phosphate; SM, sphingomyelin; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; UV, ultraviolet; VEGF, vascular endothelial growth factor.

1. Introduction

In anticancer therapy, radiation therapy is a mainstay. It is largely used for the local control of tumor progression and to preserve organs. In radiation therapy, high-energy ionizing radiation is used to eradicate tumor cells. However, healthy cells located in the area neighboring the tumor also inevitably receive a considerable dose. This can cause damage to healthy tissues, which may appear immediately or later, if the patient survives. The number of cancer survivors is steadily increasing, thus it is important to assess how early and late radiation toxicity to normal tissues affects quality of life for these patients [1]. Because of this, the dose of radiation is restricted to avoid excess damage to healthy tissue. This has limited attempts to increase the therapeutic ratio (*i.e.*, maximization of tumor sterilization while sparing the surrounding normal tissue) as part of modern treatment.

Radiation delivery has significantly improved in recent decades, mainly through advances in computer technology. Improved tumor imaging combined with precise modulation of radiation beams has led to the development of intensity-modulated radiotherapy (IMRT), image-guided radiotherapy (IGRT) and high-dose hypofractionated stereotactic radiotherapy [2]. Among these new protocols, stereotactic body radiotherapy (SBRT) has emerged as a very promising tool, allowing delivery of limited fractions (1–4) of high doses of radiation (7.7 to 45 Gray (Gy)). This is possible because the tumor is very accurately localized. Recent clinical trials of SBRT revealed that it is feasible, effective and safe for the treatment of early primary tumors and oligometastatic diseases [3,4]. Although SBRT is designed to minimize irradiation of the healthy tissue surrounding the tumor, we currently have little feedback on early and late SBRT toxicity. This is mainly due to limited clinical data including long-term follow-up and to poor knowledge of the radiobiology of high doses of radiation [5]. The model conventionally used to predict tumor response and normal tissue toxicity from fractionated radiation, is the cell survival linear-quadratic model (LQ). This model appears to be too simplistic for SBRT, leading to overestimation of cell toxicity [6]. Indeed, the LQ model is essentially based on the capacity of normal cells to repair radiation-induced DNA damage. However, other molecular mechanisms may be involved and non-dividing cells present in normal tissues could also play a role [4].

Among this population of non-dividing cells, the microvascular endothelial compartment has clearly been shown to play a central role in radiation toxicity in healthy tissues. Several preclinical studies have established that radiation levels above 10 Gy cause endothelial cells to enter apoptotic cell death, resulting then in toxicity to the central nervous system [7] and to the small intestines [8]. Vascular injury has long been known to be the most common effect of exposing normal tissues to radiation, and the microvascular network is the most sensitive constituent of the vascular system [9].

The response of the microvasculature to radiation can be classed according to acute and late effects, both of which contribute to the initiation, progression and maintenance of tissue damage [10]. Following exposure to high doses of radiation (>10 Gy), a rapid wave of apoptosis appears as a hallmark of acute endothelial reaction. Surviving cells develop a dysfunctional vascular phenotype marked by excess secretion of pro-inflammatory cytokines, increased recruitment of blood cells and platelets, activation of the coagulation system and increased vascular permeability [11]. Late effects include microvessel collapse, thickening of the basement membrane, and persistence of an activated, pro-coagulant endothelial phenotype, which is ultimately senescent [12]. Through these effects, the microenvironment of normal tissue surrounding the irradiated tumor becomes a hypoxic, pro-inflammatory environment. This can cause damage to normal cells by inducing ischemia, necrosis and fibrosis (Figure 1).

Figure 1. Early and late effects of ionizing radiations on endothelial cells. Relevance in tissue radiation toxicity.

Early endothelial effects	Late endothelial effects
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Apoptosis ▪ Activation: increased expression of cell adhesion molecules and cytokine secretion ▪ Recruitment of inflammatory cells ▪ Pro-coagulant and pro-thrombotic phenotype ▪ Increased permeability ▪ ROS production 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Microvessel collapse: rupture and dilatation of capillaries ▪ Thickening of the basal membrane ▪ Thrombosis ▪ Chronic pro-inflammatory phenotype ▪ Chronic production of ROS ▪ Senescence
Effects of irradiated endothelium on surrounding normal tissues	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ischemia ▪ Necrosis ▪ Tissue fibrosis 	

Thus, even if the radiobiology of high doses of radiation is still incompletely understood, the endothelial compartment appears to be a major target, which when damaged can lead to radiation toxicity in normal tissues [13]. A single dose of 15–20 Gy induces molecular mechanisms of endothelial apoptosis, which requires activation of the acid sphingomyelinase (ASMase)/ceramide pathway [8,14]. This pathway is not triggered in tissues exposed to conventional fractionated radiotherapy [15]. Thus, these pioneering results demonstrated that an alternative radiation-induced signaling pathway exists, involving plasma membrane-initiated but nuclear-independent events [16]. The initial evidence for membrane signaling initially originated from studies on cancer cells exposed to low doses of radiation, where tyrosine kinase receptors epithelial growth factor-receptor (EGF-R), phosphoinositide 3-kinase PI3K/AKT and the Ras/Raf/mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway were shown to mediate radiation sensitivity [17]. The role of membrane signaling in the response to radiation has now been clearly demonstrated, and the ASMase/ceramide signaling triggered in endothelium exposed to single high doses of radiation has been shown to play a major role.

This review will discuss what is currently known about the molecular signaling pathways induced in the endothelial compartment by high doses of radiation, such as those delivered by SBRT. Emphasis is placed on plasma membrane signaling events. Potential strategies to preserve and protect the microvasculature, thus preventing radiation toxicity in normal tissues, are also discussed.

2. Radiation-Induced Plasma Membrane Signaling in the Endothelial Compartment

2.1. Activation of the Acid Sphingomyelinase Pathway

2.1.1. Translocation and Activation of ASMase

Cellular studies were the first to demonstrate a rapid activation of the enzyme acid sphingomyelinase (ASMase) at the plasma membrane in bovine endothelial cells exposed to a high single dose of ionizing radiation [16]. Human lymphoblast deficient for ASMase enzyme [18] and endothelial cells from mice invalidated for the ASMase gene *smpd1* [7] were found to be resistant to radiation-induced apoptosis. Thus, a key role of the ASMase pathway in radiobiology signaling in the endothelium was established.

ASMase catalyses the hydrolysis of the sphingolipid sphingomyelin (SM) at the outer layer of the plasma membrane, producing ceramide [19]. *In vitro* studies initially showed that ASMase performs optimally at an acidic pH; this is consistent with the lysosomal localization of this protein. Nevertheless, ASMase is also active at the cell's surface membrane, where the lipid composition of the membrane can alter the K_m of the enzyme, allowing its activation at a higher pH [20]. Very recent data in endothelial cells demonstrate that an acidic microenvironment is created at the plasma membrane upon fusion with lysosomes, enabling ASMase activity [21]. The initial step in ASMase activation appears to be translocation from the lysosomes to the extracellular leaflet of the plasma membrane, where its substrate sphingomyelin is located. A broad range of stresses (cytokines, viruses, ultraviolet (UV)) has been shown to induce ASMase trafficking in different cell types [22–24]. The rapid translocation of ASMase to the cell surface in endothelial cells exposed to 15 Gy appears to be a pre-requisite triggering intracellular apoptotic signals in these cells [25]. Several studies have investigated the molecular pathways involved in ASMase translocation from secretory lysosomes to the external face of the plasma membrane. These studies showed that various proteins of the exocytotic machinery, in particular the t-SNARE protein syntaxin-4 [26] and the protein dysferlin in endothelial cells [27], participate in lysosome fusion with membranes, therefore leading to ASMase translocation.

Despite intensive research into ASMase signaling, the molecular mechanisms causing activation of this enzyme are still not fully elucidated. ASMase might be activated in several different ways, depending on cells and stimuli. For example, proteases of the caspases family have been shown to regulate ASMase activation. In pro-apoptotic Fas/Fas ligand signaling, caspase-8 promotes ASMase translocation and activity [24], whereas upon tumor necrosis factor- α (TNF- α) signaling, caspase-7 can activate ASMase activation by direct interaction and proteolytic cleavage [28]. ASMase has also been found to be regulated by phosphorylation, with recombinant PKC- δ phosphorylating ASMase on serine-508. This phosphorylation appears to be necessary for the protein translocation and activation in carcinoma cells [29]. In stress conditions, ASMase could be regulated by redox mechanisms, and several studies support this hypothesis: oxidation at cysteine-629 in the C-terminal portion of ASMase

leads to dimerization and increases its enzymatic activity [30], while scavengers for reactive oxygen species (ROS) prevent activation of ASMase by death receptors [23], UV-C [22] or Cu^{2+} [31]. Reactive nitrogen species (RNS) can also specifically activate an acidic sphingomyelinase in airway epithelium [32]. In endothelial cells, the contribution of ROS and redox signaling to ASMase activation has been proven by Li and co-workers [33], who described ROS-dependant ASMase activation, as well as a feed-forward loop amplifying ROS production, which is detailed below. Ionizing radiation can be considered as a receptor-independent stimulus activating ASMase signaling. The first intracellular radiochemical event induced by ionizing radiation consists of a rapid burst of ROS, as a result of H_2O radiolysis [34]. Thus, it is possible that activation of ASMase upon exposure to radiation might be provoked by oxidation through ROS produced by radiolysis. Indeed, anti-oxidants such as glutathione and *N*-acetylcysteine (NAC) impair plasma membrane translocation and activation of ASMase in microvascular endothelial cells exposed to 15 Gy [35].

2.1.2. Ceramide, a Plasma Membrane Reorganizer

In response to radiation, ASMase activation results in the rapid and transient production of the sphingolipid ceramide. This bioactive lipid is an evolutionarily conserved second messenger, composed of a fatty acyl chain of variable length (the most common mammalian ceramides contain 14 to 24 carbon atoms) bound to the amino group of a sphingosine [36]. Ceramides are among the least polar and most hydrophobic sphingolipids and possess unique biophysical properties. In artificial membranes, ceramide molecules tend to spontaneously self-associate, excluding other lipids [37,38]. This creates small membrane ceramide-enriched domains, which can spontaneously coalesce to generate larger domains [36].

Biological membranes typically contain sphingolipids, cholesterol and other glycopospholipids. In this context, sphingolipids interact with each other through their hydrophilic part and with cholesterol molecules through their ceramide moiety forming hydrogen bonds and Van der Waals interactions with the sterol ring. These tight interactions promote the lateral association of sphingolipids and cholesterol molecules and result in the appearance of sphingolipid- and cholesterol-enriched domains, also known as membrane lipid rafts (LRs) in the cellular membrane [39]. Based on this model, and with regard to the biophysical properties of ceramide, an increase in membrane ceramide content would provoke extensive spatial reorganization, resulting from the fusion of membrane LRs into large ceramide-enriched domains. Indeed, several studies have shown these large LRs to occur in cells in response to different stimuli (CD95, CD40-L, viruses, chemotherapeutics, UV, *etc.* [40]). All these stimuli are known to trigger ceramide generation by ASMase. Biochemical fractionation and confocal fluorescent microscopy experiments have clearly demonstrated that LRs participate in signal transduction, as they serve to cluster signaling receptors and molecules in the plasma membrane, facilitating their activation [41]. In the context of radiation, these membrane LRs were first shown to be linked to the radiation sensitivity of human carcinoma cells [42]. This underlines the importance of the plasma membrane organization in ceramide-enriched LRs in the cellular response to ionizing radiation. In the endothelial compartment, the ASMase/ceramide pathway was rapidly identified as essential to initiating radiation-induced apoptosis [16]. This was recently proven, once again showing

how membrane reorganization into ceramide-enriched large domains contributes to driving transmission of radiation-induced signaling [43].

The first role identified for ceramide-enriched domains was in the pro-apoptotic signaling pathway mediated by death receptors like CD95 and CD40 [44,45]. These domains trap and cluster receptors and intracellular signaling molecules, with consequent formation of an apoptotic “signalosome”, which can efficiently transmit and amplify the signal inside the cell. Aggregation and trapping of death receptors in ceramide-enriched domains limits their lateral diffusion, thus stabilizing receptor-ligands interaction [41]. In response to radiation in endothelial cells, ceramide-enriched LR domains are also essential in transmitting apoptotic signals; this can be prevented by hindering the formation of these domains. Thus, both an anti-ceramide antibody [43] and LR disruptors (filipin, methyl- β -cyclodextrin (M β CD)) [35] protect endothelial cells from radiation-induced cell apoptotic cell death. However, the intracellular signaling pathways involved have yet to be fully deciphered.

The best-characterized signaling molecules in ceramide-enriched domains are clusters of death receptors [44]. Very few other molecules have yet been specifically identified in these domains, except in endothelial cells, where subunits gp91^{phox} and p47^{phox} of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX) are concentrated in ceramide-enriched domains following ASMase activation [33,46]. Endothelial NOX is a multi-enzymatic complex involved in the reduction of molecular oxygen and generation of superoxide radicals, O₂^{•-}, is now considered as the primary enzymatic source of vascular ROS. The concept of redox lipid rafts was initially proposed to describe membrane LR domains where NOX components were recruited, clustered and activated, therefore leading to ROS production [47]. The ASMase/ceramide pathway now appears essential to the formation of these redox domains [33], as ceramide-enriched domains promote aggregation and activation of the NOX complex. The initial functions attributed to structurally organized membrane domains LR domains was the transmission and the amplification of intracellular signals [48]. In the case of redox LR domains, a similar feed-forward amplification mechanism was proposed in endothelial cells [33], as ROS produced by NOX within ceramide-enriched domains may further enhance ASMase activation through an oxidative mechanism [30]. This would result in enhanced formation of ceramide LR domains, thus amplifying the whole system. Activation of NOX through such domains is induced in the endothelial compartment in response to death factors Fas-L, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and endostatin [33,49,50]. Ionizing radiation also activates NOX in microvascular endothelial cells by an as yet unknown mechanism [51]. The ASMase/ceramide pathway might be involved in ionizing radiation-induced NOX activation, through formation of redox LR domains. Hence, oxidative stress signaling initiated by ionizing radiation could be enhanced through the positive feedback from ASMase. By inducing the formation of ceramide and redox LR domains, ASMase contributes to ROS production by NOX, which in turn could retro-activate ASMase. This could also explain how just few primary ionization events caused by the direct effects of radiation on water molecules, could be sufficiently amplified to cause rapid and robust activation of cellular signaling pathways.

2.1.3. Ceramide, a Second Messenger

In addition to its involvement in reorganizing the outer leaflet of the plasma membrane, ceramide was also shown to directly interact with proteins on the cytoplasmic side of the membrane. This is

possible as ceramide molecules can slowly flip from the outer- to the inner-side of the lipid bilayer [52]. *In vitro* studies revealed several signaling proteins, which are direct effectors of ceramide. The ceramide-activated protein phosphatase (CAPP), namely PP2A and PP1 [53], are specifically activated by specific binding to ceramide [54]. These proteins regulate various signaling proteins: retinoblastoma gene product *Rb*, Bcl-2, AKT, c-Jun, PKC- α . Ceramide has also been described as an activator of the kinase suppressor of Ras (KSR) protein [55], which phosphorylates the protein Raf-1 [56]. A specific ceramide-binding domain was identified in KSR. This domain seems to be required for translocation of the kinase to the membrane [57]. Another well-characterized direct target of ceramide is PKC- ζ which is directly bound and activated by natural long-acyl chain ceramides [58–60]. Activation of the aspartic protease cathepsin D by ceramide has been described [61]. This links ceramide to the mitochondrial apoptotic pathway via activation of the protein Bid. Recent studies also identified plasma membrane ions channels as novel targets of ceramide, in particular the store-operated Ca²⁺ channel involved in controlling calcium influx [62,63] and voltage-gated Kv1.3 K⁺ channels [64] which modulate potassium efflux. To date, none of these pathways triggered by direct interaction between ceramide and intracellular molecules were initially described in endothelial cells. However, direct targets of ceramide including CAPP, KSR, PKC, and cathepsin D, are ubiquitously expressed and could potentially be regulated in the endothelial compartment. PP2A, in particular, is described as involved in disrupting endothelial barrier integrity [65], while cathepsin D plays a role in apoptosis and redox signaling [66] and PKC- ζ is involved in gene transcription and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation [67].

2.2. The Rho Family of Small GTPases

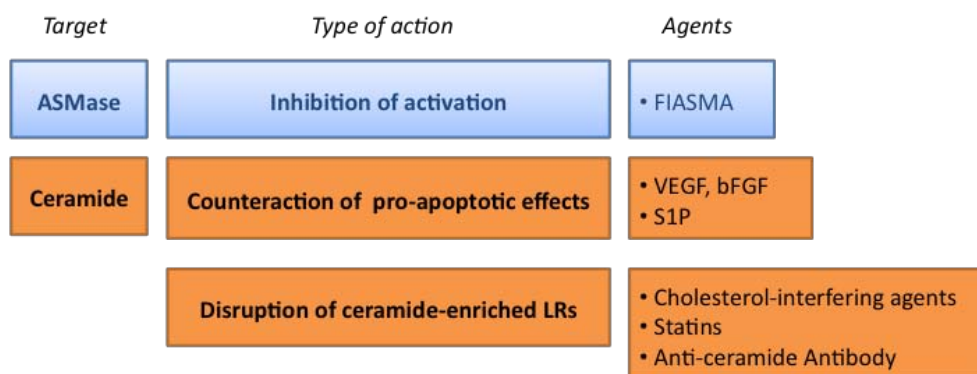
In addition to its complex lateral organization as a lipid bilayer, the plasma membrane is also linked to the actin cytoskeleton through interaction with lipid or protein effectors, which tether actin filaments to its inner face. The cytoskeleton plays a major role in maintaining cell shape. Ionizing radiation has been clearly shown to alter cytoskeletal organization [68–70]. *In vitro* studies have highlighted different effects of radiation on the actin network, which vary depending on cell type and the dose delivered. In pulmonary microvascular endothelial cells, cytoskeletal disorganization with changes to actin filaments was observed following doses between 6 and 30 Gy [68,71]. In dermal microvascular cells, a dose of 15 to 20 Gy led to a rapid and persistent increase in stress fiber formation [69,70]. Actin structures are mainly reorganized through the action of specialized proteins, namely the Rho family of small GTPases, which includes RhoA, Rac and Cdc42 [72]. The role played by RhoA in the endothelial response to a single high dose of radiation (15–20 Gy) has been addressed by two separate studies [69,70]. Their results show a rapid and transient activation of RhoA. This activation then leads to reorganization of the actin cytoskeleton, marked by the formation of stress fibers, and resulting in increased endothelial permeability [69], enhanced formation of focal adhesions structures and altered migration [70]. Cdc42 GTPases has also been linked to activation of primary microvascular endothelial cells in response to ionizing radiation [73]. The mechanisms leading to GTPase activation still remain to be elucidated and no direct link between the ASase/ceramide signaling pathway and Rho GTPases has been described in endothelial cells. Nevertheless, *in vitro* studies with exogenous ceramides (short- or natural long-chain forms) identified both RhoA [74] and Rac [75] as potential

ceramide targets. All members of this GTPase family only become fully activated upon anchoring to the inner face of the plasma membrane through their hydrophobic isoprenoid (farnesyl or geranylgeranyl) moiety. Several studies have suggested that GTPases concentrate at the plasma membrane in LRs, where they become activated [76,77]. Therefore, Rho GTPases could be activated through signals originating in ceramide-enriched domains. Indeed, one study has shown Rac to be present in redox LRs in endothelial cells, where it forms part of the multi-enzymatic complex NOX [47].

3. Protecting Tissues from Radiation Toxicity by Targeting the Endothelium

The radiation doses above 10 Gy used in new hypofractionated radiotherapy strategies, such as SBRT, have a strong impact on the endothelium irrigating normal tissues. As mentioned before, early and late endothelial damage to the endothelium contribute to radiation toxicity in healthy tissues. Apoptotic loss of endothelial cells causes local ischemia, deregulated expression of adhesion molecules and secretion of cytokines. This creates a pro-inflammatory and a pro-coagulant environment. These acute effects often become persistent, leading to the establishment of a chronically dysfunctional endothelium, which can then lead to the formation of fibrotic tissue [78] and could even induce cardiovascular damage [79]. Therefore, protecting the endothelium from damage due to high-dose radiation is an attractive alternative therapeutic means to limit radiation toxicity in normal tissues. The relevance of the ASMase/ceramide pathway in the radiobiology of high-dose radiation prompts us to present a number of strategies to limit its activation (Figure 2).

Figure 2. Targeting the ASMase pathway in the endothelium. See text for details.



3.1. Targeting the ASMase Activity

To limit the impact of signaling pathways dependent on the ASMase/ceramide pathway, an obvious approach would be to inhibit ASMase enzymatic activity itself. The three-dimensional structure of ASMase is not fully known and no crystallographic data are available yet. This has limited the development of direct specific inhibitors and those that exist show poor specificity. To date, only very few examples of direct ASMase inhibitors have been described, among which are phosphatidylinositol-3, 5-biphosphonate and natural xanthone compounds [80].

On the other hand, a broad group of molecules acting indirectly on ASMase activity has also been described. These are termed functional inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMA) [81]. They do not directly inhibit ASMase but act through an alternative mechanism based on the detachment of ASMase

from the inner face of the lysosomal membrane, causing its proteolytic degradation. In normal conditions, positively charged protein ASMase attaches to the inner leaf of the lysosomal membrane through electrostatic interactions. FIASMA are lipophilic weak bases [81], thus they gain access inside the lysosome, where they become protonated and thus positively charged. This modifies the electrostatic properties of the inner surface of the lysosomal membrane and disrupts ASMase attachment, leading to its breakdown by lysosomal proteases. Seventy-two drugs approved by the Federal Drug Administration have been experimentally shown to inhibit ASMase activity, although none possess a unique specificity for ASMase [82]. Only one clinical study, involving cystic fibrosis treatment [83], used a drug from the FIASMA group, amitriptyline, specifically for its action on the ASMase.

3.2. Counteracting the Pro-Apoptotic Activity of Ceramide

The crucial role of endothelial cells in controlling radiation toxicity to healthy tissues has been demonstrated in many tissues, including the small intestines, brain, lung and parotid glands [7,8,18,84]. For example, C56BL/6 mice exposed to whole-body or whole-abdominal irradiation at 15 Gy died within days due to gastrointestinal syndrome (GIS). In these animals, microvascular endothelial apoptosis led to total collapse of the epithelial functionality [8]. Genetic invalidation of ASMase protects mice from GIS-related death following 15 Gy irradiation by preventing ceramide-induced apoptosis in the endothelial compartment. A similar protection from radiation-induced intestinal toxicity was achieved by intravenous injection of the pro-angiogenic factor bFGF. This molecule mainly targets the microvascular endothelium. This was the first evidence that tissues could be protected from radiation toxicity by targeting endothelial cells. However, this treatment seems compromised in human clinical trials, because it induces side effects including hypotension [85]. Recent data from the same group confirmed the potential role of pro-angiogenic molecules in limiting radiation toxicity in the endothelium in *in vitro* studies [25]. Treatment with vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibited radiation-induced apoptosis through repression of the ASMase activation. The connection between the inhibition of ceramide-induced apoptosis and the late radiation toxicity remains unclear. However, ceramide is involved in long-term physiopathologies, such as cystic fibrosis [86]. Pharmacological treatment with ASMase inhibitors or genetic heterozygosity of ASMase minimizes release of pulmonary inflammatory cytokines in mice developing cystic fibrosis. More studies must be done after exposure to ionizing radiation to properly establish the potential role of drugs targeting ceramide and preventing both acute and late toxicity.

The bioactive sphingolipid sphingosine-1-phosphate (S1P) is a ceramide metabolite, involved in numerous cellular functions, especially in cell survival. This pro-survival effect of S1P generally occurs when apoptotic signals are induced by ceramide [87–89]. Hence, the existence of a ceramide/S1P rheostat has been suggested to contribute to the cellular apoptosis/survival equilibrium [90]. In a murine intestinal radiation toxicity model, S1P was used as a ceramide antagonist, injected retro-orbitally into animals before whole-body irradiation at 15 Gy [91]. The radioprotective effects of S1P were clearly demonstrated, as S1P-injected were rescued from radiation-induced GIS. However, these animals died later from bone marrow aplasia. The specific cellular targets of S1P in the small intestine are microvascular endothelial cells and neither epithelial cell nor lymphocytes were protected from radiation-induced apoptosis in these animals. Further

examination of the molecular radioprotective pathway regulated by S1P in endothelial cells revealed that it binds to receptors which in turn activate an AKT-dependent survival pathway [91]. Decoupling these seven-transmembrane-domain receptors using pertussis toxin or inhibiting the AKT-pathway with specific inhibitors prevents *in vitro* and *in vivo* S1P-induced radiation protection. However, S1P is a bioactive sphingolipid involved in a large number of cellular functions, including differentiation, cell trafficking, inflammation and migration. S1P also exhibits strong pro-angiogenic properties [92]. Because of this broad-ranging activity, S1P's influence on late endothelial dysfunctions and related toxicity has yet to be determined.

In any case, it seems inconceivable to use pro-angiogenic drugs as radioprotectors of healthy tissues in a context of radiotherapy, as the primary effect of these molecules in an oncogenic environment would be to promote tumor angiogenesis, resulting in a burst in tumorigenesis and/or in metastasis [92]. Molecules targeting the endothelium but devoid of any pro-angiogenic activity would be suitable alternatives. This type of approach was explored by one study, where injection of an angiopoietin-1 variant, which exclusively targets the survival pathway in quiescent endothelial cells without affecting angiogenesis, was found to protect animals against radiation-induced endothelial apoptosis, leading to intestinal radioprotective effects [93]. S1P also targets only non-proliferating quiescent endothelial cells and not angiogenic tumoral endothelium [94], thus it could be a relevant avenue of investigation. Selective protection of quiescent endothelium may provide opportunities to define selective radioprotectors for normal tissues.

3.3. Targeting the Formation of Ceramide-Enriched LRs

As mentioned above, the ASMase-generated ceramide contributes to transmitting intracellular signals by rearranging the plasma membrane and promoting the formation of ceramide-enriched domains. Hence, interfering with the formation of these domains is an attractive option to efficiently block signal transduction induced by plasma membrane ceramide. Manipulating lipid raft domains without irreversibly destroying the cell structure has proved difficult, and targeting sphingolipids, the major constituents of membrane LRs, is all but impossible. Cholesterol, which is also abundantly present in these membrane domains, has been extensively targeted in attempts to disrupt LRs, using two different types of interfering agents. Cholesterol-depletors such as M β CD, specifically remove cholesterol from membrane domains, while cholesterol-sequestrators, like filipin and nystatin, bind this lipid in LRs, decreasing the fluidity of these domains. This blocks the clustering and aggregation of signaling molecules [95]. However, none of these molecules can be considered as potential therapeutic drugs, as they are toxic and/or have non-specific effects.

Among available drugs, statins are well-characterized as lipid-lowering drugs, inhibiting the mevalonate pathway of cholesterol synthesis. This decreases the level of circulating plasma cholesterol. Statin treatment also reduces the amount of cholesterol in LRs leading to their disruption [96]. In endothelial cells, chronic exposure to lovastatin or atorvastatin leads to disruption of membrane LRs and consequently to spatial disorganization of the oxidized-low density lipoprotein (ox-LDL) receptor (LOX-1). This protects the endothelium from the adverse effects of ox-LDL [96]. A very recent study reinforces this notion of a protective effect of statins through regulation of the dynamics of ceramide-enriched domains [97]. In arterial endothelial cells exposed to ox-LDL, pretreatment with

statins protect cells from oxidative stress by preventing the formation of ceramide-enriched platforms. The resulting inhibition of NOX assembly and activation reduces ROS production, thereby limiting the deleterious effects of ox-LDL [97]. In the context of ionizing radiation, statins also protect endothelial cells from radiation-induced damage. *In vitro*, they exert persistent anti-inflammatory and anti-thrombotic effects on irradiated endothelial cells [98]. Preclinical studies of a rodent model of radiation toxicity in the skin, showed that pravastatin treatment abolished radiation-induced endothelial dysfunctions and had therapeutic effects on irradiated skin [99]. Neither of these studies addresses how statins achieve these effects, but it is possible they cause disorganization of membrane ceramide-enriched platforms in the membrane by reducing available membrane cholesterol. By interfering with the mevalonate pathway, statins also block the synthesis of isoprenoid intermediates, which are essential for trafficking and activation of small GTPases at the membrane [100]. Thus, statins can also be considered to be indirect inhibitors of small GTPases. In microvascular endothelial cells, the effects of statins on radiation-induced RhoA activity have not yet been tested [69,70]. Nevertheless, statins may play a role in preventing radiation-induced Rho GTPase-dependent effects. In a model of radiation-induced intestinal fibrosis involving Rho proteins [101], pravastatin limits damage, possibly via inactivation of the RhoA/ROCK pathway [102].

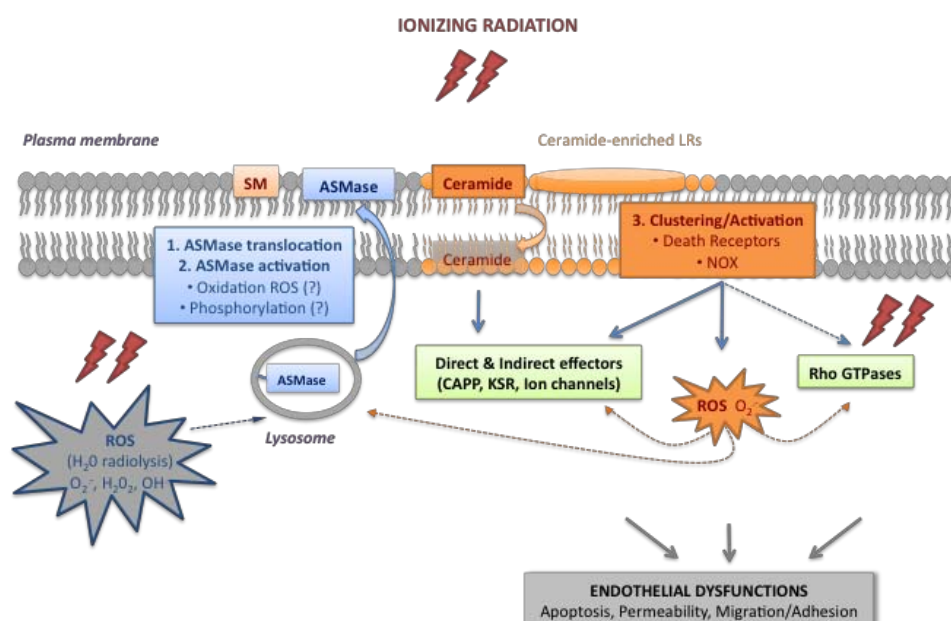
Specifically targeting membrane ceramide to prevent radiation toxicity was recently achieved through the development and characterization of a specific anti-ceramide antibody [43]. The monoclonal 2A2 antibody binds to membrane ceramide molecules, blocks their redistribution and therefore prevents the formation of ceramide-enriched domains in endothelial plasma membranes. Without these structures, transmission of radiation-induced apoptotic signals is impaired. 2A2 antibody applied to the C56BL/6 model of radiation-induced intestinal toxicity also protects animals from death by GIS. Results from this study emphasize that intestinal crypts are protected from radiation-induced lethality by inhibition of endothelial cell apoptosis, through reduced formation of ceramide-enriched domains. Thus, this monoclonal antibody can be considered as the prototype of a new class of anti-ceramide therapeutics, potentially useful in radioprotection of healthy tissues.

4. Conclusions

For decades, radiobiologists assumed that the DNA damage response was the only signaling pathway involved in the cellular response to ionizing radiation. While not disregarding this response, laboratory experiments and preclinical studies have now revealed additional biological processes involved in radiation toxicity in normal tissues exposed to a high single dose radiation. First, the crucial role of the microvascular microenvironment was established when rapid endothelial apoptosis and vascular collapse was shown to markedly enhance radiation-induced damage to normal cells. Second, the molecular mechanisms were characterized, highlighting the existence of a major signal transduction pathway, initiated at the plasma membrane but independent of nuclear events, requiring activation of the acid sphingomyelinase pathway. As illustrated in Figure 3, ASMase and ceramide are the main components of this radiation-induced endothelial signaling pathway. Membrane translocation of ASMase and its activation (Steps 1 and 2) produce ceramide. This transmits signals through lateral membrane reorganization, forming ceramide-enriched LRs domains (Step 3), or directly activates signaling molecules. An alternative endothelial signaling pathway involves the Rho family of small

GTPases; these are suspected, but not proven, to be dependent on ceramide. In the endothelium, the intracellular ROS appear to play a key role in initiating, coordinating and amplifying plasma membrane events. The initial wave of ROS resulting from H₂O radiolysis (ROS, in grey in Figure 3) might trigger the membrane ceramide pathway through ASMase activation. A second wave of ROS produced by ceramide-induced NOX activation (ROS, in orange in Figure 3) could then amplify the whole process and/or activate effectors. Altogether, this shows endothelial cells to mount a rather complex response to a high single dose of ionizing radiation, stressing the major role of the bioactive sphingolipid ceramide and the important contribution of ROS and the resulting oxidative stress.

Figure 3. Diagram of the plasma membrane signaling pathways induced by ionizing radiation in endothelial cells. See text for details.



Several strategies proposed to protect healthy tissue from radiation toxicity have been recently reviewed [103]: non-specific approaches using antioxidant molecules to neutralize radiation-induced oxidative stress, more specific treatments directly targeting normal tissue: *p53* modulation, injection of hormones or cytokine to stimulate proliferation, stem cell therapies, *etc.* Nevertheless, targeting the microvascular endothelial network is also a promising approach to limiting radiation toxicity to normal tissues. Inactivating signaling pathways involved in the endothelial response to radiation could be a suitable alternative, especially through therapies targeting the ASMase/ceramide pathway, which are currently in development.

Acknowledgments

The authors are grateful to Jacques Huot, Stéphane Supiot and Rym Abderrahmani for their critical reading and comments on the manuscript, and to Maighread Gallagher for English editing.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Stone, H.B.; Coleman, C.N.; Anscher, M.S.; McBride, W.H. Effects of radiation on normal tissue: Consequences and mechanisms. *Lancet Oncol.* **2003**, *4*, 529–536.
2. Bhide, S.A.; Nutting, C.M. Recent advances in radiotherapy. *BMC Med.* **2010**, *8*, 25.
3. Almaghrabi, M.Y.; Supiot, S.; Paris, F.; Mahe, M.A.; Rio, E. Stereotactic body radiation therapy for abdominal oligometastases: A biological and clinical review. *Radiat. Oncol.* **2012**, *7*, doi:10.1186/1748-717X-7-126.
4. Lo, S.S.; Fakiris, A.J.; Chang, E.L.; Mayr, N.A.; Wang, J.Z.; Papiez, L.; Teh, B.S.; McGarry, R.C.; Cardenes, H.R.; Timmerman, R.D. Stereotactic body radiation therapy: A novel treatment modality. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2010**, *7*, 44–54.
5. Milano, M.T.; Constine, L.S.; Okunieff, P. Normal tissue toxicity after small field hypofractionated stereotactic body radiation. *Radiat. Oncol.* **2008**, *3*, 36.
6. Brown, J.M.; Koong, A.C. High-dose single-fraction radiotherapy: Exploiting a new biology? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2008**, *71*, 324–325.
7. Pena, L.A.; Fuks, Z.; Kolesnick, R.N. Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: Protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 321–327.
8. Paris, F.; Fuks, Z.; Kang, A.; Capodiceci, P.; Juan, G.; Ehleiter, D.; Haimovitz-Friedman, A.; Cordon-Cardo, C.; Kolesnick, R. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* **2001**, *293*, 293–297.
9. Rodemann, H.P.; Blaese, M.A. Responses of normal cells to ionizing radiation. *Semin. Radiat. Oncol.* **2007**, *17*, 81–88.
10. Gaugler, M.H. A unifying system: Does the vascular endothelium have a role to play in multi-organ failure following radiation exposure? *BJR Suppl.* **2005**, *27*, 100–105.
11. Milliat, F.; Francois, A.; Tamarat, R.; Benderitter, M. Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages. *Ann. Cardiol. Angeiol.* **2008**, *57*, 139–148.
12. Oh, C.W.; Bump, E.A.; Kim, J.S.; Janigro, D.; Mayberg, M.R. Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation. *Radiat. Res.* **2001**, *156*, 232–240.
13. Supiot, S.; Paris, F. Radiobiology dedicated to endothelium. *Cancer Radiother.* **2012**, *16*, 11–15.
14. Garcia-Barros, M.; Paris, F.; Cordon-Cardo, C.; Lyden, D.; Rafii, S.; Haimovitz-Friedman, A.; Fuks, Z.; Kolesnick, R. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* **2003**, *300*, 1155–1159.
15. Fuks, Z.; Kolesnick, R. Engaging the vascular component of the tumor response. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 89–91.
16. Haimovitz-Friedman, A.; Kan, C.C.; Ehleiter, D.; Persaud, R.S.; McLoughlin, M.; Fuks, Z.; Kolesnick, R.N. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.* **1994**, *180*, 525–535.
17. Valerie, K.; Yacoub, A.; Hagan, M.P.; Curiel, D.T.; Fisher, P.B.; Grant, S.; Dent, P. Radiation-induced cell signaling: Inside-out and outside-in. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 789–801.

18. Santana, P.; Pena, L.A.; Haimovitz-Friedman, A.; Martin, S.; Green, D.; McLoughlin, M.; Cordon-Cardo, C.; Schuchman, E.H.; Fuks, Z.; Kolesnick, R. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* **1996**, *86*, 189–199.
19. Milhas, D.; Clarke, C.J.; Hannun, Y.A. Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 1887–1894.
20. Schissel, S.L.; Jiang, X.; Tweedie-Hardman, J.; Jeong, T.; Camejo, E.H.; Najib, J.; Rapp, J.H.; Williams, K.J.; Tabas, I. Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH. Implications for atherosclerotic lesion development. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2738–2746.
21. Xu, M.; Xia, M.; Li, X.X.; Han, W.Q.; Boini, K.M.; Zhang, F.; Zhang, Y.; Ritter, J.K.; Li, P.L. Requirement of translocated lysosomal V1 H(+)-ATPase for activation of membrane acid sphingomyelinase and raft clustering in coronary endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 1546–1557.
22. Charruyer, A.; Grazide, S.; Bezombes, C.; Muller, S.; Laurent, G.; Jaffrezou, J.P. UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 19196–19204.
23. Dumitru, C.A.; Gulbins, E. TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis. *Oncogene* **2006**, *25*, 5612–5625.
24. Grassme, H.; Cremesti, A.; Kolesnick, R.; Gulbins, E. Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* **2003**, *22*, 5457–5470.
25. Truman, J.P.; Garcia-Barros, M.; Kaag, M.; Hambardzumyan, D.; Stancevic, B.; Chan, M.; Fuks, Z.; Kolesnick, R.; Haimovitz-Friedman, A. Endothelial membrane remodeling is obligate for anti-angiogenic radiosensitization during tumor radiosurgery. *PLoS One* **2010**, *5*, e12310.
26. Perrotta, C.; Bizzozero, L.; Cazzato, D.; Morlacchi, S.; Assi, E.; Simbari, F.; Zhang, Y.; Gulbins, E.; Bassi, M.T.; Rosa, P.; *et al.* Syntaxin 4 is required for acid sphingomyelinase activity and apoptotic function. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 40240–40251.
27. Han, W.Q.; Xia, M.; Xu, M.; Boini, K.M.; Ritter, J.K.; Li, N.J.; Li, P.L. Lysosome fusion to the cell membrane is mediated by the dysferlin C2A domain in coronary arterial endothelial cells. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 1225–1234.
28. Edelmann, B.; Bertsch, U.; Tchikov, V.; Winoto-Morbach, S.; Perrotta, C.; Jakob, M.; Adam-Klages, S.; Kabelitz, D.; Schutze, S. Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptosomes. *EMBO J.* **2011**, *30*, 379–394.
29. Zeidan, Y.H.; Wu, B.X.; Jenkins, R.W.; Obeid, L.M.; Hannun, Y.A. A novel role for protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation of acid sphingomyelinase in UV light-induced mitochondrial injury. *FASEB J.* **2008**, *22*, 183–193.
30. Qiu, H.; Edmunds, T.; Baker-Malcolm, J.; Karey, K.P.; Estes, S.; Schwarz, C.; Hughes, H.; van Patten, S.M. Activation of human acid sphingomyelinase through modification or deletion of C-terminal cysteine. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 32744–32752.

31. Lang, P.A.; Schenck, M.; Nicolay, J.P.; Becker, J.U.; Kempe, D.S.; Lupescu, A.; Koka, S.; Eisele, K.; Klarl, B.A.; Rubben, H.; *et al.* Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 164–170.
32. Castillo, S.S.; Levy, M.; Thaikoottathil, J.V.; Goldkorn, T. Reactive nitrogen and oxygen species activate different sphingomyelinases to induce apoptosis in airway epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 2680–2686.
33. Zhang, A.Y.; Yi, F.; Jin, S.; Xia, M.; Chen, Q.Z.; Gulbins, E.; Li, P.L. Acid sphingomyelinase and its redox amplification in formation of lipid raft redox signaling platforms in endothelial cells. *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 817–828.
34. Azzam, E.I.; Jay-Gerin, J.P.; Pain, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* **2012**, *327*, 48–60.
35. Paris, F. CRCNA, Nantes, FR. Personal communication, 2013.
36. Kolesnick, R.N.; Goni, F.M.; Alonso, A. Compartmentalization of ceramide signaling: Physical foundations and biological effects. *J. Cell Physiol.* **2000**, *184*, 285–300.
37. Holopainen, J.M.; Subramanian, M.; Kinnunen, P.K. Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane. *Biochemistry* **1998**, *37*, 17562–17570.
38. Nurminen, T.A.; Holopainen, J.M.; Zhao, H.; Kinnunen, P.K. Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12129–12134.
39. Simons, K.; Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
40. Zhang, Y.; Li, X.; Becker, K.A.; Gulbins, E. Ceramide-enriched membrane domains—Structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 178–183.
41. Stancevic, B.; Kolesnick, R. Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 1728–1740.
42. Bionda, C.; Hadchity, E.; Alphonse, G.; Chapet, O.; Rousson, R.; Rodriguez-Lafrasse, C.; Ardail, D. Radioresistance of human carcinoma cells is correlated to a defect in raft membrane clustering. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 681–694.
43. Rotolo, J.; Stancevic, B.; Zhang, J.; Hua, G.; Fuller, J.; Yin, X.; Haimovitz-Friedman, A.; Kim, K.; Qian, M.; Cardo-Vila, M.; *et al.* Anti-ceramide antibody prevents the radiation gastrointestinal syndrome in mice. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 1786–1790.
44. Gulbins, E.; Kolesnick, R. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* **2003**, *22*, 7070–7077.
45. Kolesnick, R.; Fuks, Z. Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* **2003**, *22*, 5897–5906.
46. Bao, J.X.; Jin, S.; Zhang, F.; Wang, Z.C.; Li, N.; Li, P.L. Activation of membrane NADPH oxidase associated with lysosome-targeted acid sphingomyelinase in coronary endothelial cells. *Antioxid. Redox Signal.* **2010**, *12*, 703–712.
47. Zhang, A.Y.; Yi, F.; Zhang, G.; Gulbins, E.; Li, P.L. Lipid raft clustering and redox signaling platform formation in coronary arterial endothelial cells. *Hypertension* **2006**, *47*, 74–80.
48. Viola, A. The amplification of TCR signaling by dynamic membrane microdomains. *Trends Immunol.* **2001**, *22*, 322–327.

49. Li, X.; Han, W.Q.; Boini, K.M.; Xia, M.; Zhang, Y.; Li, P.L. TRAIL death receptor 4 signaling via lysosome fusion and membrane raft clustering in coronary arterial endothelial cells: Evidence from ASM knockout mice. *J. Mol. Med.* **2013**, *91*, 25–36.
50. Jin, S.; Zhang, Y.; Yi, F.; Li, P.L. Critical role of lipid raft redox signaling platforms in endostatin-induced coronary endothelial dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 485–490.
51. Collins-Underwood, J.R.; Zhao, W.; Sharpe, J.G.; Robbins, M.E. NADPH oxidase mediates radiation-induced oxidative stress in rat brain microvascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 929–938.
52. Contreras, F.X.; Villar, A.V.; Alonso, A.; Kolesnick, R.N.; Goni, F.M. Sphingomyelinase activity causes transbilayer lipid translocation in model and cell membranes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 37169–37174.
53. Chalfant, C.E.; Kishikawa, K.; Mumby, M.C.; Kamibayashi, C.; Bielawska, A.; Hannun, Y.A. Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20313–20317.
54. Chalfant, C.E.; Szulc, Z.; Roddy, P.; Bielawska, A.; Hannun, Y.A. The structural requirements for ceramide activation of serine-threonine protein phosphatases. *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 496–506.
55. Yan, F.; John, S.K.; Polk, D.B. Kinase suppressor of Ras determines survival of intestinal epithelial cells exposed to tumor necrosis factor. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 8668–8675.
56. Zhang, Y.; Yao, B.; Delikat, S.; Bayoumy, S.; Lin, X.H.; Basu, S.; McGinley, M.; Chan-Hui, P.Y.; Lichenstein, H.; Kolesnick, R. Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* **1997**, *89*, 63–72.
57. Yin, X.; Zafrullah, M.; Lee, H.; Haimovitz-Friedman, A.; Fuks, Z.; Kolesnick, R. A ceramide-binding C1 domain mediates kinase suppressor of ras membrane translocation. *Cell Physiol. Biochem.* **2009**, *24*, 219–230.
58. Bourbon, N.A.; Yun, J.; Kester, M. Ceramide directly activates protein kinase C zeta to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 35617–35623.
59. Lozano, J.; Berra, E.; Municio, M.M.; Diaz-Meco, M.T.; Dominguez, I.; Sanz, L.; Moscat, J. Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 19200–19202.
60. Muller, G.; Ayoub, M.; Storz, P.; Rennecke, J.; Fabbro, D.; Pfizenmaier, K. PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J.* **1995**, *14*, 1961–1969.
61. Heinrich, M.; Neumeyer, J.; Jakob, M.; Hallas, C.; Tchikov, V.; Winoto-Morbach, S.; Wickel, M.; Schneider-Brachert, W.; Trauzold, A.; Hethke, A.; *et al.* Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ.* **2004**, *11*, 550–563.
62. Church, L.D.; Hessler, G.; Goodall, J.E.; Rider, D.A.; Workman, C.J.; Vignali, D.A.; Bacon, P.A.; Gulbins, E.; Young, S.P. TNFR1-induced sphingomyelinase activation modulates TCR signaling by impairing store-operated Ca²⁺ influx. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *78*, 266–278.

63. Lepple-Wienhues, A.; Belka, C.; Laun, T.; Jekle, A.; Walter, B.; Wieland, U.; Welz, M.; Heil, L.; Kun, J.; Busch, G.; *et al.* Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13795–13800.
64. Szabo, I.; Gulbins, E.; Apfel, H.; Zhang, X.; Barth, P.; Busch, A.E.; Schlottmann, K.; Pongs, O.; Lang, F. Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K⁺ channel in T lymphocytes upon Fas stimulation. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20465–20469.
65. Wu, F.; Wilson, J.X. Peroxynitrite-dependent activation of protein phosphatase type 2A mediates microvascular endothelial barrier dysfunction. *Cardiovasc. Res.* **2009**, *81*, 38–45.
66. Haendeler, J.; Popp, R.; Goy, C.; Tischler, V.; Zeiher, A.M.; Dimmeler, S. Cathepsin D and H₂O₂ stimulate degradation of thioredoxin-1: Implication for endothelial cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 42945–42951.
67. Oubaha, M.; Gratton, J.P. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by atypical PKC zeta contributes to angiopoietin-1-dependent inhibition of VEGF-induced endothelial permeability *in vitro*. *Blood* **2009**, *114*, 3343–3351.
68. Friedman, M.; Ryan, U.S.; Davenport, W.C.; Chaney, E.L.; Strickland, D.L.; Kwock, L. Reversible alterations in cultured pulmonary artery endothelial cell monolayer morphology and albumin permeability induced by ionizing radiation. *J. Cell Physiol.* **1986**, *129*, 237–249.
69. Gabrys, D.; Greco, O.; Patel, G.; Prise, K.M.; Tozer, G.M.; Kanthou, C. Radiation effects on the cytoskeleton of endothelial cells and endothelial monolayer permeability. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2007**, *69*, 1553–1562.
70. Rousseau, M.; Gaugler, M.H.; Rodallec, A.; Bonnaud, S.; Paris, F.; Corre, I. RhoA GTPase regulates radiation-induced alterations in endothelial cell adhesion and migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *414*, 750–755.
71. Onoda, J.M.; Kantak, S.S.; Diglio, C.A. Radiation induced endothelial cell retraction *in vitro*: Correlation with acute pulmonary edema. *Pathol. Oncol. Res.* **1999**, *5*, 49–55.
72. Hall, A. Rho family GTPases. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 1378–1382.
73. Blirando, K.; Hneino, M.; Martelly, I.; Benderitter, M.; Milliat, F.; Francois, A. Mast cells and ionizing radiation induce a synergistic expression of inflammatory genes in endothelial cells by a mechanism involving p38alpha MAP kinase and (p65) NF-kappaB activation. *Radiat. Res.* **2012**, *178*, 556–567.
74. Gupta, N.; Nodzenski, E.; Khodarev, N.N.; Yu, J.; Khorasani, L.; Beckett, M.A.; Kufe, D.W.; Weichselbaum, R.R. Angiostatin effects on endothelial cells mediated by ceramide and RhoA. *EMBO Rep.* **2001**, *2*, 536–540.
75. Brenner, B.; Koppenhoefer, U.; Weinstock, C.; Linderkamp, O.; Lang, F.; Gulbins, E. Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22173–22181.
76. Del Pozo, M.A.; Alderson, N.B.; Kiosses, W.B.; Chiang, H.H.; Anderson, R.G.; Schwartz, M.A. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* **2004**, *303*, 839–842.

77. Plowman, S.J.; Muncke, C.; Parton, R.G.; Hancock, J.F. H-ras, K-ras, and inner plasma membrane raft proteins operate in nanoclusters with differential dependence on the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15500–15505.
78. Bentzen, S.M. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: Radiobiology meets molecular pathology. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 702–713.
79. Adams, M.J.; Hardenbergh, P.H.; Constine, L.S.; Lipshultz, S.E. Radiation-associated cardiovascular disease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2003**, *45*, 55–75.
80. Arenz, C. Small molecule inhibitors of acid sphingomyelinase. *Cell Physiol. Biochem.* **2010**, *26*, 1–8.
81. Kornhuber, J.; Tripal, P.; Reichel, M.; Muhle, C.; Rhein, C.; Muehlbacher, M.; Groemer, T.W.; Gulbins, E. Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMA)s: A novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol. Biochem.* **2010**, *26*, 9–20.
82. Kornhuber, J.; Muehlbacher, M.; Trapp, S.; Pechmann, S.; Friedl, A.; Reichel, M.; Muhle, C.; Terfloth, L.; Groemer, T.W.; Spitzer, G.M.; *et al.* Identification of novel functional inhibitors of acid sphingomyelinase. *PLoS One* **2011**, *6*, e23852.
83. Nahrlich, L.; Mainz, J.G.; Adams, C.; Engel, C.; Herrmann, G.; Icheva, V.; Lauer, J.; Deppisch, C.; Wirth, A.; Unger, K.; *et al.* Therapy of CF-patients with amitriptyline and placebo—A randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb multicenter, cohort-study. *Cell Physiol. Biochem.* **2013**, *31*, 505–512.
84. Xu, J.; Yan, X.; Gao, R.; Mao, L.; Cotrim, A.P.; Zheng, C.; Zhang, C.; Baum, B.J.; Wang, S. Effect of irradiation on microvascular endothelial cells of parotid glands in the miniature pig. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2010**, *78*, 897–903.
85. Simons, M.; Annex, B.H.; Laham, R.J.; Kleiman, N.; Henry, T.; Dauerman, H.; Udelson, J.E.; Gervino, E.V.; Pike, M.; Whitehouse, M.J.; *et al.* Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: Double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* **2002**, *105*, 788–793.
86. Ziobro, R.; Henry, B.; Edwards, M.J.; Lentsch, A.B.; Gulbins, E. Ceramide mediates lung fibrosis in cystic fibrosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *434*, 705–709.
87. Cuvillier, O.; Pirianov, G.; Kleuser, B.; Vanek, P.G.; Coso, O.A.; Gutkind, S.; Spiegel, S. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **1996**, *381*, 800–803.
88. Morita, Y.; Perez, G.I.; Paris, F.; Miranda, S.R.; Ehleiter, D.; Haimovitz-Friedman, A.; Fuks, Z.; Xie, Z.; Reed, J.C.; Schuchman, E.H.; *et al.* Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1109–1114.
89. Paris, F.; Perez, G.I.; Fuks, Z.; Haimovitz-Friedman, A.; Nguyen, H.; Bose, M.; Ilagan, A.; Hunt, P.A.; Morgan, W.F.; Tilly, J.L.; *et al.* Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 901–902.
90. Maceyka, M.; Payne, S.G.; Milstien, S.; Spiegel, S. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1585*, 193–201.

91. Bonnaud, S.; Niaudet, C.; Legoux, F.; Corre, I.; Delpon, G.; Saulquin, X.; Fuks, Z.; Gaugler, M.H.; Kolesnick, R.; Paris, F. Sphingosine-1-phosphate activates the AKT pathway to protect small intestines from radiation-induced endothelial apoptosis. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 9905–9915.
92. Maceyka, M.; Harikumar, K.B.; Milstien, S.; Spiegel, S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* **2012**, *22*, 50–60.
93. Cho, C.H.; Kammerer, R.A.; Lee, H.J.; Yasunaga, K.; Kim, K.T.; Choi, H.H.; Kim, W.; Kim, S.H.; Park, S.K.; Lee, G.M.; *et al.* Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5553–5558.
94. Bonnaud, S.; Niaudet, C.; Pottier, G.; Gaugler, M.H.; Millour, J.; Barbet, J.; Sabatier, L.; Paris, F. Sphingosine-1-phosphate protects proliferating endothelial cells from ceramide-induced apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 1803–1811.
95. Simons, K.; Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 31–39.
96. Matarazzo, S.; Quitadamo, M.C.; Mango, R.; Ciccone, S.; Novelli, G.; Biocca, S. Cholesterol-lowering drugs inhibit lectin-like oxidized low-density lipoprotein-1 receptor function by membrane raft disruption. *Mol. Pharmacol.* **2012**, *82*, 246–254.
97. Wei, Y.M.; Li, X.; Xiong, J.; Abais, J.M.; Xia, M.; Boini, K.M.; Zhang, Y.; Li, P.L. Attenuation by statins of membrane raft-redox signaling in coronary arterial endothelium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, *345*, 170–179.
98. Gaugler, M.H.; Vereycken-Holler, V.; Squiban, C.; Vandamme, M.; Vozenin-Brotons, M.C.; Benderitter, M. Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat. Res.* **2005**, *163*, 479–487.
99. Holler, V.; Buard, V.; Gaugler, M.H.; Guipaud, O.; Baudelin, C.; Sache, A.; Perez Mdel, R.; Squiban, C.; Tamarat, R.; Milliat, F.; *et al.* Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin. *J. Invest. Dermatol.* **2009**, *129*, 1280–1291.
100. Jain, M.K.; Ridker, P.M. Anti-inflammatory effects of statins: Clinical evidence and basic mechanisms. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 977–987.
101. Bourgier, C.; Haydont, V.; Milliat, F.; Francois, A.; Holler, V.; Lasser, P.; Bourhis, J.; Mathe, D.; Vozenin-Brotons, M.C. Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* **2005**, *54*, 336–343.
102. Haydont, V.; Bourgier, C.; Pocard, M.; Lusinchi, A.; Aigueperse, J.; Mathe, D.; Bourhis, J.; Vozenin-Brotons, M.C. Pravastatin Inhibits the Rho/CCN2/extracellular matrix cascade in human fibrosis explants and improves radiation-induced intestinal fibrosis in rats. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 5331–5340.
103. Moding, E.J.; Kastan, M.B.; Kirsch, D.G. Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 526–542.

Thèse de Doctorat

Maëva GUILLONNEAU

Etude de la nucléophosmine, nouvelle protéine associée à p38 MAPK, dans la réponse des cellules endothéliales à un stress oxydant aigu

Study of nucleophosmin, a new p38 MAPK partner, in endothelial cells response to acute oxidative stress

Résumé

Le compartiment microvasculaire est une cible importante du stress oxydant qui est un facteur majeur de la dysfonction endothéliale, notamment au cours d'exposition aux rayonnements ionisants. L'altération de l'endothélium induite par le stress oxydant est impliquée dans la toxicité radio-induite des tissus sains. Limiter les dysfonctions endothéliales est donc un enjeu important des traitements radiothérapeutiques actuels. Cet objectif nécessite une meilleure caractérisation de la signalisation du stress oxydant dans les cellules endothéliales. La voie p38 MAPK est incontournable dans la réponse au stress oxydant mais reste encore insuffisamment caractérisée. Par une approche protéomique, nous avons identifié la nucléophosmine (NPM) comme nouveau partenaire de p38 dans le cytoplasme des cellules endothéliales. La phosphatase PP2a est aussi associée à ce complexe NPM/p38. Nos travaux montrent que le stress oxydant (H_2O_2 , $500\mu M$) régule la déphosphorylation de NPM via PP2a, entraîne sa dissociation rapide du complexe et favorise sa translocation vers le noyau. De plus, nous montrons que la présence de NPM déphosphorylée au noyau altère la réponse des cellules aux dommages à l'ADN induits par le stress oxydant. Le céramide sphingolipide membranaire est également un facteur important des voies de stress, particulièrement dans les cellules endothéliales. Notre étude aborde donc l'implication de ce sphingolipide dans la régulation de la voie NPM/p38. Une meilleure caractérisation de la voie p38 et de ses acteurs permettra d'identifier de potentielles cibles afin de limiter les dysfonctions endothéliales et leurs conséquences délétères sur les tissus environnants.

Mots clés

Endothélium – stress oxydant – p38 MAPK – nucléophosmine – PP2A – céramide

Abstract

The microvascular compartment is a significant target of oxidative stress that is a major factor in endothelial dysfunction, especially during exposure to ionizing radiation. The alteration of endothelium induced by oxidative stress is involved in radiation-induced toxicity of normal tissues. Limiting endothelial dysfunction is therefore an important issue of current radiotherapeutic treatments. This objective requires a better characterization of oxidative stress signaling in endothelial cells. p38 MAPK pathway is essential in oxidative stress response but still insufficiently characterized. By using a proteomic approach, we identified nucleophosmin (NPM) as a new partner of p38 in the cytoplasm of endothelial cells. PP2a phosphatase is also associated with the NPM/p38 complex. Our work shows that oxidative stress (H_2O_2 , $500\mu M$) regulates the NPM dephosphorylation via PP2a, causes rapid dissociation of the complex, and promotes its translocation to the nucleus. In addition, we show that the presence of NPM dephosphorylated at T199 in the nucleus alters the cellular response to DNA damage induced by oxidative stress. The membrane sphingolipid ceramide is also an important factor in stress pathways, particularly in endothelial cells. Our study describes the involvement of this sphingolipid in the regulation of NPM/p38 pathway. A better characterization of the p38 pathway and its actors provided by our study will identify potential targets in order to limit endothelial dysfunction and its deleterious effect on surrounding tissues.

Key Words

Endothelium – oxidative stress – p38 MAPK – nucleophosmin – PP2A – ceramide