

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : cancérologie

Par

Steven LOHARD

PROPAGATION D'UN SIGNAL PRO-APOPTOTIQUE PARACRINE VIA LA VOIE cGAS/STING LORS DES CHIMIOTHÉRAPIES ANTIMITOTIQUES

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 3 mai 2019

Unité de recherche : U1232

Rapporteurs avant soutenance :

Pascale Bertrand, Directrice de Recherche, CEA, Fontenay-aux-Roses
Olivier Meurette, Maître de conférences des universités, CRCL, Lyon

Composition du Jury :

Président :

Stéphane Birklé, Professeur des universités, CRCINA, Nantes

Examineurs :

Gabriel Ichim, Chargé de Recherche INSERM, CRCL, Lyon
Philippe Juin, Directeur de Recherche INSERM, CRCINA, Nantes

Directrice de thèse :

Sophie Barillé-Nion, Chargée de Recherche INSERM, CRCINA, Nantes

Table des matières

I.	Objectif de la thèse	14
II.	Introduction.....	15
1.	Les cancers du sein.....	15
a.	Le cancer du sein : un problème de santé publique.	15
b.	Les différents types de cancers du sein.....	15
c.	La prise en charge thérapeutique des cancers du sein.	16
2.	La cellule cancéreuse.....	20
a.	Généralités.	20
b.	La succession d'altérations génétiques permet l'acquisition d'un phénotype cancéreux. ..	21
3.	L'apoptose	24
a.	Les différents types de mort cellulaire.....	24
b.	Généralités sur l'apoptose	27
c.	L'apoptose extrinsèque ou voie des récepteurs de mort	29
d.	L'apoptose intrinsèque ou mitochondriale	31
4.	Les protéines de la famille BCL-2	32
a.	Classification des protéines de la famille BCL-2	32
b.	Les modèles d'activation de BAX et BAK.....	34
c.	La famille BCL2 : senseur de nombreux stress	35
d.	Notion de priming apoptotique	36
e.	BH3 mimétiques.....	38
f.	Hétérogénéités inter et intra-tumorale de priming apoptotique révélées par l'utilisation de BH3 mimétiques.	39
5.	La mitose	42
a.	Généralités	42
b.	Contrôle de l'initiation de l'anaphase par le point de contrôle mitotique.	44
c.	Le modèle des réseaux compétitifs.....	46
d.	Les différentes destinées d'une cellule en arrêt mitotique lors d'un traitement par un antimitotique tel que le paclitaxel.	48
e.	La cellule aneuploïde après échappement à l'arrêt mitotique.	49
6.	Les micronoyaux.....	51
a.	Généralités	51
b.	Modèle d'étude.....	52
c.	Les enveloppes nucléaire et micronucléaire	53
d.	Les conséquences de la rupture de l'enveloppe micronucléaire	55

7.	La voie cGAS/STING	56
a.	Généralités	56
b.	Activation de cGAS	56
c.	Voies de signalisation du TNF α	58
d.	Voie de signalisation des IFN-I.....	59
e.	Détection de l'ADN hôte par cGAS.....	61
f.	La voie cGAS/STING dans les cancers.....	63
III.	Justification du sujet.....	67
IV.	Résultats.....	69
1.	Les cellules aneuploïdes générées par le paclitaxel ont une survie dépendante de BCL-xL suite à l'induction de NOXA.	69
a.	Le paclitaxel génère des cellules aneuploïdes par échappement à l'arrêt mitotique.	69
b.	Les cellules aneuploïdes sont dépendantes de BCL-xL.	72
c.	La dépendance à BCL-xL est liée à l'augmentation de l'expression de NOXA dans les cellules aneuploïdes.	74
d.	L'augmentation de l'expression de NOXA dans les cellules aneuploïdes est prévenue par la surexpression de LMNB2.....	76
2.	Les cellules cancéreuses subissant un stress mitotique par le paclitaxel augmentent de manière paracrine le priming apoptotique des cellules avoisinantes.	78
a.	Le paclitaxel déclenche l'apoptose de cellules cancéreuses primées pour l'apoptose indépendamment de leur état prolifératif.....	78
b.	Les cellules prétraitées par le paclitaxel sécrètent des facteurs solubles entraînant une augmentation paracrine du priming apoptotique.	81
3.	Les tumeurs mammaires traitées par du paclitaxel acquièrent un phénotype pro-inflammatoire dépendant de la voie cGAS/STING.	82
a.	Le paclitaxel induit un phénotype pro-inflammatoire dans des modèles de Patient-Derived Xenograft (PDX) de cancer du sein.....	84
b.	Le paclitaxel génère <i>in vivo</i> des micronoyaux cGAS positifs et induit durablement le TNF α , les IFN-I et NOXA.	86
c.	La relocalisation de cGAS sur les micronoyaux générés par des antimitotiques est réduite par la surexpression en LMNB2.....	88
d.	Le phénotype pro-inflammatoire des cellules traitées par le paclitaxel est dû à l'activation de la voie cGAS/STING via la rupture de l'enveloppe des micronoyaux.....	88
4.	L'augmentation du priming de manière paracrine dépend de l'activation de la voie cGAS/STING et est prépondérante pour l'activité anti-tumorale du paclitaxel.....	91
a.	L'augmentation du priming de manière paracrine par les cellules traitées au paclitaxel est dépendante de STING.	91
b.	L'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine par les cellules traitées au paclitaxel ou à l'AZD1152 dépend de la formation de micronoyaux et de la rupture de leur enveloppe.....	93

c.	L'activation de la voie cGAS/STING est indépendante de l'ADN mitochondrial.	93
d.	L'induction de NOXA dans les cellules aneuploïdes est indépendante de STING.	96
e.	La sensibilité des tumeurs mammaires au paclitaxel dépend de STING.	97
5.	L'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine est le résultat de la transcription du gène codant pour NOXA dans les cellules receveuses.	98
a.	Induction transcriptionnelle de NOXA dépendante de STING dans des modèles de tumeurs mammaires traitées au paclitaxel.	98
b.	Le milieu conditionné par des cellules traitées par du paclitaxel induit l'expression de NOXA dans les cellules receveuses.	99
c.	L'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine est due à l'induction de NOXA dans les cellules receveuses.	99
6.	L'induction de NOXA est dépendante du TNF α et est amplifiée par les IFN-I.	102
a.	Une signature IFN-I dans une tumeur mammaire est prédictive d'une sensibilité aigüe au paclitaxel.	102
b.	Corrélation entre les sensibilités <i>ex vivo</i> au TNF α et au paclitaxel.	105
c.	L'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine dépend de la sécrétion de TNF α et d'IFN-I par les cellules donneuses.	105
d.	L'induction paracrine de NOXA dans les cellules receveuses dépend du TNF α et des IFN-I.	108
e.	La combinaison des protéines recombinantes TNF α /IFN-I induit l'expression de NOXA. ...	108
f.	L'augmentation du priming apoptotique induite par la combinaison TNF α /IFN-I est dépendante de NOXA.	110
g.	La sensibilité au paclitaxel <i>in vivo</i> est dépendante du TNF α	112
7.	Un traitement paclitaxel/ABT-263 différé permet de mieux exploiter l'augmentation du priming apoptotique dépendante de STING.	113
V.	Discussion.	115
1.	Réponse apoptotique des cellules cancéreuses mammaires suite à un stress mitotique.	115
a.	La majorité des cellules cancéreuses cyclantes échappe à l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel.	115
b.	Déclenchement d'une réponse apoptotique dans les cellules aneuploïdes.	116
2.	Diffusion paracrine de signaux pro-apoptotiques par les cellules ayant subi un stress mitotique.	119
a.	Effets cytotoxiques du paclitaxel : l'arrêt mitotique comme unique réponse ?	119
b.	Les cellules échappant à l'arrêt mitotique augmentent le priming apoptotique de façon paracrine via l'activation de la voie cGAS/STING.	120
c.	L'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine repose sur l'induction de la protéine BH3-only NOXA dans les cellules receveuses.	122
d.	L'induction de NOXA est dépendante du TNF α et est amplifiée par les IFN-I.	123
e.	L'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine est mieux exploitée par un traitement par BH3 mimétique différé.	125

f.	Une imprégnation de la tumeur en IFN-I est prédictive d'une réponse au paclitaxel.....	127
VI.	Conclusion	128
VII.	Matériels et méthodes	130
1.	Lignées cellulaires et réactifs	130
2.	Analyses biochimiques	132
3.	Analyses par qPCR	133
4.	Analyses par cytométrie en flux	133
5.	Vidéomicroscopie.....	134
6.	Immunofluorescence et immunohistochimie	134
7.	Modèle d'étude <i>ex vivo</i>	135
8.	Expériences <i>In vivo</i>	136
9.	Analyses transcriptomiques	137
10.	Calcul des scores des signatures d'expression génique	137
11.	Analyses statistiques	139
12.	Tables	139
VIII.	Bibliographie	141
IX.	Annexes.....	155

Table des figures

Figure 1 : caractéristiques phénotypiques acquises par la cellule cancéreuse.....	21
Figure 2 : principaux types de mort cellulaire programmée.....	25
Figure 3 : voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.....	28
Figure 4 : activation des CASPASEs.....	30
Figure 5 : interactions entre les protéines de la famille BCL-2.....	33
Figure 6 : les modèles d'activation des protéines effectrices BAX et BAK.....	35
Figure 7 : une cellule peut être plus ou moins proche du seuil de déclenchement de la MOMP.....	37
Figure 8 : mise en évidence d'une hétérogénéité intra-tumorale de priming apoptotique par l'utilisation de BH3 mimétique.....	40
Figure 9 : les différentes étapes du cycle cellulaire.....	43
Figure 10 : les différentes étapes de la mitose.....	44
Figure 11 : le point de contrôle mitotique.....	45
Figure 12 : le modèle des réseaux compétitifs.....	47
Figure 13 : les différentes destinées d'une cellule exposée à un agent antimitotique tel que le paclitaxel.....	48
Figure 14 : génération d'un micronoyau par perturbation de la mitose.....	51
Figure 15 : génération de micronoyaux par inhibition de la formation du kinétochore sur le chromosome Y.....	53
Figure 16 : structure de l'enveloppe nucléaire.....	53
Figure 17 : un défaut d'organisation de la lamina entraîne une rupture de l'enveloppe micronucléaire.....	54
Figure 18 : le senseur de l'ADN cytosolique cGAS s'agrège au niveau des micronoyaux ayant une enveloppe rompue.....	55
Figure 19 : la voie de signalisation cGAS/STING.....	58
Figure 20 : voies de signalisation du TNF α	59
Figure 21: voies de signalisation des IFN-I.....	60
Figure 22 : les différents contextes cellulaires pouvant activer cGAS.....	61
Figure 23 : hernie présente au niveau de l'enveloppe nucléaire de cellules sénescents où s'agrège cGAS.....	62
Figure 24 : selon le caractère aiguë ou chronique des stimuli, la voie cGAS/STING pourrait être anti ou pro-tumorale.....	66
Figure 25 : le paclitaxel génère des cellules aneuploïdes par échappement à l'arrêt mitotique.....	71
Figure 26 : les cellules aneuploïdes sont dépendantes de BCL-xL.....	73
Figure 27 : la dépendance à BCL-xL des cellules aneuploïdes est liée à l'augmentation de l'expression de NOXA.....	75
Figure 28 : l'augmentation de l'expression de NOXA dans les cellules aneuploïdes est prévenue par la surexpression de LMNB2.....	77
Figure 29 : le paclitaxel déclenche l'apoptose de cellules tumorales primées pour l'apoptose indépendamment de leur état prolifératif.....	80
Figure 30 : les cellules traitées par le paclitaxel sécrètent des facteurs solubles entraînant une augmentation du priming apoptotique paracrine.....	83
Figure 31 : le paclitaxel induit un phénotype pro-inflammatoire dans des modèles de Patient-Derived Xenograft (PDX) de cancer du sein.....	85

Figure 32 : le paclitaxel génère in vivo des micronoyaux cGAS positifs et induit durablement le TNF α , les IFN-I et NOXA.	87
Figure 33 : la détection par le senseur de l'ADN cytosolique cGAS des micronoyaux générés par des antimétoproloides est réduite par la surexpression en LMNB2.....	89
Figure 34 : le phénotype pro-inflammatoire des cellules traitées par le paclitaxel est dû à l'activation de la voie cGAS/STING par la rupture de l'enveloppe des micronoyaux.	90
Figure 35 : l'augmentation du priming apoptotique paracrine par les cellules traitées au paclitaxel est dépendante de STING.	92
Figure 36 : l'augmentation du priming paracrine par les cellules traitées au paclitaxel dépend de la formation de micronoyaux et de la rupture de leur enveloppe.	94
Figure 37 : l'activation de la voie cGAS/STING est indépendante de l'ADN mitochondrial.	95
Figure 38 : l'induction de NOXA dans les cellules aneuploïdes (donneuses) est indépendante de STING.	96
Figure 39 : la sensibilité des tumeurs mammaires au paclitaxel dépend de STING.....	97
Figure 40 : induction transcriptionnelle de NOXA dépendante de STING dans les xénotransplantes de cellules MDA-MB-231 traitées au paclitaxel.	98
Figure 41 : le milieu conditionné par des cellules traitées par du paclitaxel induit NOXA dans les cellules receveuses.	100
Figure 42 : l'augmentation paracrine du priming est liée à l'induction de NOXA dans les cellules receveuses.	101
Figure 43 : caractéristique de la cohorte de tumeurs mammaires naïves de traitement dont le transcriptome a été analysé.	103
Figure 44 : une signature IFN-I dans une tumeur mammaire est prédictive d'une sensibilité accrue au paclitaxel.	104
Figure 45 : corrélation entre les sensibilités ex vivo au TNF α et au paclitaxel.	106
Figure 46 : l'augmentation paracrine du priming dépend de la sécrétion de TNF α et d'IFN-I par les cellules donneuses.	107
Figure 47 : l'induction paracrine de NOXA dans les cellules receveuses dépend du TNF α et des IFN-I.	109
Figure 48 : la combinaison des protéines recombinantes TNF α /IFN α induit l'expression de NOXA..	110
Figure 49 : l'augmentation du priming induite par la combinaison TNF α /IFN-I est dépendante de NOXA.	111
Figure 50 : la sensibilité au paclitaxel in vivo est dépendante du TNF α	112
Figure 51 : un traitement paclitaxel/ABT-263 différé permet de mieux exploiter l'augmentation paracrine du priming dépendant de STING.....	114
Figure 52 : propagation des signaux de mort par activation de la voie cGAS/STING lors d'un traitement antimétoproloide.	129

Liste des abréviations

ADCD : Autophagy-Dependent Cell Death	JAK1 : JAnus Kinase 1
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	LDCD : Lysosome-Dependent Cell Death
AIF : Apoptosis Inducing Factor	LHRH : Luteinizing Hormone Releasing Hormone
ALT : Alternative Lengthening of Telomeres	LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
APAF-1 : Apoptotic Protease Factor 1	LMN : LaMiNe
APC/C : Anaphase Promoting Complex/Cyclosome	MAD2 : Mitotic Arrest Deficient 2
ARN : Acide RiboNucléique	MCL-1 : Myeloid Cell Leukemia-1
ATP : Adénosine TriPhosphate	MIM : Mitochondrial Inner Membrane
AURKB : AURora Kinase B	MLKL : Mixed Lineage Kinase domain-Like
BAF : Barrier-to-Autointegration Factor	MOM : Mitochondrial Outer Membrane
BAK : BCL-2 Antagonist Killer	MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
BAX : BCL-2 Associated X	MPM2 : Mitotic Protein Monoclonal 2
BCL-2 : B-Cell Lymphoma 2	MPT : Mitochondrial Permeability Transition
BCL-xL : B-Cell Lymphoma extra Large	NET : Neutrophil Extracellular Trap
BCL-W : B-Cell Lymphoma W	NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B
BFL-1 : BCL-2-related isolated from Fetal Liver 1	NLR : Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptors
BH : BCL-2 Homology domain	NSG : NOD SCID Gamma
BID : BH3 Interacting-domain Death agonist	PAMP : Pathogene Associated Molecular Pattern
BIM : BCL-2 Interacting Mediator of cell death	PARP1 : Poly(ADP-Ribose) Polymérase 1
BUB3 : Budding Uninhibited by Benzimidazole 3	PR : Progesteron Receptor
BUBR1 : Budding Uninhibited by Benzimidazole-Related 1	PRR : Pattern Recognition Receptors
CARD : CASPase Recruitment Domain	PTP : Pore de Transition de Perméabilité
CASPASE : Cysteine-ASPartic proteASE	PUMA : P53 Upregulated Modulator of Apoptosis
CDC20 : Cell Division Cycle protein 20	Rb : Retinoblastoma
CDK : Cyclin-Dependent Kinase	RIPK3 : Receptor-Interacting Protein Kinase 3
CENP : CENTromere Protein	RLR : Retinoic acid-Inducible Gene (RIG)-I-Like Receptors
cGAMP : cyclique GMP-AMP	SAC : Spindle Assembly Checkpoint
cGAS : cyclic GMP-AMP synthase	SASP : Senescence-Associated Secretory Phenotype
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	SERM : Modulateurs Sélectifs des Récepteurs aux Œstrogènes
DAMP : Damage-Associated Molecular Patterns	SERD : Dégradeurs Sélectifs des Récepteurs aux Œstrogènes
DD : Death Domain	SMAC : Second Mitochondria-derived Activator of CASPASE
DED : Death Effector Domain	STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
DISC : Death-Inducing Signaling Complex	STING : STimulator of INTERferon Genes
DNase II : DésoxyriboNucléase II	TACE : Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme
ECTR : Extrachromosomal telomere repeat	tBID : BID tronqué
EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition	TBK1 : Tank-Binding Kinase 1
ER : Estrogen Receptor	TFAM : Mitochondrial Transcription Factor A
FADD : Fas Associated via Death Domain	TNF : Tumor Necrosis Factor
FGF : Fibroblast Growth Factor	TNFR1 : Récepteur 1 du TNF
GAS : Gamma-Activated Sequence	TRADD : Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain
GPX4 : Glutathione PeroXidase 4	TRAF : TNF Receptor Associated Factors
GTP : Guasonine TriPhosphate	TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
HAS (Haute Autorité de Santé)	TRAIL-R : Récepteur de TRAIL
HDAC : Histone DésACétylase	TSP1 : ThromboSPondine-1
HER2 : Human EGF (Epidermal Growth Factor) Receptor 2	TYK2 : TYrosine Kinase 2
HSP90 : Heat Shock Protein 90	VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein	XIST : X Inhibitory Specific Transcript
IFN-I : InterFéroNs de type I	
IFNAR : IFN α / β receptor	
IHC : ImmunoHistoChimie	
IKB : Inhibitor of Kappa B	
IKK : Inhibitor of Kappa B Kinase	
IL : InterLeukine	
IMS : InterMembrane Space	
INCa : Institut National du Cancer	
IRF : Interferon Regulatory Factor	
ISGF3 : Interferon-Stimulated Gene Factor 3	
ISRE : IFN-Stimulated Response Element	

Remerciements

Le travail de recherche présenté dans mon manuscrit de thèse n'aurait pu être réalisé sans l'aide précieuse de toute une équipe mais également le soutien de mes proches. Ainsi ai-je voulu remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail.

Philippe, merci de m'avoir accueilli dans ton équipe. Ce fut un réel plaisir de discuter avec toi durant nos réunions ou lorsque l'on se croisait dans les couloirs. Tu insuffles à ton équipe, non sans humour, une réelle énergie et une soif de comprendre propices à une recherche de qualité.

Sophie, un grand merci pour ton soutien et ta confiance depuis le début du master 2, tout au long de cette thèse et plus récemment pour appuyer ma candidature pour un post-doctorat. Tu m'as permis de travailler de façon autonome tout en étant présente lorsque j'avais des questions. Tu m'as donné tout les moyens matériels pour aller au bout de mes hypothèses. Ta grande réactivité lorsque je te demandais des lignées KO pour tel ou tel gènes m'a permis d'avancer rapidement dans mes recherches.

Un très grand merci à vous deux pour avoir fait de cette thèse une si agréable et enrichissante expérience.

Laurent, j'ai aimé travailler à tes côtés pour le papier de Céline. J'ai souvent été impressionné par ton raisonnement scientifique et tes questions, de prime abord déroutantes, finalement très justes. Tu t'es montré intéressé par mes travaux discutant parfois longuement avec moi. Tu as toujours été disponible pour répondre à mes questions de biologie moléculaire et tu n'as pas hésité à nous aider notamment pour le design des séquences guides pour CRISPR.

Fabien, j'ai dû te poser environ 1 million de questions pendant cette thèse. Ce qui est incroyable, c'est que tu as su répondre à toutes sans exception ! Un grand merci pour ton aide précieuse sur toute la bio-info de notre travail.

Nathalie, un grand merci pour ton aide sur les expériences *in vivo*. Tu t'es investie à 100 % dans notre travail contribuant énormément au papier que nous sommes en train de publier. Très consciencieuse et généreuse (encore merci pour le body STAR WARS) tu as été une formidable partenaire.

J'aimerais également remercier **Magali** pour ta bonne humeur communicative et **Aurélie**, pour le travail considérable de biologie moléculaire que tu as effectué pour notre projet. Merci **Fred** pour l'intérêt que tu as porté à notre travail et pour ton aide sur les analyses IHC.

Merci à **Pascal Jezequel, Olivier Kerdraon et Laurent David** pour votre contribution dans ce travail et pour votre disponibilité pour répondre à nos questions.

Merci à tous les étudiants passés dans l'équipe durant ces quatre années notamment **Dorian** pour m'avoir fait découvrir le padel, **Thomas** pour tes blagues parfois droles et **Kévin** pour avoir toujours été disponible quand j'avais besoin de ton aide.

Merci à **Elisabetta Marangoni** et **Valérie Trichet** pour avoir pris le temps de suivre mon travail lors des comités de suivi de thèse.

Merci aux membres du Jury, **Pascale Bertrand**, **Olivier Meurette**, **Gabriel Ichim** et **Stéphane Birklé** pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier **David Gilot**, mon directeur de thèse de pharmacie. Tu as été disponible, à l'écoute et de bon conseil lorsque je t'ai fait part de mon désir de me réorienter dans la recherche.

Un grand merci à **La Ligue contre le Cancer** pour avoir financé cette thèse.

Je tiens également à remercier mes **parents** ainsi que mes **frères** pour m'avoir soutenu dans mon projet de réorientation. Je fus surpris de votre réaction à l'annonce de ma reprise d'étude comme si c'était une évidence pour vous et qu'une question de temps avant que je prenne cette décision.

Cette thèse m'aura également permis de rencontrer ma femme. **Céline** tu es un modèle pour moi, aussi bien au laboratoire qu'à la maison. Tu m'as appris à profiter de la vie à chaque instant, à relativiser, à pardonner (encore difficile). Quelqu'un aurait dit de toi que tu as dû faire toutes les guerres pour être si forte aujourd'hui. Merci pour tes conseils, ton soutien, ton amour et pour m'avoir offert le plus beau des cadeaux.

À présent, direction le NIH à Washington. Encore merci à Sophie, Philippe et Laurent pour avoir soutenu ma candidature. En espérant que cette expérience soit aussi agréable et enrichissante que ne fut cette thèse.

I. Objectif de la thèse

Les protéines de la famille BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2) forment un réseau complexe et dynamique d'interactions ayant pour rôle majeur le contrôle de l'intégrité de la membrane externe mitochondriale (MOM, Mitochondrial Outer Membrane), dont la perméabilisation ou MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization) est l'évènement clé à l'origine du déclenchement de l'apoptose (Juin et al., 2013). Ces protéines sont réparties en deux groupes, les anti-apoptotiques et les pro-apoptotiques, générant un équilibre plus ou moins fragile évoluant en permanence en réponse aux signaux extra et intracellulaires reçus par la cellule (Montero et al., 2015; Ni Chonghaile et al., 2011; Sarosiek et al., 2017). Celle-ci ajuste ainsi sa survie ou son élimination en fonction de son environnement afin de garantir le maintien de l'homéostasie de l'organisme.

En raison d'une diminution de la charge pro-apoptotique et/ou d'une augmentation de la charge anti-apoptotique, ce réseau est souvent dérégulé dans les cellules cancéreuses (Balko et al., 2014; Juin et al., 2013). Le déséquilibre qui en résulte est à l'origine de résistances aux thérapies anticancéreuses dont les effets anti-tumoraux sont intimement liés aux réponses apoptotiques qu'elles génèrent (Montero et al., 2015). L'équipe du Dr. Philippe Juin étudie intensivement ce réseau de protéines en analysant son dynamisme subcellulaire (Pécot et al., 2016; Vuillier et al., 2018), cellulaire (Bah et al., 2014) et intercellulaire (Louault et al., 2019) afin de comprendre les mécanismes à l'origine de la sensibilité ou de la résistance aux traitements anticancéreux permettant à terme leur optimisation.

Un des axes de recherche de l'équipe consiste à comprendre les réponses des cellules cancéreuses mammaires aux antimétabolites, chimiothérapies fréquemment utilisées dans la prise en charge des cancers du sein, se confrontant cependant à de nombreuses résistances. S'inscrivant pleinement dans cette thématique, l'objectif de ma thèse est de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des effets anti-tumoraux des agents antimétabolites en identifiant leurs impacts *in vivo* sur les protéines de la famille BCL-2.

II. Introduction

1. Les cancers du sein

a. Le cancer du sein : un problème de santé publique.

Les chiffres parlent d'eux-mêmes, le cancer du sein demeure un problème de santé publique. Selon le rapport de l'Institut National du Cancer (INCa), 58 968 nouveaux cas de cancer du sein ont été diagnostiqués en 2017. Si le taux de mortalité baisse de 1,5 % par an en moyenne entre 2005 et 2012, le cancer du sein demeure à l'origine de 11 883 décès en 2017.

Représentant 31,8 % de l'ensemble des cancers incidents féminins, le cancer du sein est le plus fréquent chez la femme, devant le cancer colorectal et le cancer du poumon. Il est, de plus, le cancer à l'origine du plus grand nombre de décès chez la femme représentant 17,9 % des décès féminins par cancer.

b. Les différents types de cancers du sein.

Le cancer du sein est une maladie hétérogène. Ainsi, on ne parle plus du cancer du sein mais des cancers du sein pouvant être classés selon des critères histologiques ayant des valeurs diagnostiques et pronostiques. Les cancers du sein sont répartis en deux groupes, *in situ* ou infiltrant, selon leurs caractères invasifs. Chaque groupe est ensuite subdivisé en sous-groupes selon leurs caractéristiques histologiques et leurs profils de croissance.

L'analyse par immunohistochimie (IHC) de l'expression de récepteurs par les cellules cancéreuses mammaires a généré une nouvelle classification des cancers du sein. Véritable test compagnon, cette analyse a permis d'orienter les stratégies thérapeutiques en rendant éligibles certaines patientes à des thérapies ciblées. On distingue ainsi :

- les cancers luminaux (70 % des cancers du sein) exprimant les récepteurs aux œstrogènes (ER, Estrogen Receptor) et à la progestérone (PR, progesteron Receptor), hormono-dépendants, eux-mêmes subdivisés en deux sous-groupes A

et B selon leur caractère proliférant, le sous-groupe B étant le plus proliférant et de moins bon pronostic.

- les cancers surexprimant le récepteur HER2 (Human EGF (Epidermal Growth Factor) Receptor 2) (15 % des cancers du sein), résultat d'une amplification chromosomique du gène codant pour cette protéine.
- les cancers triples négatifs (15 % des cancers du sein) n'exprimant aucun des trois récepteurs HER2, PR et ER.

c. La prise en charge thérapeutique des cancers du sein.

Comme énoncé précédemment, la prise en charge thérapeutique des cancers du sein va grandement dépendre des caractéristiques biologiques de la tumeur. L'arsenal thérapeutique pour traiter les cancers du sein comprend la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et les thérapies ciblées, ces traitements pouvant être utilisés seuls ou associés.

➤ **Chirurgie**

L'exérèse chirurgicale est généralement réalisée dans un premier temps suivi ensuite d'un traitement par radiothérapie, chimiothérapie et/ou hormonothérapie. Il existe deux types d'intervention chirurgicale : la tumorectomie, chirurgie conservatrice consistant à retirer la tumeur, et la mastectomie, chirurgie non conservatrice consistant à retirer la totalité du sein.

Afin de réduire la taille tumorale et, ainsi, faciliter son exérèse, un traitement par chimiothérapie ou hormonothérapie avant l'intervention chirurgicale peut être réalisé. Le traitement est alors qualifié de néo-adjuvant.

Une analyse des ganglions axillaires drainant l'ensemble du sein, par la technique du ganglion sentinelle, permet de détecter la présence de cellules cancéreuses. Le résultat renseigne sur la nécessité d'effectuer une ablation des ganglions, intervention appelée curage ganglionnaire axillaire. Le ganglion sentinelle est le premier ganglion recevant le drainage lymphatique d'une tumeur. Il est représentatif des autres ganglions de l'aisselle et permet donc de déterminer si un curage axillaire est nécessaire ou non.

L'avantage de la technique du ganglion sentinelle est d'éviter les conséquences gênantes d'un curage ganglionnaire axillaire systématique, qui se révèle inutile lorsque les ganglions prélevés sont négatifs.

Si des cellules cancéreuses ont été détectées dans les ganglions axillaires, un curage ganglionnaire axillaire est réalisé. Cela consiste à enlever une dizaine de ganglions situés sous le bras. Il est réalisé sous anesthésie générale en même temps que la chirurgie conservatrice ou la mastectomie.

➤ **Radiothérapie**

La radiothérapie consiste en l'irradiation localisée des cellules cancéreuses par des rayons ionisants. Ces rayons permettent une action cytotoxique sur les cellules cancéreuses via la génération d'importants dommages à l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique). Le recours à la radiothérapie dépend du stade du cancer du sein. Elle est également indiquée pour traiter les métastases osseuses, cérébrales et ganglionnaires.

➤ **Chimiothérapie**

La chimiothérapie peut être utilisée avant l'exérèse chirurgicale (chimiothérapie néo-adjuvante) dans le cas de tumeur trop volumineuse ou pour permettre une chirurgie conservatrice. La chimiothérapie est le plus souvent utilisée après l'intervention chirurgicale (chimiothérapie adjuvante) dans le cas de cancers du sein présentant des métastases, de cancers du sein présentant un risque important de récurrence ou de cancers récidivants.

Les principes actifs actuellement utilisés sont :

- Les antimitotiques se fixant aux microtubules et inhibant leur dynamique, perturbant ainsi le bon déroulement de la mitose. Cette classe thérapeutique est divisée en 3 sous-groupes : les taxanes (paclitaxel, docétaxel) et les dérivés de l'épothilone (ixabépilone) inhibant la dépolymérisation des microtubules ; les vinca-alcaloïdes (vinorelbine, vinblastine, vincristine) inhibant la polymérisation des microtubules. Ces chimiothérapies vont par conséquent être actives sur des cellules en mitose.
- Les composés ciblant l'ADN. Les intercalants de l'ADN tels que les anthracyclines (doxorubicine, épirubicine), s'intercalant entre les bases, perturbant ainsi les

mécanismes régulant le métabolisme de l'ADN. Les alkylants de l'ADN (cyclophosphamide, sels de platine) se lient de façon covalente à l'ADN, entraînant ainsi des cassures lors de la réplication de l'ADN. Ces composés vont donc être actifs sur les cellules cyclantes.

- Les anti-métabolites tels que les inhibiteurs du métabolisme des folates (méthotrexate), précurseurs des bases puriques et pyrimidiques bloquant ainsi la synthèse de l'ADN. Ces agents anticancéreux sont donc actifs pendant la phase S du cycle lors de laquelle la synthèse de l'ADN a lieu.

Bien que certaines molécules puissent être utilisées seules telles que le paclitaxel et la doxorubicine, le traitement par chimiothérapie consiste généralement en une association de plusieurs principes actifs ayant des mécanismes d'action différents et des effets indésirables non-chevauchants.

➤ **Thérapies ciblées**

Les thérapies ciblées anticancéreuses sont des médicaments qui visent à bloquer la croissance et/ou la propagation des cellules tumorales en s'attaquant spécifiquement à certaines de leurs anomalies. Leur mode d'action principal passe par une inhibition des mécanismes mêmes de l'oncogénèse avec une spécificité importante pour les cellules cancéreuses ou leur microenvironnement. Il peut s'agir d'inhibiteurs intracellulaires (inhibiteurs de protéines kinases) ou d'inhibiteurs extracellulaires (anticorps monoclonaux). De plus une thérapie ciblée est un traitement qui n'a démontré de bénéfice que chez certains patients identifiés par un marqueur prédictif détecté par un test compagnon. Il existe plusieurs thérapies ciblées utilisées dans les cancers du sein, les deux principales étant l'hormonothérapie et les anticorps ciblant le domaine extracellulaire du récepteur HER2.

L'hormonothérapie a pour but de bloquer l'action pro-oncogénique des stéroïdes, œstrogènes et progestérone, dans les cancers du sein dits hormono-dépendants. Il existe quatre groupes de principes actifs utilisés dans le cadre d'une hormonothérapie :

- Les Modulateurs Sélectifs des Récepteurs aux Oestrogènes (SERM) tels que le tamoxifène. L'intérêt de ces composés réside dans leurs propriétés antagonistes dans le sein et agonistes dans les autres tissus, permettant de réduire les effets indésirables du traitement notamment au niveau des os.

- Les Dégradeurs Sélectifs des Récepteurs aux Oestrogènes (SERD) tels que le fulvestrant. Ces composés vont entraîner, après fixation, la diminution sélective de l'expression des récepteurs aux œstrogènes dans le tissu mammaire.
- Les inhibiteurs de l'aromatase (létrozole, anastrozole et exémestane) qui préviennent la synthèse des œstrogènes à partir des androgènes.
- Les analogues de la LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) (goséréline et leuproréline) qui suppriment la production des hormones féminines par les ovaires chez la femme non ménopausée. L'administration d'analogues de la LHRH a pour but d'hyperstimuler l'hypophyse. Cette dernière va finir par ne plus répondre et donc arrêter de stimuler à son tour les ovaires. La production d'œstrogènes est ainsi stoppée. Cela revient à induire une ménopause avec les symptômes qui lui sont associés.

Le type d'hormonothérapie et les doses utilisés sont différents chez les femmes ménopausées ou non. Chez la femme non ménopausée, les SERM ou SERD sont le plus souvent proposés en premier intention pour une durée de 5 ans. Chez la femme ménopausée, les inhibiteurs de l'aromatase sont généralement utilisés en premier intention pour une durée de 5 ans ou pendant 2 ans, suivis par un traitement par tamoxifène (pour un total de 5 ans de thérapie hormonale).

Les cancers du sein HER2 amplifié ont la particularité de présenter à la surface des cellules cancéreuses une quantité importante de protéines HER2, appartenant à la famille des récepteurs à l'EGF, rendant les cellules hypersensibles aux effets prolifératifs de l'EGF. Thérapie ciblée mise sur le marché en 2000, le trastuzumab, anticorps monoclonal dirigé contre ce récepteur, est le plus souvent démarré en association aux taxanes puis poursuivi seul pour une durée d'un an.

L'examen IHC de la tumeur permet de déterminer l'expression éventuelle des ER et PR et le statut HER2 et donc de savoir si des traitements par hormonothérapie ou par trastuzumab respectivement peuvent être utilisés.

D'autres thérapies ciblées sont présentes dans l'arsenal thérapeutique des cancers du sein telles que le palbociclib, inhibiteur des kinases du cycle cellulaire CDK4/6 (Cyclin-Dependent Kinase 4/6).

Source : guide de l'HAS (Haute Autorité de Santé) sur la prise en charge des cancers du sein – 2010.

2. La cellule cancéreuse

a. Généralités.

Bien que certains cancers puissent être déclenchés par des infections virales (lymphome de Burkitt déclenché par l'Epstein Barr Virus), bactériennes (adénocarcinome gastrique déclenché par l'*Helicobacter Pylori*) ou par une déstructuration tissulaire (Soto and Sonnenschein, 2011), la majorité des cancers est la conséquence d'une succession d'altérations génétiques (Hanahan and Weinberg, 2011). Le processus d'oncogenèse peut s'apparenter à une sélection Darwinienne où la progression tumorale a lieu au gré d'une suite d'expansion clonale. Ainsi l'acquisition d'une nouvelle altération génétique va conférer un avantage sélectif par rapport aux autres sous-clones (Yates et al., 2015).

Pour permettre le processus de cancérisation, les systèmes de surveillance de l'intégrité du génome, qui ne permettent que peu de mutation à chaque division cellulaire, doivent être altérés. Ainsi, plus de 50 % des tumeurs présentent une mutation de la protéine « gardienne du génome » P53 (Lane, 1992; Oren, 1985), dont la fonction est de bloquer la prolifération cellulaire voire de déclencher l'apoptose lors de la survenue de dommages à l'ADN (Lowe et al., 1993; Symonds et al., 1994; Yonish-Rouach et al., 1991). La perte de fonction de P53 pouvant être à l'origine d'un phénotype cancéreux et *in fine* du développement d'une tumeur, le gène codant pour cette protéine a été qualifié de gène suppresseur de tumeur. Regroupant divers autres gènes comme celui codant pour la protéine Rb (Retinoblastoma), ce terme définit un élément génétique dont la perte ou l'inactivation entraîne une croissance dérégulée des cellules.

b. La succession d'altérations génétiques permet l'acquisition d'un phénotype cancéreux.

La découverte d'altérations génétiques à l'origine de la cancérisation a révélé un processus d'une extrême complexité. En effet, les gènes mutés ainsi que l'ordre chronologique diffèrent entre les types de tumeurs mais également au sein d'un type donné. Les auteurs Hanahan et Weinberg ont établi un ensemble de caractéristiques phénotypiques acquises pendant le processus de cancérisation communes aux cellules tumorales quels que soient le type de cancer et les gènes mutés. Ils ont ainsi mis en évidence six grandes caractéristiques partagées par les cellules cancéreuses à savoir : une signalisation proliférative soutenue, l'échappement aux signaux anti-prolifératifs, la résistance à la mort cellulaire, l'induction de l'angiogénèse, l'activation d'un processus d'invasion et de dissémination métastatique et un potentiel répliatif infini (**Fig. 1**) (Hanahan and Weinberg, 2000).

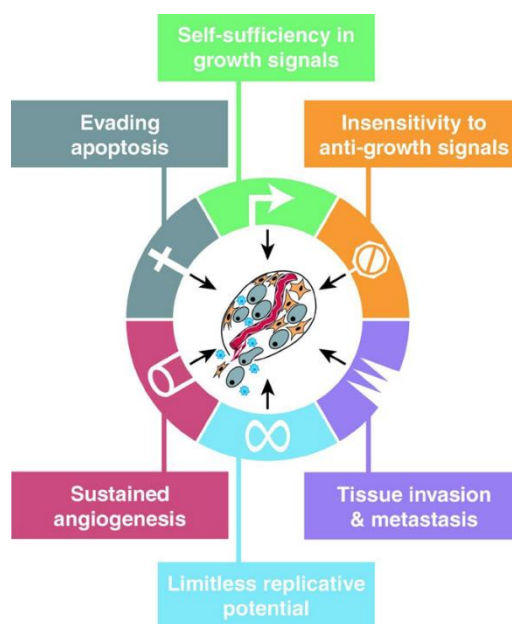


Figure 1 : caractéristiques phénotypiques acquises par la cellule cancéreuse.

Les cellules cancéreuses acquièrent pendant le processus de cancérisation six caractéristiques phénotypiques : une signalisation proliférative soutenue, l'échappement aux signaux anti-prolifératifs, la résistance à la mort cellulaire, l'induction de l'angiogénèse, l'activation d'un processus d'invasion et de dissémination métastatique et l'immortalité répliatif (Hanahan and Weinberg, 2000)

➤ **Signalisation proliférative soutenue :**

Afin de maintenir l'homéostasie tissulaire, la prolifération cellulaire est hautement régulée dans les tissus sains. Les cellules tumorales ont ainsi développé différentes stratégies pour maintenir une prolifération soutenue :

- Une stimulation mitogénique autocrine où la cellule produit les facteurs de croissance dont elle a besoin pour proliférer (Walsh et al., 1991).
- La surexpression de récepteurs aux facteurs de croissance (HER2 dans certaines cellules cancéreuses mammaires), rendant les cellules hautement sensibles à des stimulations mitogéniques.
- Une activation continue des voies de signalisation en aval des récepteurs de facteurs de croissance même en l'absence de stimulation mitogénique (Davies et al., 2002).
- La perte de boucles de rétrocontrôle négatif dont le but est d'atténuer les voies de signalisation activées par des stimuli mitogéniques (Amit et al., 2007).

➤ **Echappement aux signaux anti-prolifératifs :**

Les cellules cancéreuses ont, de plus, la capacité à échapper aux signaux anti-prolifératifs reposant essentiellement sur l'action de gènes suppresseurs de tumeur, les deux principaux étant *P53* et *Rb* (Zhu et al., 2015). La protéine *Rb* bloque l'entrée en cycle cellulaire en inhibant les facteurs de transcription E2Fs. La protéine *P53*, elle, est un senseur de divers stress pouvant nuire au bon déroulement de la division cellulaire tels que des dommages à l'ADN. Suivant la nature et l'importance du stress, *P53* entraînera soit un arrêt du cycle cellulaire, l'induction de la sénescence ou le déclenchement de l'apoptose (Lowe et al., 1993; Symonds et al., 1994).

➤ **Résistance à la mort cellulaire :**

Plusieurs processus sont à l'origine de la mort cellulaire. Les plus connus sont l'apoptose, la nécroptose et l'autophagie (nous ne parlerons ici que de l'apoptose). Plusieurs stratégies sont employées par les cellules cancéreuses pour empêcher le déclenchement de l'apoptose. La principale est évidemment la perte de fonction de la protéine *P53*. Une autre stratégie est la surexpression des protéines anti-apoptotiques telles que *BCL-xL* (B-Cell Lymphoma extra

Large) et MCL-1 (Myeloid Cell Leukemia-1) (Gong et al., 2013; Shimizu et al., 2010) ou la diminution de l'expression des protéines pro-apoptotiques telles que NOXA, PUMA (P53 Upregulated Modulator of Apoptosis) et BIM (BCL-2 Interacting Mediator of cell death) (Garrison et al., 2008; Mestre-Escorihuela et al., 2007; Richter-Larrea et al., 2010).

➤ **Induction de l'angiogénèse :**

La prolifération soutenue des cellules cancéreuses requière un apport en nutriments et en oxygène. Le développement d'une tumeur macroscopique nécessite donc une vascularisation, or les cellules endothéliales sont majoritairement quiescentes. Les cellules cancéreuses ont la capacité de sortir les cellules endothéliales de leur état de quiescence (switch angiogénique) par la production de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor et le FGF, Fibroblast Growth Factor) ou la diminution de facteurs anti-angiogéniques (TSP-1, Thrombospondine-1) (Carmeliet and Jain, 2011).

➤ **Activation d'un processus d'invasion et de dissémination métastatique**

La dissémination métastatique, principale cause de mortalité liée aux cancers, représente un enjeu considérable dans la prise en charge des patients. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), lors de laquelle les cellules cancéreuses perdent leurs attachements entre elles, semble être l'évènement initial de la dissémination d'une cellule cancéreuse (Hotz et al., 2007; Rhim et al., 2012) même si de récents travaux infirment cette hypothèse (Fischer et al., 2015; Zheng et al., 2015). S'en suit une migration trans-endothéliale pour entrer dans le compartiment sanguin (intravasation) puis en sortir (extravasation) et ainsi générer une micro-métastase.

➤ **Potentiel répliatif infini**

L'acquisition d'un potentiel répliatif illimité par les cellules cancéreuses est nécessaire à la formation de tumeur macroscopique. En effet, la grande majorité des cellules présente un nombre de division limité portant le nom de son découvreur : « la limite de Hayflick » (Hayflick and Moorhead, 1961). A l'origine de cette limite, une succession d'hexanucléotide en tandem,

les séquences télomériques, dont le but est la protection des chromosomes. La perte de séquences à chaque réplication de l'ADN conduit à une érosion des télomères déclenchant un état de sénescence (Abdallah et al., 2009). Pour contrecarrer cette limite, les cellules cancéreuses expriment la télomérase dont la fonction est d'ajouter des segments de télomère à l'extrémité des chromosomes conduisant à un processus d'immortalisation.

Dans une mise à jour de leur revue parue en 2011, Hanahan et Weinberg ont ajouté deux nouvelles caractéristiques phénotypiques partagées par les cellules cancéreuses : la reprogrammation du métabolisme, ou effet Warburg, et l'échappement au système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2011). La formation d'une tumeur cancéreuse est donc le résultat d'une succession d'altérations génétiques favorisées par un fond cellulaire hautement mutagène.

3. L'apoptose

a. Les différents types de mort cellulaire.

Contrairement à la mort cellulaire accidentelle correspondant à la disparition brutale d'une cellule exposée à des contraintes physiques, chimiques ou mécaniques, les morts cellulaires programmées reposent sur des voies de signalisation spécifiques pouvant par conséquent être modulées génétiquement ou pharmacologiquement.

La mort cellulaire se manifeste par des altérations morphologiques macroscopiques. Les morphologies des cellules ont historiquement été utilisées pour classer les morts cellulaires en trois différentes formes (Schweichel and Merker, 1973) : (1) mort cellulaire de type I ou apoptose caractérisée par un gonflement du cytoplasme, la condensation de la chromatine, une fragmentation du noyau et la formation de bourgeons au niveau de la membrane plasmique. L'étape finale est la formation de petites vésicules (corps apoptotiques) prises en charge par les cellules avoisinantes par phagocytose et dégradées dans des lysosomes. Ceci est permis par l'exposition de résidus phosphatidylsérine sur le versant extracellulaire de la membrane plasmique délivrant un signal « EAT ME » aux cellules avoisinantes.

Classiquement, l'apoptose est considérée comme une mort non inflammatoire, surtout impliquée dans des conditions physiologiques (développement et homéostasie tissulaire) (Green et al., 2009) ; (2) mort cellulaire de type II ou autophagie caractérisée par une intense vacuolisation cytoplasmique, et, de façon similaire à l'apoptose, se termine par une phagocytose par les cellules avoisinantes et une dégradation lysosomale ; (3) mort cellulaire de type III ou nécrose dont la particularité est l'absence de phagocytose des corps cellulaires, entraînant par conséquent la libération de DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) et l'induction d'une réponse pro-inflammatoire.

Ces dernières années, la découverte de nouvelles voies de signalisation a mis en évidence l'existence de nombreux types de mort cellulaire programmée ayant des mécanismes moléculaires très interconnectés (**Fig. 2**). Les types de mort cellulaire couvrent tout le spectre morphologique allant de la cellule nécrotique à la cellule apoptotique, et un profil immunomodulateur allant de la mort tolérogénique (anti-inflammatoire) à la mort immunogénique (pro-inflammatoire) (Galluzzi et al., 2018).

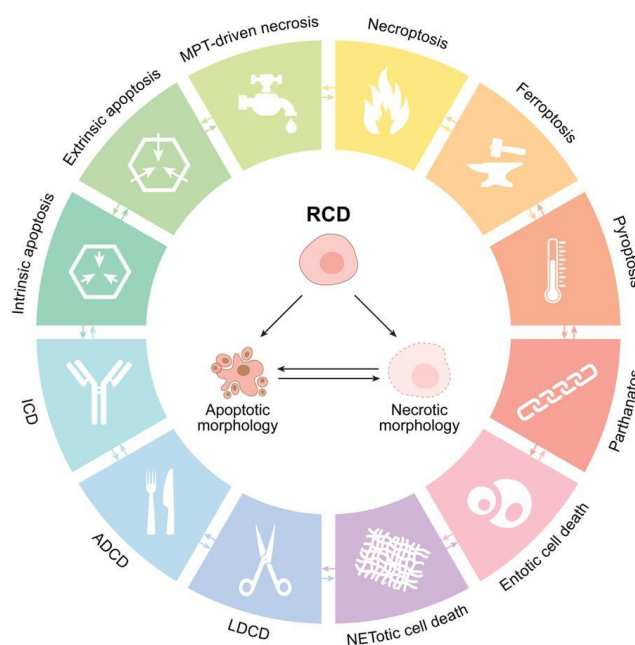


Figure 2 : principaux types de mort cellulaire programmée.

Les cellules exposées à des perturbations irrémédiables du microenvironnement intracellulaire ou extracellulaire peuvent activer l'un des nombreux types de mort programmée, conduisant finalement à leur disparition. (Galluzzi et al., 2018)

Ces types de mort cellulaire programmée sont :

L'autophagie (ADCD, Autophagy-Dependent Cell Death) : mort cellulaire dont les processus cellulaires dépendent des voies de signalisation de l'autophagie.

L'entose (Entotic cell death) : internalisation puis dégradation lysosomale d'une cellule par une autre cellule.

L'apoptose extrinsèque (Extrinsic apoptosis) : mort cellulaire initiée par la perturbation du microenvironnement extracellulaire détectée par des récepteurs membranaires, propagée par la CASPASE (Cysteine-ASPartic proteASE) 8 et exécutée par des CASPASEs effectrices (principalement la CASPASE 3).

La ferroptose (Ferroptosis) : mort cellulaire initiée par des perturbations oxydatives sous le contrôle de GPX4 (Glutathione PeroXidase 4) et pouvant être inhibée par des chélateurs du fer et des antioxydants lipophiles.

L'apoptose intrinsèque (Intrinsic apoptosis) : mort cellulaire initiée par des perturbations extra ou intracellulaires, délimitée par la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, et exécutée par des CASPASEs effectrices (principalement la CASPASE 3).

La mort cellulaire dépendante des lysosomes (LDCD, Lysosome-Dependent Cell Death) : mort cellulaire délimitée par la perméabilisation de la membrane plasmique par les lysosomes suivi par le relargage de cathepsine dans le cytosol.

La transition de perméabilité mitochondriale (Mitochondrial permeability transition (MPT)-driven necrosis) : mort cellulaire déclenchée par l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) localisé dans la membrane interne de la mitochondrie.

La nécroptose (Necroptosis) : mort cellulaire dépendante de MLKL (Mixed Lineage Kinase domain-Like) et de RIPK3 (Receptor-Interacting Protein Kinase 3) déclenchée par des perturbations intra ou extracellulaires.

La NETose (NETotic cell death) : mort cellulaire causée par la formation du NET (Neutrophil Extracellular Trap) qui est une structure composée de l'ADN des polynucléaires neutrophiles associé à un grand nombre de protéines piégeant les bactéries, les champignons et les protozoaires.

La parthanatose (Parthanatos) : mort cellulaire initiée par l'hyper-activation de PARP1 (Poly(ADP-Ribose) Polymérase 1) et exécutée par AIF (Apoptosis Inducing Factor) suite à sa translocation de la mitochondrie au noyau où il sera à l'origine d'une fragmentation de l'ADN.

La pyroptose (Pyroptosis) : mort cellulaire due à la formation de pores dans la membrane plasmique par les gasdermines.

Les effets anti-tumoraux des chimiothérapies reposant principalement sur le déclenchement de l'apoptose (Juin et al., 2013; Montero et al., 2015; Ni Chonghaile et al., 2011), nous nous sommes par la suite focalisés sur ce type de mort cellulaire.

b. Généralités sur l'apoptose

Le terme apoptose, provenant du grec et signifiant « chute en se détachant », a été pour la première fois proposé en 1972 pour distinguer la nécrose et la formation de structures cellulaires maintenant connues pour être des corps apoptotiques (Kerr et al., 1972). Bien qu'étant un programme génétiquement codé à l'origine d'une autodestruction de la cellule, l'apoptose est indispensable au développement de l'organisme et au maintien de son homéostasie (Ke et al., 2018). L'apoptose intervient notamment pour éliminer les cellules interdigitales et l'excès de neurones, et participe à l'éducation thymique des lymphocytes T par élimination des cellules T auto-réactives (Punt et al., 1994; Wright et al., 1983; Zakeri et al., 1994). Une dérégulation de l'apoptose sera à l'origine de diverses pathologies, des maladies neurodégénératives dans le cas d'un excès d'apoptose ou le développement de tumeur cancéreuse dans le cas d'un défaut d'apoptose (Ichim and Tait, 2016; Tait et al., 2014). Il existe deux voies principales d'induction de l'apoptose : la voie extrinsèque (ou voie des récepteurs de mort) et la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale), toutes deux reposant sur l'activation d'une famille de protéases à cystéine, les CASPASEs. L'apoptose peut classiquement être divisée en deux phases : une phase d'initiation, au cours de laquelle le signal apoptotique (intra- ou extracellulaire) est transmis aux CASPASEs initiatrices et une phase d'exécution correspondant à l'activation des CASPASEs effectrices (**Fig. 3**).

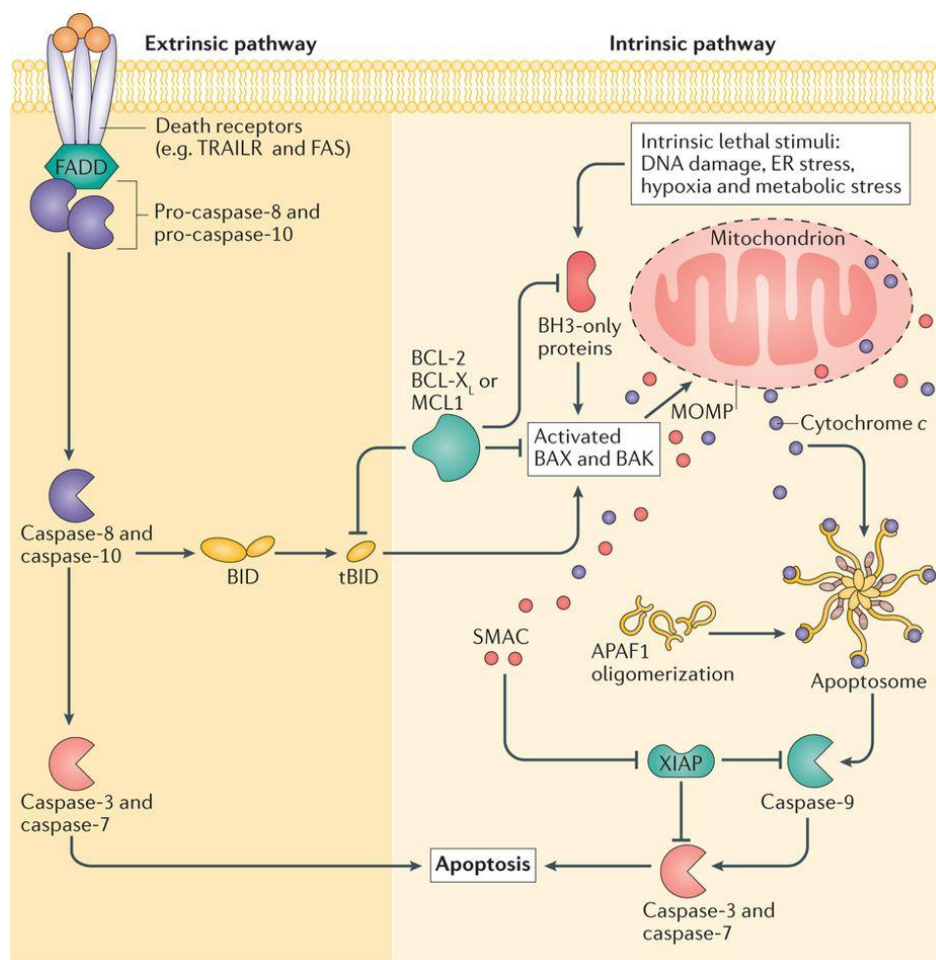


Figure 3 : voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.

Dans la voie extrinsèque de l'apoptose : après liaison de leurs ligands respectifs, les récepteurs de mort vont activer les CASPASEs initiatrices 8 et 10 qui, à leur tour, activeront les CASPASEs effectrices 3 et 7 induisant alors l'apoptose. Dans la voie intrinsèque de l'apoptose : divers stress cellulaires aboutissent à l'induction de protéines BH3-only qui, en activant BAX et BAK, déclenchent la MOMP. Cet évènement est par ailleurs inhibé par les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 telles que BCL-xL et MCL-1. La MOMP permet la libération dans le cytosol de protéines jusqu'alors contenues dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie comme le cytochrome c ou SMAC. Le cytochrome c interagit avec APAF-1 pour former l'apoptosome et ainsi active la CASPASE initiatrice 9 qui, à son tour, activera les CASPASEs effectrices 3 et 7 déclenchant l'apoptose. SMAC favorise l'apoptose en inhibant les protéines inhibitrices des CASPASEs de la famille des IAP telles que XIAP. Le clivage du BH3-only BID en tBID par la CASPASE 8, pouvant alors activer les protéines BAX et BAK, lie les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. (Ichim and Tait, 2016).

c. L'apoptose extrinsèque ou voie des récepteurs de mort

L'apoptose extrinsèque est déclenchée par la fixation de ligands spécifiques tels que le TNF (Tumor Necrosis Factor), FASL ou TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), sur des récepteurs présents au niveau de la membrane plasmique. Ces récepteurs, tels que le Récepteur 1 du TNF (TNFR1), FAS et le récepteur de TRAIL (TRAIL-R), appartiennent à la superfamille des récepteurs du TNF et sont activés suite à leur trimérisation après fixation de leurs ligands respectifs. Au niveau intracellulaire, l'apoptose extrinsèque repose sur la formation du DISC (Death-Inducing Signaling Complex) initié par le domaine DD (Death Domain) des récepteurs de mort.

Le DISC inclut, pour tous les récepteurs de mort, la protéine FADD (Fas Associated via Death Domain) et la CASPASE 8. Dans le cas d'une activation du TNFR1, un autre adaptateur, TRADD (Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain), est d'abord engagée permettant par la suite le recrutement de FADD. FADD est une protéine adaptatrice possédant un DD à son extrémité C-terminale et un Death Effector Domain (DED) à son extrémité N-terminale. FADD est recrutée au niveau des récepteurs de mort trimérisés via une interaction homotypique des DDs. Cette interaction induit un changement conformationnel de la protéine permettant une exposition du DED et le recrutement de la CASPASE 8 (la CASPASE 10 peut également être recrutée au niveau de la protéine FADD mais son rôle dans l'apoptose reste à définir) (**Fig.3**) (Hughes et al., 2016). La CASPASE 8 est exprimée sous forme de zymogène, la pro-CASPASE 8, comprenant deux DEDs (situés dans le pro-domaine), une grande sous-unité possédant une activité protéase, une région charnière et une petite sous-unité (**Fig. 4**). La CASPASE 8 se fixe au DED du FADD via son DED1 formant ainsi le DISC. Cette interaction va ainsi entraîner le recrutement d'autres pro-CASPASEs 8 via la fixation de leur DED1 au DED2 de la CASPASE 8 précédente, et ainsi aboutir à l'oligomérisation de 6 ou 8 pro-CASPASEs 8 (Fu et al., 2016). L'agrégation des pro-CASPASEs 8, permettant une dimérisation des domaines protéolytiques, entraîne un clivage auto-catalytique entre la région charnière et la petite sous-unité activant partiellement la protéine. Un second clivage entre le DED2 et la grande sous-unité entraîne la libération de l'enzyme mature (**Fig. 4**).

La CASPASE 8 va alors pouvoir activer les CASPASEs effectrices 3 et 7, également exprimées sous forme de zymogène, par clivage entre leurs grandes et petites sous-unités (**Fig. 4**). L'activité des CASPASEs effectrices pourra néanmoins être inhibée par les protéines de la

famille des IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein). La CASPASE 8 peut outrepasser cette inhibition en clivant le BH3-only BID (BH3 Interacting-domain Death agonist) en BID tronqué (tBID) qui pourra alors activer les protéines effectrices BAX (BCL-2 Associated X) et BAK (BCL-2 Antagonist Killer) entraînant le déclenchement d'une MOMP. La MOMP, à l'origine de la voie intrinsèque de l'apoptose, permettra de plus la libération d'inhibiteurs des IAP, tel que SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of CASPASE), restaurant ainsi l'action des CASPASEs effectrices (Jost et al., 2009).

Les cellules déclenchant une apoptose extrinsèque sans intervention de la mitochondrie sont appelées « cellules de type I ». Cependant, cette voie n'est généralement pas suffisante pour entraîner la mort cellulaire. Les cellules requérant l'intervention de la mitochondrie via le clivage de BID en tBID par la CASPASE 8 sont appelées « cellules de type II » (Tait and Green, 2010). Outre le déclenchement de l'apoptose, la liaison du TNF, TRAIL ou de FASL à leur récepteur respectif peut également entraîner une nécroptose et/ou activer d'autres voies de signalisation telles que les voies NF- κ B (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) ou MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases).

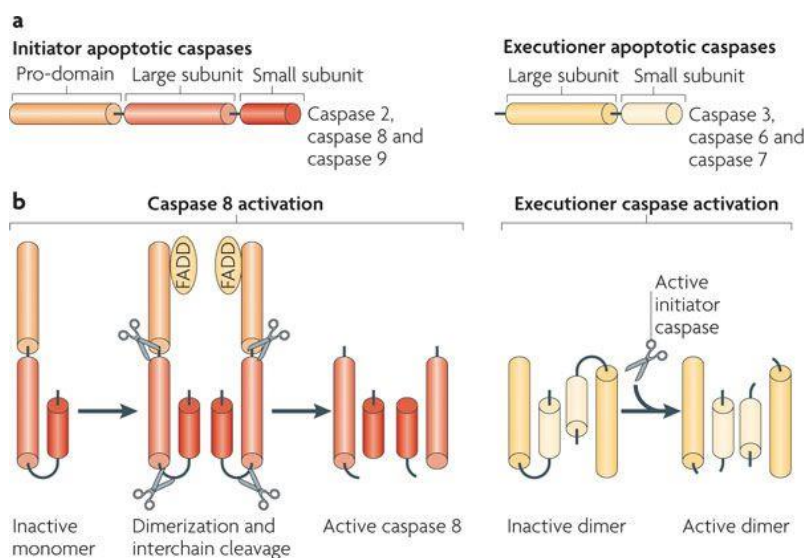


Figure 4 : activation des CASPASEs.

a. Les CASPASEs sont réparties en deux sous-groupes : les CASPASEs initiatrices (2, 8 et 9) et les CASPASEs effectrices (3, 6 et 7). Les CASPASEs initiatrices sont les premières à intervenir dans l'apoptose et leur activation est nécessaire à l'activation des CASPASEs effectrices. **b.** La dimérisation de monomères de CASPASEs inactives est nécessaire pour l'activation des CASPASEs initiatrices. Elle a lieu au niveau des pro-domaines et nécessite la présence de FADD. Une fois le dimère formé, le clivage entre le pro-domaine et la grande sous-unité ainsi qu'entre les petite et grande sous-unités engendre la formation de CASPASEs initiatrices actives. L'activation des CASPASEs effectrices se fait via le clivage entre les petite et grande sous-unités par les CASPASEs initiatrices activées (Tait and Green, 2010).

d. L'apoptose intrinsèque ou mitochondriale

La voie intrinsèque est également appelée voie mitochondriale de l'apoptose puisqu'elle repose obligatoirement sur la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Les fonctions principales des mitochondries sont en effet portées par ses membranes. La membrane interne mitochondriale (MIM, Mitochondrial Inner Membrane) porte la chaîne respiratoire, source d'énergie pour la cellule via la phosphorylation oxydative. La membrane externe mitochondriale délimite avec la MIM, l'espace inter-membranaire de la mitochondrie (IMS, InterMembrane Space) contenant des protéines activant ou favorisant la mort cellulaire telles que le cytochrome c ou SMAC.

La MOM est perméable à des molécules faisant moins de 5 kDa. Durant la MOMP, les pores formés par les protéines effectrices BAX ou BAK suite à leur activation permettront à des protéines de 100 kDa de rejoindre le cytosol (Rehm et al., 2003). La MOMP est un processus durant quelques secondes à l'échelle d'une mitochondrie mais requière environ cinq minutes pour que la totalité des mitochondries d'une cellule soit perméabilisée via un phénomène de propagation de la MOMP (Goldstein et al., 2000).

Pendant longtemps, la MOMP a été considérée comme un évènement binaire conduisant inévitablement à la mort cellulaire. Cependant, certains contextes cellulaires ont remis en cause ce dogme du « tout ou rien ». A ce jour, deux scénarii de MOMP partielle ne conduisant pas à la mort cellulaire ont été décrits : la MOMP incomplète lors de laquelle la MOMP se produit dans la plupart mais pas toutes les mitochondries (Tait et al., 2010) ; la MOMP minoritaire lors de laquelle la MOMP se produit seulement dans un faible nombre de mitochondrie après un stress sublétalement (Ichim et al., 2015). La survie des cellules subissant une MOMP incomplète repose sur l'absence ou l'inhibition de l'activité des CASPASEs permettant une expansion et un repeuplement des mitochondries (Tait et al., 2010). Dans le cas d'une MOMP minoritaire, l'activation sublétalement des CASPASEs entraîne des dommages à l'ADN pouvant induire une transformation oncogénique de la cellule (Ichim et al., 2015).

Outre son rôle crucial dans le transport des électrons de la chaîne respiratoire entre les complexes III et IV, le cytochrome c est également une protéine pro-apoptotique clé de l'apoptose mitochondriale située dans l'IMS de la mitochondrie. En effet, la perte d'intégrité de la MOM entraîne la libération du cytochrome c qui sera à l'origine de la formation de

l'apoptosome et de l'activation de la CASPASE initiatrice 9. Pour cela, le cytochrome c, une fois dans le compartiment cytosolique, interagit avec la protéine APAF-1 (Apoptotic Protease Factor 1). L'oligomérisation de 7 complexes cytochrome c-APAF-1 formant ainsi l'apoptosome (Kim et al., 2005). La formation de ce complexe permet l'exposition du domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) de APAF-1 alors en mesure de lier celui de la pro-CASPASE 9. La proximité des pro-CASPASEs 9 permet un auto-clivage et une stabilisation de la CASPASE 9 par formation de dimère. Tandis que l'apoptosome pourra poursuivre le recrutement de nouvelles pro-CASPASEs 9, les CASPASEs 9 néoformées activeront les CASPASEs effectrices 3 et 7 déclenchant ainsi l'apoptose (**Fig. 3**).

L'initiation de l'apoptose mitochondriale est donc liée à l'intégrité de la MOM. La MOMP est subtilement régulée par un réseau de protéines présentant de fortes similitudes structurales, les protéines de la famille BCL-2, véritables senseurs des stimuli extra et intracellulaires reçus par la cellule.

4. Les protéines de la famille BCL-2

a. Classification des protéines de la famille BCL-2

La fonction principale des protéines de la famille BCL-2 est de réguler l'intégrité de la MOM en fonction des stimuli pro ou anti-apoptotiques reçus par la cellule. Pour cela, cette famille se compose de deux grands groupes de protéines : les protéines pro-apoptotiques favorisant le déclenchement d'une MOMP et les protéines anti-apoptotiques inhibant la survenue de cet événement. Chaque membre de cette famille possède un ou plusieurs des quatre domaines BH (BCL-2 Homology domain) numérotés de BH1 à BH4. L'association des critères morphologiques et fonctionnels permet d'identifier trois groupes de protéines : les protéines anti-apoptotiques (BCL-xL, BCL-2, MCL-1, BCL-W (B cell lymphoma W) et BFL-1 (BCL-2-related isolated from Fetal Liver 1)) qui partagent avec les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK quatre domaines BH et des protéines pro-apoptotiques ne possédant que le domaine BH3 (tels que NOXA, PUMA, BID, BIM, BAD (BCL-2 Associated Death promoter), HRK (HaRaKiri)), protéines ainsi dénommées BH3-only (Singh et al., 2019). Les membres à multi-domaine pro

et anti-apoptotiques ont une structure globulaire présentant une poche hydrophobe formée par les domaines BH1, BH2 et BH3. Cette poche correspond à l'interface d'interaction avec le domaine BH3 d'autres protéines (Juin et al., 2013).

Le déclenchement de la MOMP est la conséquence de l'activation des protéines BAX et/ou BAK au niveau de la MOM. Cette activation va entraîner un changement de conformation leur permettant de s'oligomériser et, ainsi, de former des pores (Suzuki et al., 2000). Le subtil contrôle de l'intégrité de la MOM repose donc sur l'activation ou non de BAX et BAK et se fait via un ensemble d'interactions dynamiques entre les membres de la famille BCL2. Les protéines anti-apoptotiques, via leur poche hydrophobe, interagissent et par conséquent inhibent les membres pro-apoptotiques (BH3-only ou à multi-domaine) en fixant leur domaine BH3. De plus, via un phénomène appelé rétrotranslocation, les protéines anti-apoptotiques ont la capacité d'éloigner de la mitochondrie leur partenaire pro-apoptotique BAX et BAK diminuant davantage le risque de survenue d'une MOMP (Edlich et al., 2011; Gilmore et al., 2000). Bien qu'ayant une structure semblable, la séquence peptidique des membres d'une même classe diffère en certains points. La conséquence est la sélectivité d'interaction de certains membres de la famille BCL2 (Chen et al., 2005; Willis et al., 2005). Par exemple, NOXA interagit uniquement avec MCL-1 et BFL-1 (Fig. 5). Ces interactions sont de plus modulables notamment par modifications post-traductionnelles des protéines anti-apoptotiques. Par exemple, le laboratoire a démontré que lors d'un arrêt mitotique, BCL-xL est phosphorylé sur la sérine 62 diminuant son affinité pour BAX et donc ses fonctions anti-apoptotiques (Bah et al., 2014).

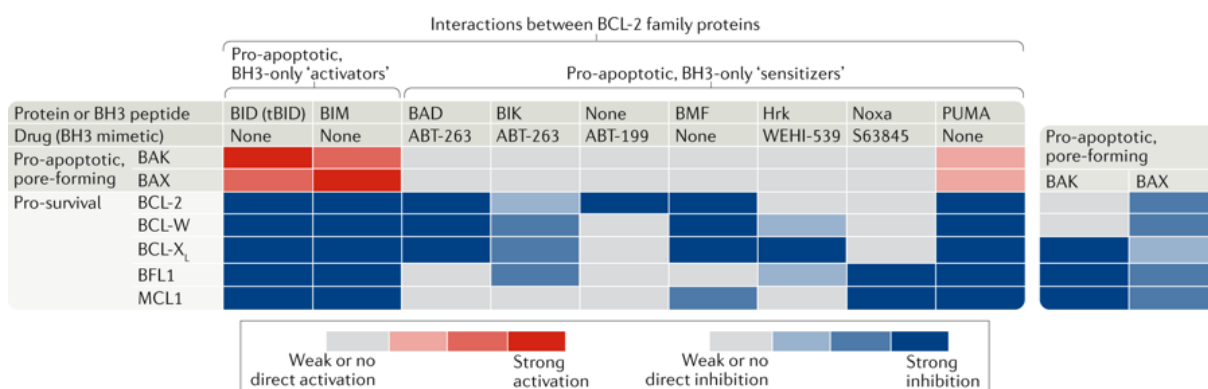


Figure 5 : interactions entre les protéines de la famille BCL-2.

En raison de différences de séquences peptidiques, il existe une spécificité d'interactions de certains membres de la famille BCL-2, qu'elles soient inhibitrices ou activatrices (Singh et al., 2019).

b. Les modèles d'activation de BAX et BAK

Le déclenchement de l'apoptose nécessite donc que les protéines anti-apoptotiques soient submergées et que BAX et BAK soient activés. Trois modèles d'interaction des membres de la famille BCL2 sont proposés pour expliquer l'activation de BAX et BAK (**Fig. 6**) (Czabotar et al., 2014).

Modèle d'activation indirecte :

Dans ce modèle, les effecteurs BAX et BAK sont constitutivement actifs, leur séquestration par les protéines anti-apoptotiques permettant de prévenir la survenue de la MOMP. En réponse à des stimuli pro-apoptotiques, les BH3-only nouvellement induits vont entrer en compétition avec BAX et BAK au niveau de la poche hydrophobe des anti-apoptotiques permettant alors leur libération et l'induction de la MOMP (Willis et al., 2005).

Modèle d'activation directe :

Des travaux ont mis en évidence l'existence de deux types de BH3-only : les BH3-only sensibilisateurs (NOXA, BAD, BIK, BMF) ayant la capacité d'interagir avec les protéines anti-apoptotiques et ainsi libérer d'éventuelles protéines pro-apoptotiques jusqu'alors séquestrées et les BH3-only activateurs (BIM et tBID) ayant en plus la capacité d'activer les effecteurs BAX et BAK via l'interaction de leur BH3 avec la poche hydrophobe des protéines effectrices. Dans le modèle d'activation directe, les protéines anti-apoptotiques préviennent l'activation de BAX et BAK en séquestrant les BH3-only activateurs. En raison d'une affinité plus importante, les BH3-only sensibilisateurs prennent la place des BH3-only activateurs dans la poche hydrophobe des anti-apoptotiques, permettant ainsi l'activation des effecteurs et le déclenchement de la MOMP (Letai et al., 2002; Wei et al., 2000).

Modèle unifié :

Ces deux modèles présentent des contradictions. Llambi a proposé un modèle unifié suggérant que ces modèles ne sont pas nécessairement exclusifs. Dans ce modèle, les protéines anti-apoptotiques agissent soit en séquestrant les BH3-only activateurs laissant les effecteurs inactifs (mode 1) soit en capturant les effecteurs BAX et BAK juste après leur activation par les BH3-only activateurs libres (mode 2). Quel que soit le mode d'inhibition des

anti-apoptotiques, celui-ci est bloqué par l'action des BH3-only sensibilisateurs (Llambi et al., 2011).

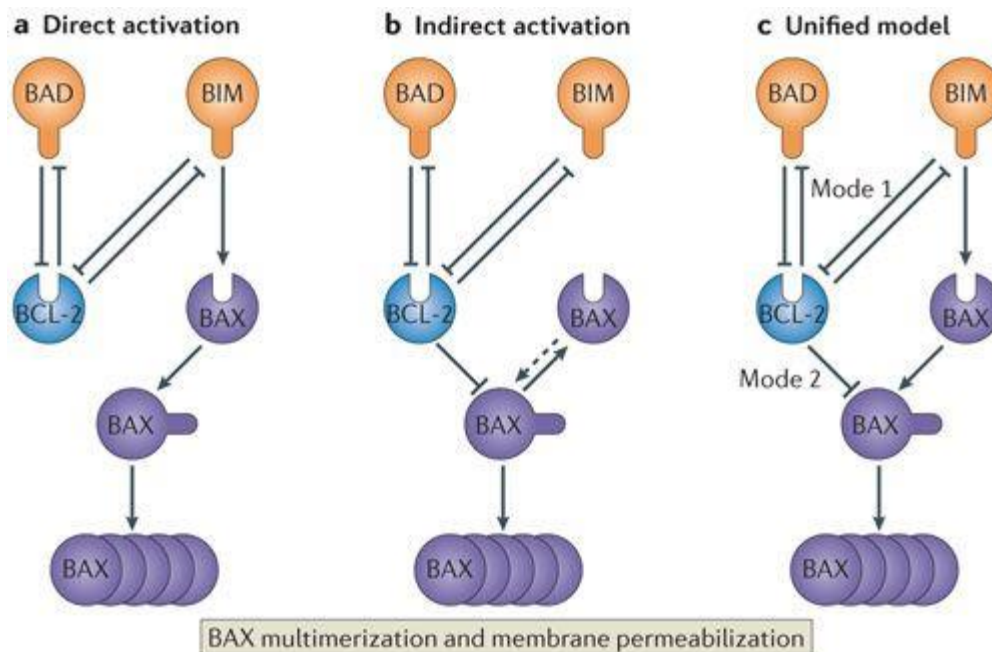


Figure 6 : les modèles d'activation des protéines effectrices BAX et BAK.

a. Dans le modèle direct, la séquestration des BH3-only activateurs par les protéines anti-apoptotiques est levée par l'induction de BH3-only sensibilisateurs permettant l'activation des effecteurs BAX et BAK. **b.** Dans le modèle indirect, la séquestration des effecteurs BAX et BAK constitutivement actifs par les protéines anti-apoptotiques est levée par l'induction de BH3-only. **c.** Dans le modèle unifié, les protéines anti-apoptotiques séquestrent les effecteurs BAX et BAK activés mais également les BH3-only activateurs. Ces deux modes d'inhibition sont contrecarrés par l'induction de BH3-only sensibilisateurs (Czabotar et al., 2014).

c. La famille BCL2 : senseur de nombreux stress

L'apoptose intrinsèque peut être déclenchée par divers stimuli tels que les dommages à l'ADN (radiation, chimiothérapies génotoxiques) (Kaufmann and Earnshaw, 2000; Sarosiek et al., 2017), des stress du réticulum endoplasmique (Corazzari et al., 2017), des dysfonctionnements des mitochondries (Panduri et al., 2004) ou l'activation d'oncogènes (notamment dans le cas de l'oncogène MYC) (Murphy et al., 2008). Les cellules peuvent également entrer en apoptose lors d'un défaut de stimulation (privation en nutriment, défaut de facteurs de croissance) (Farlie et al., 1995; Mercille and Massie, 1994). La diversité des stimuli apoptotiques a en miroir la diversité des facteurs pro-apoptotiques qu'elle induit. Par exemple, les dommages à l'ADN induisent une apoptose par déclenchement de

l'activité transcriptionnelle de P53 pour ses gènes cibles notamment ceux codant pour les BH3-only PUMA et NOXA (Wiederschain et al., 2005) tandis que le défaut en facteur de croissance conduit à l'induction transcriptionnelle de BIM (Deng et al., 2007). Outre l'induction transcriptionnelle de protéines pro-apoptotiques, ces stimuli peuvent également contrecarrer le phénomène de rétrotranslocation des effecteurs BAX et BAK favorisant ainsi la survenue d'une MOMP. En effet, notre équipe a démontré que la protéine E2F1, induite par des stimuli apoptogènes (chimiothérapies), diminuait la rétrotranslocation de BAK en interagissant et perturbant la mobilité de BCL-xL déclenchant ainsi une MOMP (Vuillier et al., 2018).

d. Notion de priming apoptotique

Les niveaux d'expression des protéines de la famille BCL-2 dépendent du tissu, du stade de développement et de tous les stress et dommages que la cellule aura subi. La balance entre les protéines pro et anti-apoptotiques détermine si une cellule vit ou entre en apoptose (Ni Chonghaile et al., 2011). Une cellule qui survit en exprimant juste assez de protéines anti-apoptotiques pour tamponner les protéines pro-apoptotiques existantes est définie comme étant « primée » pour l'apoptose. Ces cellules pourront alors déclencher une MOMP en réponse à un très faible signal pro-apoptotique. En revanche, une cellule qui exprime des anti-apoptotiques en quantité importante permettant de tamponner tous les pro-apoptotiques existants et d'éventuelles protéines nouvellement synthétisées est définie comme « non primée ». Enfin, une cellule ne pouvant pas déclencher de MOMP en raison d'une expression trop faible des effecteurs BAX et BAK est définie comme réfractaire à l'apoptose. Illustré dans la figure de façon catégorique, il existe en fait un continuum de priming, les cellules pouvant être à n'importe quel stade entre les états primé et non primé (**Fig. 7**) (Singh et al., 2019).

En conclusion, le priming d'une cellule se définit par sa proximité du seuil de déclenchement de la MOMP.

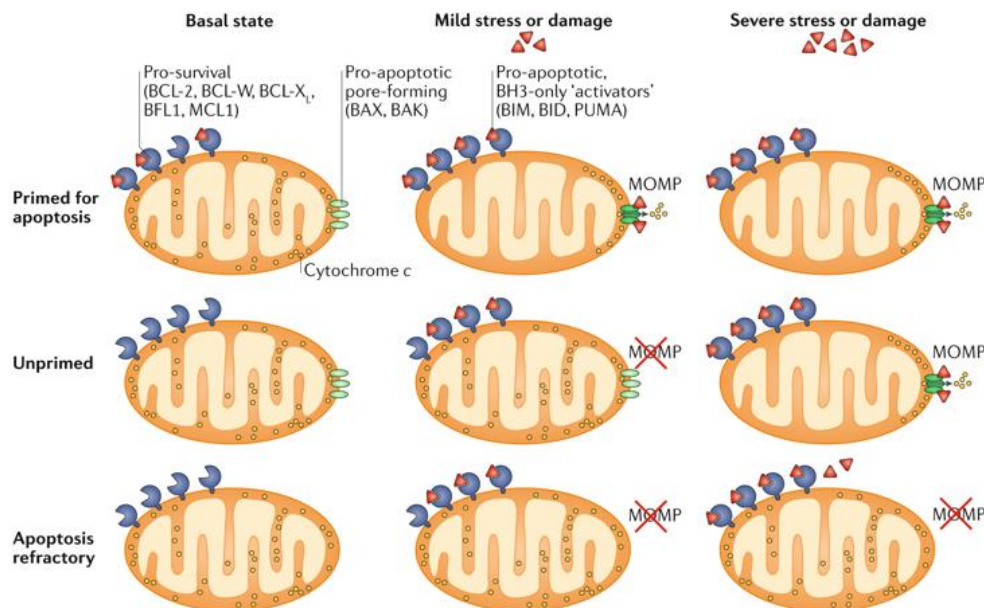


Figure 7 : une cellule peut être plus ou moins proche du seuil de déclenchement de la MOMP.

Les cellules primées pour l'apoptose expriment de grandes quantités de protéines pro-apoptotiques (ou de faibles quantités de protéines anti-apoptotiques) de façon basale. Ainsi, même un léger stress induisant l'expression de protéines pro-apoptotiques peut déclencher la MOMP. Les cellules non primées pour l'apoptose peuvent également déclencher une apoptose mais requièrent de plus importants stress pour submerger les protéines anti-apoptotiques non impliquées de façon basale dans la séquestration de protéines pro-apoptotiques. Les cellules réfractaires n'expriment pas BAX et BAK à des niveaux suffisants pour déclencher la MOMP même sous l'effet d'importants stress (Singh et al., 2019).

De récents travaux ont mis en évidence une hétérogénéité de priming apoptotique des cellules saines selon l'origine du tissu (Sarosiek et al., 2017) : les neurones présentant un faible priming contrairement aux cellules hématopoïétiques, ceci expliquant les effets secondaires des chimiothérapies différents selon les tissus et l'âge des patients. De plus, les auteurs ont démontré que le priming apoptotique des cellules d'un lignage donné évoluait avec le temps : à mesure du vieillissement de l'être humain, le priming des cellules diminue, cette diminution étant due à une baisse de l'expression des effecteurs BAX et BAK rendant les cellules réfractaires à l'apoptose. En raison d'une prolifération soutenue inhérente à la formation d'une tumeur, les cellules cancéreuses sont soumises à des conditions extrêmes : compression mécanique, hypoxie, carence en nutriment et en facteur de croissance... Ceci, associé aux effets pro-apoptotiques d'oncogènes comme cMyc (notamment par induction de BIM et de BAX), résulte en une augmentation du priming apoptotique des cellules cancéreuses (par rapport aux cellules normales) par augmentation des protéines pro-apoptotiques ou par

diminution des protéines anti-apoptotiques (Certo et al., 2006; Egle et al., 2004; Mitchell et al., 2000). Il est à noter que, dans les conditions de culture recommandées par les fournisseurs de lignées cellulaires, les cellules cultivées *in vitro* ne sont pas primées pour l'apoptose. Ceci peut être expliqué par les conditions de culture optimales dans lesquelles sont cultivées les cellules (Gillet et al., 2013). Afin de mimer le priming apoptotique des cellules présentes au sein d'une tumeur, l'équipe de Stephen Tait a mis au point des lignées cellulaires dites mito-primées par surexpression équimolaire d'un anti-apoptotique et d'un pro-apoptotique pouvant interagir entre eux (par exemple tBID et BCL-xL) (Lopez et al., 2016). Une autre possibilité, utilisée dans de récents travaux de l'équipe, consiste à réduire l'apport en nutriment pour primer les cellules (Louault et al., 2019).

Les thérapies anticancéreuses, en induisant la synthèse de protéines pro-apoptotiques, vont modifier l'état basal du priming des cellules cancéreuses. Le laboratoire d'Anthony Letai a démontré que l'augmentation ou non du priming apoptotique après un traitement anticancéreux était l'élément principal déterminant la sensibilité ou la résistance d'une tumeur (Ni Chonghaile et al., 2011). De plus, ce même laboratoire a ensuite démontré que l'analyse du priming permettait de prédire la réponse d'une tumeur à des chimiothérapies, et donc de choisir la thérapie optimale. En effet, l'analyse du priming apoptotique faite sur des cellules cancéreuses issues de biopsie et soumises à divers traitements permettait de connaître, en quelques heures, le traitement engendrant la plus forte augmentation de priming. L'analyse de la mort cellulaire trois jours après le traitement, la réponse *in vivo* ainsi que la survie sans progression sont toutes intimement corrélées à l'augmentation du priming apoptotique mesurée quelques heures après le traitement validant ainsi ce modèle préclinique (Montero et al., 2015).

e. BH3 mimétiques

Que l'état de priming apoptotique soit basal ou induit par des agents anticancéreux, la survie des cellules cancéreuses primées est dépendante des protéines anti-apoptotiques pour tamponner leurs partenaires pro-apoptotiques présents, rendant pertinent leur ciblage pharmacologique. Plusieurs molécules, inhibitrices des protéines anti-apoptotiques, ont ainsi été développées. Ces molécules sont appelées BH3 mimétiques car elles miment le domaine

BH3 des protéines BH3-only en se logeant dans la poche hydrophobe des anti-apoptotiques. Les BH3 mimétiques peuvent être spécifiques d'une protéine (BCL-xL pour le WEHI-539) ou cibler plusieurs anti-apoptotiques (BCL-xL, BCL-2 et BCL-W pour l'ABT-737). Dans le cas de cellules primées pour l'apoptose, les BH3 mimétiques vont déplacer les pro-apoptotiques jusqu'alors séquestrés et ainsi déclencher l'apoptose.

Les BH3 mimétiques sont de prometteuses stratégies anticancéreuses seules ou en combinaison avec d'autres agents anticancéreux. Tandis que l'ABT 199 (ou Venetoclax), inhibiteur sélectif de BCL-2, est d'ores et déjà utilisé en clinique dans la prise en charge de la leucémie lymphoïde chronique (LLC), plusieurs BH3 mimétiques sont également en essai clinique pour traiter diverses tumeurs solides. Un des problèmes majeurs que rencontrent les inhibiteurs de BCL-xL est l'induction d'une thrombocytopenie, les plaquettes ayant une survie très dépendante de cet anti-apoptotique (Vlahovic et al., 2014).

f. Hétérogénéités inter et intra-tumorale de priming apoptotique révélées par l'utilisation de BH3 mimétiques.

Etant donné l'extrême complexité du réseau formé par les protéines de la famille BCL-2 pour réguler l'intégrité de la MOM, il est difficile de connaître le priming apoptotique d'une cellule/tumeur via des approches biochimiques. En revanche, des approches fonctionnelles, en délivrant des signaux pro-apoptotiques directement au niveau des mitochondries, permettent de mettre en évidence le caractère primé ou non d'une cellule. Une de ces approches correspond au BH3 profiling où de petits peptides mimant des domaines BH3 des protéines BH3-only sont incorporés dans les cellules après perméabilisation douce de la membrane plasmique, la perte de cytochrome c étant par la suite mesurée. En fonction du type de peptide et de la quantité qu'il a fallu ajouter pour induire la MOMP, il est possible de déterminer le caractère primé ou non d'une cellule pour l'apoptose ainsi que la nature des anti-apoptotiques impliqués (Davids et al., 2012; Montero et al., 2015; Ni Chonghaile et al., 2011; Sarosiek et al., 2017). Une autre approche consiste à exposer les cellules à divers BH3 mimétiques spécifiques d'un anti-apoptotique. Cette technique, plus simple, est cependant dépendante des caractères physico-chimiques propres à la molécule (notamment son affinité pour les anti-apoptotiques) et peut être impactée par d'éventuels

effets non spécifiques des BH3 mimétiques ou la présence de pompes d'efflux dans les membranes plasmiques des cellules cancéreuses.

Des travaux récemment publiés (Soderquist et al., 2018) ont permis de révéler le priming apoptotique d'un important nombre de lignées cellulaires. Pour cela les auteurs ont exposé plusieurs dizaines de lignées cellulaires provenant de différents tissus à des BH3 mimétiques ciblant BCL-xL (WEHI-539), BCL-2 (ABT-199) et MCL-1 (A-1210477). Les résultats obtenus mettent en évidence une hétérogénéité de priming de lignées cellulaires bien que provenant du même tissu. De plus, parmi les lignées primées d'un même tissu, les membres de la famille BCL-2 impliqués peuvent différer. Ainsi, parmi les lignées provenant de cancers du sein, les cellules MDA-MB-231 sont dépendantes de BCL-xL pour leur survie tandis que les cellules MCF7 sont dépendantes de MCL-1. Ces résultats démontrent l'existence d'une hétérogénéité inter-tumorale de priming apoptotique même au sein d'un même type de cancer.

En plus d'une hétérogénéité inter-tumorale, notre équipe a démontré qu'au sein d'une même lignée cellulaire, une différence de priming apoptotique existait entre les cellules résultant de différence stochastique d'expression de BCL-xL (Pécot et al., 2016). De plus, de nombreux travaux ont rapporté des sensibilités partielles de tumeurs, qu'elles soient solides ou liquides, à des BH3 mimétiques (Barreca et al., 2014; Bholra et al., 2016; Keitel et al., 2014; Zervantonakis et al., 2017), démontrant qu'une hétérogénéité intra-tumorale de priming existe également (**Fig. 8**).

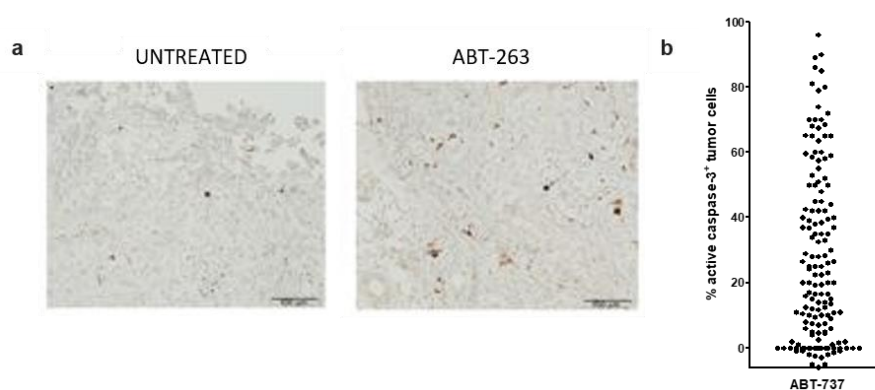


Figure 8 : mise en évidence d'une hétérogénéité intra-tumorale de priming apoptotique par l'utilisation de BH3 mimétique.

a, b. L'évaluation des réponses apoptotiques in vivo d'un modèle de PDX de cancer ovarien à l'ABT-263 (forme orale de l'ABT-737) par marquage IHC pour la CASPASE-3 clivée (a) (barre d'échelle : 100 μ m) (Zervantonakis et al., 2017) et *ex vivo* de 163 tumeurs mammaires traitées pendant 48h par de l'ABT-737 (b) mettent en évidence une hétérogénéité intra-tumorale de sensibilité aux BH3 mimétiques.

Les données accumulées par l'équipe vont également dans ce sens. Le laboratoire a en effet mis en place, il y a une dizaine d'années, un modèle de culture *ex vivo* de tranches de tumeurs mammaires soumises à différents traitements pendant 48h. Après fixation, ces tranches font l'objet d'une analyse IHC pour la CASPASE 3 active afin d'analyser la réponse apoptotique des cellules cancéreuses. L'analyse de la réponse apoptotique de 163 tumeurs traitées pendant 48h avec un inhibiteur de BCL-2 et BCL-xL a confirmé l'importante hétérogénéité inter-tumorale de priming apoptotique mais également une hétérogénéité intratumorale, la cohorte de tumeurs présentant en effet un continuum de sensibilité à l'inhibiteur, démontrant que ces tumeurs comportaient des cellules primées car sensibles et des cellules non répondeuses donc non primées (**Fig. 8**).

La cause de l'hétérogénéité intra-tumorale peut s'expliquer par des différences génétiques existant au sein de la tumeur : (1) une tumeur étant en effet composée de plusieurs sous clones tumoraux de manière inhérente au processus oncogénique (Yates et al., 2015) (2) des stress subis par quelques cellules peuvent avoir modifié leur épigénome et alors se répandre dans la tumeur par transmission à la descendance (Assenov et al., 2018). Il peut également s'agir de modifications phénotypiques (non génétiques) via, par exemple, la proximité de fibroblastes ayant des effets anti-apoptotiques sur les cellules cancéreuses en diminuant leur priming apoptotique (Louault et al., 2019; Marusyk et al., 2016). Enfin, plusieurs travaux ont mis en évidence une hétérogénéité subcellulaire de réponse à des stimuli pro-apoptotiques. En effet, notre équipe a démontré que tous les couples pro et anti-apoptotiques d'une même cellule n'étaient pas sensibles de façon équivalente aux BH3 mimétique selon leur localisation intracellulaire, les couples ancrés dans la MOM étant plus stables et donc difficiles à rompre (Pécot et al., 2016). De plus, Tait et Green ont mis en évidence une répartition inégale des protéines de la famille BCL2 au niveau du pool de mitochondries et ont suggéré que cette hétérogénéité était un élément expliquant la survenue de MOMP incomplète (Tait et al., 2010).

5. La mitose

L'objectif de mes recherches est de décrypter les mécanismes cytotoxiques des antimitotiques et, notamment, du paclitaxel, chef de file des taxanes. Les taxanes, comme les vinca-alcaloïdes ou les dérivés de l'épothilone, agissent en perturbant la dynamique des microtubules, éléments clés de la division cellulaire permettant notamment la répartition dans chaque cellule fille du matériel génétique dupliqué. Afin de comprendre les mécanismes anti-tumoraux de ces molécules, il est utile de connaître les ressorts moléculaires de la mitose et les conséquences d'une perturbation pharmacologique de son bon déroulement.

a. Généralités

La majorité des cellules saines d'un être humain adulte ne sont pas en cours de cycle cellulaire, celles-ci se trouvant dans un état quiescent appelé G_0 . L'entrée dans le cycle cellulaire dépend de la présence de facteurs mitogéniques permettant à la cellule de franchir le point de restriction G_1 . En aval de ce point, les cellules progressent irréversiblement à travers les différentes phases du cycle cellulaire. Cette progression est coordonnée par les cyclines dont le nom provient des variations cycliques de leur concentration par expression transitoire et rapide dégradation. Leurs rôles est d'activer spécifiquement une CDK (Cyclin Dependent Kinase) dont la concentration ne varie pas nécessairement au cours du cycle. Ainsi différents complexes Cycline-CDK seront présents à différents moments du cycle cellulaire régulant les transitions entre les phases (**Fig. 9**). Identifié en 1983 par Gerdes, l'antigène Ki67 présent dans le noyau des cellules cyclantes est couramment utilisé en recherche ou en clinique pour évaluer la prolifération d'une tumeur (Gerdes et al., 1983).

Brièvement, le cycle cellulaire comprend deux phases : l'interphase et la mitose. L'interphase, période la plus longue (15h), se décompose en une phase G_1 , une phase S et une phase G_2 . La phase G_1 est une phase de synthèse des enzymes et molécules nécessaires à la phase S, phase durant laquelle l'ADN est dupliqué. La phase G_2 est une phase de préparation à la mitose notamment en dupliquant le centrosome, centre organisateur des microtubules de la cellule (**Fig. 9**).

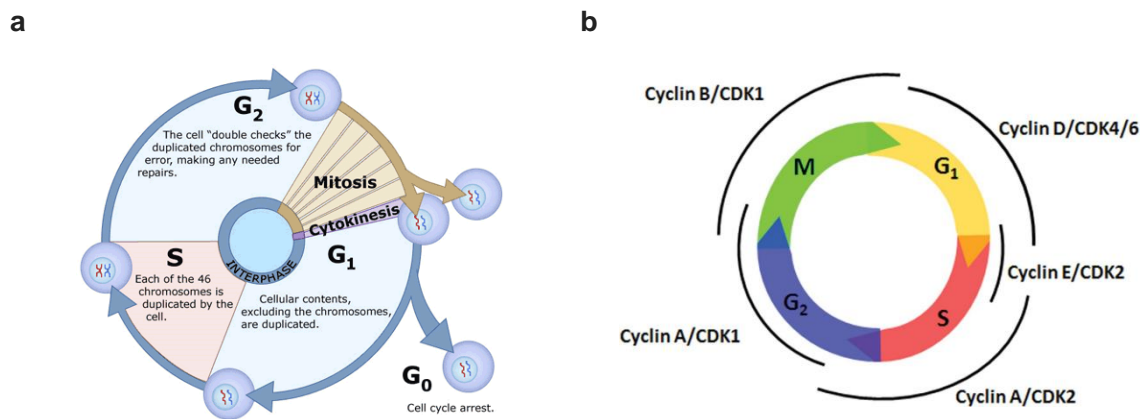


Figure 9 : les différentes étapes du cycle cellulaire (Clinical Tools, Inc).

a. Les grandes étapes du cycle cellulaire. b. Couples cycline/CDK intervenant pendant le cycle cellulaire.

La cellule 4N (ayant 46 chromosomes à deux chromatides) entre alors en mitose, processus fondamental permettant une ségrégation fidèle du matériel génétique entre les deux cellules filles. Cette phase, la plus courte du cycle cellulaire (1h), est classiquement séparée en cinq étapes (**Fig. 10**) :

- (i) La prophase, étape caractérisée par la condensation du matériel génétique en chromosomes et la migration bipolaire des deux centrosomes d'où naissent des fibres, appelées les microtubules, formées par la polymérisation de la β -tubuline.
- (ii) La prométaphase correspondant au désassemblage de l'enveloppe nucléaire et à la capture des chromosomes par les microtubules.
- (iii) La métaphase, étape contrôlée par le point de contrôle mitotique garantissant le bon alignement sur la plaque métaphasique des chromosomes et la tension adéquate générée par les microtubules sur les chromatides sœurs.
- (iv) L'anaphase, étape pendant laquelle la séparation des chromatides sœurs et leurs migrations bipolaires ont lieu. Des nouvelles membranes nucléaires se forment

alors autour des noyaux fils, les chromatides se décondensent et les microtubules se dispersent.

- (v) La cytokinèse, phase finale de la mitose lors de laquelle la cellule mère est physiquement divisée en deux cellules filles. Cette étape fait notamment intervenir la protéine Aurora Kinase B (AURKB) dont l'inhibition nous servira pour prévenir la cytokinèse et générer des cellules tétraploïdes.

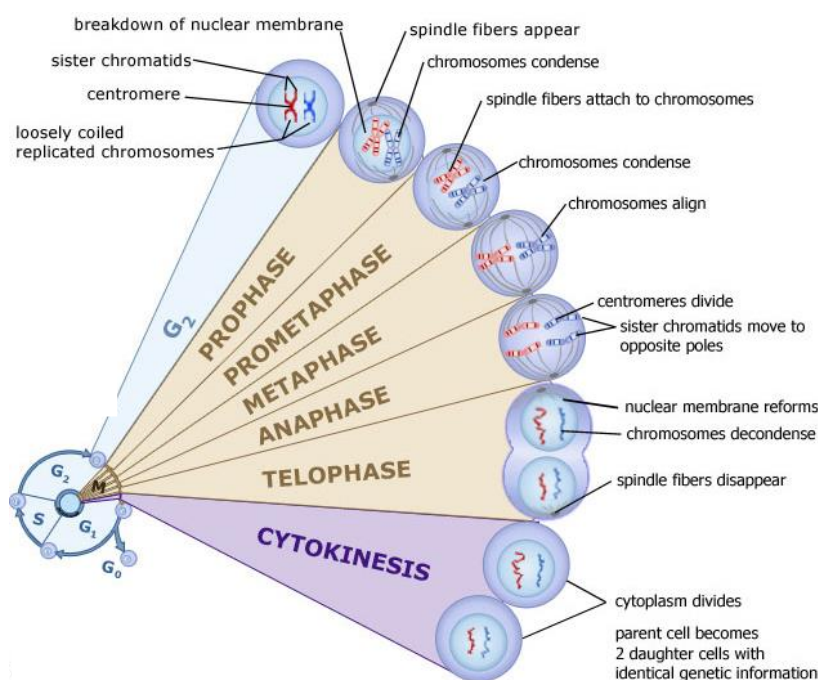


Figure 10 : les différentes étapes de la mitose (Clinical Tools, Inc).

b. Contrôle de l'initiation de l'anaphase par le point de contrôle mitotique.

Afin de garantir le bon déroulement de la division cellulaire, la cellule eucaryote est équipée de points de contrôle. En cas de mauvais déroulement, les points de contrôle interrompent la progression dans le cycle cellulaire jusqu'à régularisation de la situation. Si celle-ci est impossible, des processus de mort cellulaire seront activés. Il existe trois points de contrôle au cours du cycle des cellules eucaryotes : le point de contrôle de la phase G₁, activé en réponse à la présence de dommages à l'ADN, le point de contrôle de la phase G₂/M, senseur d'ADN endommagé ou non répliqué et le point de contrôle mitotique ou SAC (Spindle

Assembly Checkpoint) activé en réponse à l'absence ou la mauvaise liaison des kinétochores des chromosomes aux microtubules.

Ce dernier point de contrôle est d'une grande importance pour nos travaux puisqu'il est activé par les agents anticancéreux inhibant la dynamique des microtubules tels que le paclitaxel. Lors de la métaphase, l'attachement bipolaire de tous les kinétochores aux microtubules avec une tension appropriée va permettre la levée du point de contrôle mitotique et ainsi la progression de la cellule en anaphase via l'activation du complexe APC/C-CDC20 (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome-Cell Division Cycle protein 20). De par son activité E3-ligase, ce complexe active la séparase par dégradation de la sécurine qui sera, à son tour, responsable de la dégradation de la cohésine reliant jusqu'alors les deux chromatides sœurs. Une autre cible de ce complexe est la cycline B dont la dégradation entraîne la diminution de l'activité de CDK1 et, par conséquent, la sortie de mitose. Le paclitaxel, en inhibant la dépolymérisation des microtubules va empêcher la génération d'une tension adéquate sur chaque chromatide sœur lors de la métaphase. Ainsi, CDC20 demeurera séquestré par le complexe du point de contrôle mitotique constitué des protéines MAD2 (Mitotic Arrest Deficient 2), BUB3 (Budding Uninhibited by Benzimidazole 3) et BUBR1 (Budding Uninhibited by Benzimidazole-Related 1). L'absence d'activation du complexe APC/C préviendra la sortie de mitose via le maintien de la cycline B et donc de l'activité de CDK1 (**Fig. 11**).

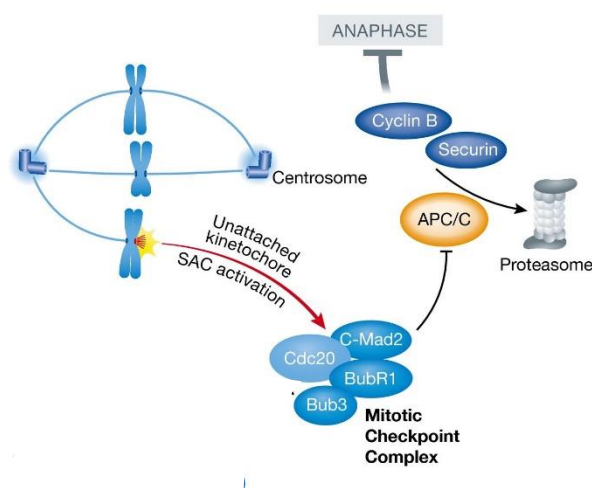


Figure 11 : le point de contrôle mitotique.

Les kinétochores non ou improprement reliés aux microtubules déclenchent l'activation du point de contrôle mitotique. Ainsi le complexe du point de contrôle mitotique formé de BUB1, BUBR1 et MAD2 séquestre CDC20, prévenant l'activation de l'APC/C, complexe nécessaire pour la dégradation de la sécurine, et donc pour la séparation des chromatides sœurs, ainsi que pour la dégradation de la cycline B permettant la sortie de mitose (Haschka et al., 2018).

Parmi les antimitotiques, deux sous-groupes de molécules se distinguent : les « mitotic blockers » et les « mitotic drivers » (Haschka et al., 2018).

Les mitotic blockers regroupent les molécules induisant un arrêt mitotique prolongé via l'activation du point de contrôle mitotique. Cette catégorie regroupe les inhibiteurs des microtubules mais également les inhibiteurs des protéines KSP (Kinesin Spindle Protein), à l'origine de la ségrégation des centrosomes, et PLK1 (Polo-Like Kinase 1) intervenant à différents stades de la mitose. Nous montrons dans ces travaux que la gédunine est également un mitotic blocker, cet inhibiteur de la protéine co-chaperonne d'HSP90 P23 (Patwardhan et al., 2013) possédant des propriétés antimitotiques mises en évidence par l'équipe, via un mécanisme pour l'heure non élucidé.

Les mitotic drivers regroupent les inhibiteurs des kinases MPS1 (MonoPolar Spindle 1) et AURKB. Ces molécules conduisent à une sortie prématurée de mitose sans cytokinèse induisant ainsi des cellules tétraploïdes.

c. Le modèle des réseaux compétitifs

Malgré l'activation du point de contrôle mitotique par le paclitaxel, le niveau de cycline B diminue lentement par dégradation. Quand la concentration en cycline B1 devient trop faible pour garantir une activité CDK1 nécessaire au maintien en mitose, une sortie de mitose sans division cellulaire se produit, phénomène connu sous le nom d'échappement à l'arrêt mitotique.

Simultanément à la lente dégradation de cycline B1, est déclenchée dans la cellule en arrêt mitotique une réponse apoptotique liée notamment à l'érosion de l'activité anti-apoptotique de MCL-1 et BCL-xL. En effet, la protéine MCL-1 est dégradée par le protéasome après ubiquitinylation par les complexes APC/C-CDC20 et/ou SCF-FBXW7 et la protéine BCL-xL est modifiée post-traductionnellement par CDK1 au niveau de la sérine 62, diminuant ainsi sa capacité à inhiber BAX (Bah et al., 2014; Barillé-Nion et al., 2012; Harley et al., 2010; Inuzuka et al., 2011). Lors d'un arrêt mitotique prolongé, d'autres types de mort cellulaire ont été décrits comme la nécroptose ou la catastrophe mitotique (Castedo et al., 2006; Frank et al., 2019).

Ainsi deux réseaux de signalisation sont déclenchés pendant l'arrêt mitotique induit par un inhibiteur des microtubules : une augmentation des signaux de mort et une diminution des niveaux de cycline B1 permettant à la cellule d'échapper à l'arrêt mitotique. Chaque réseau possédant son propre seuil, la destinée de la cellule en arrêt mitotique dépendra du seuil atteint en premier (**Fig. 12**).

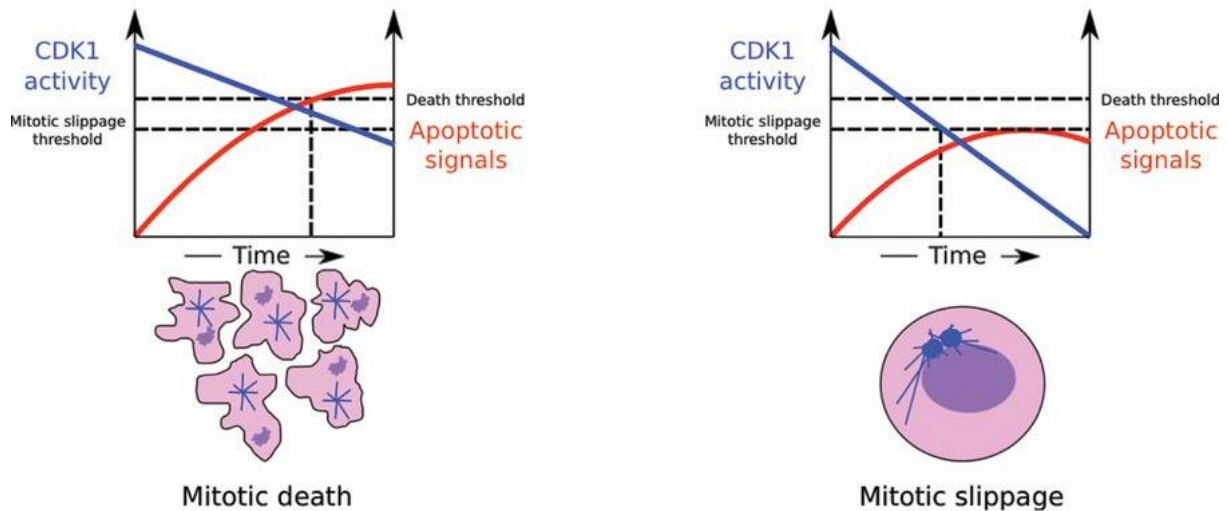


Figure 12 : le modèle des réseaux compétitifs.

Lors d'un arrêt mitotique prolongé, deux réseaux ayant leurs propres seuils vont entrer en compétition : (i) l'augmentation des signaux de mort résultant notamment de la baisse des charges anti-apoptotiques de la cellule (ii) la baisse de l'activité de CDK1 due à une lente dégradation de la cycline B1 concourant à la sortie de mitose (mitotic slippage). La destinée de la cellule en arrêt mitotique sera fonction du seuil atteint en premier (Barillé-Nion et al., 2012).

Ainsi, les travaux de Gascoigne et Taylor par vidéomicroscopie ont démontré que deux cellules cancéreuses génétiquement identiques arrêtées en mitose pouvaient avoir des destins différents : l'une déclenchant une apoptose tandis que l'autre échappait à l'arrêt mitotique. Ceci illustre l'hétérogénéité de réponse des cellules à une perturbation de la mitose sur des bases non nécessairement génétiques (Gascoigne and Taylor, 2008).

d. Les différentes destinées d'une cellule en arrêt mitotique lors d'un traitement par un antimitotique tel que le paclitaxel.

Les cellules en arrêt mitotique lors d'un traitement par un inhibiteur des microtubules tel que le paclitaxel ont donc deux destinées possibles : mourir par apoptose ou échapper à l'arrêt mitotique. L'échappement pourra se faire sans cytokinèse, conduisant alors à des cellules tétraploïdes ou avec cytokinèse anormale conduisant à des cellules aneuploïdes via la répartition inégale du matériel génétique. Les cellules aneuploïdes ou tétraploïdes auront à leur tour différentes destinées : entrer en apoptose, être bloquée en interphase ou progresser dans un nouveau cycle cellulaire (Gascoigne and Taylor, 2008, 2009) (Fig. 13).

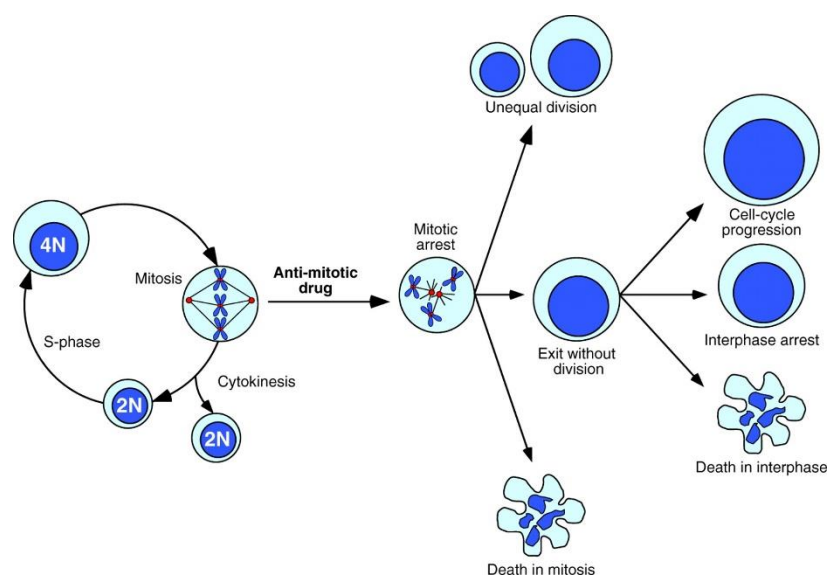


Figure 13 : les différentes destinées d'une cellule exposée à un agent antimitotique tel que le paclitaxel.

Les cellules soumises pharmacologiquement à un arrêt mitotique pourront soit déclencher une apoptose soit échapper à l'arrêt mitotique sans cytokinèse ou avec cytokinèse inégale conduisant alors à des cellules aneuploïdes. Ces cellules auront plusieurs destinées possibles : être bloquée en interphase, mourir en interphase ou progresser dans un nouveau cycle cellulaire (Gascoigne and Taylor, 2009).

Dans les cellules cancéreuses, deux mécanismes de résistance au déclenchement d'une réponse apoptotique lors d'un arrêt mitotique sont prépondérants : un point de contrôle mitotique moins robuste (par rapport aux cellules saines) et une surexpression de la protéine anti-apoptotique BCL-xL, protéine de la famille BCL-2 majeure pour la survie pendant l'arrêt

mitotique, tous deux concourant à l'échappement massif des cellules à l'arrêt mitotique et à la génération de nombreuses cellules aneuploïdes.

e. La cellule aneuploïde après échappement à l'arrêt mitotique.

L'aneuploïdie est un état cellulaire caractérisé par un nombre anormal de chromosomes, qu'ils soient entiers ou partiels. L'aneuploïdie résulte principalement de perturbations de la mitose : échappement à l'arrêt mitotique, défaut de cytokinèse ou mitose multipolaire (Nicholson and Cimini, 2011). La majorité des cancers présentant une aneuploïdie (Weaver and Cleveland, 2006), il est légitime de penser que celle-ci ait un rôle dans le processus de cancérisation. Si peu de cellules cancéreuses présentent une mutation sur les gènes codant les protéines impliquées dans le point de contrôle mitotique, ces gènes sont fréquemment dérégulés aux niveaux ARN (Acide RiboNucléique) et/ou protéique suggérant de possibles altérations épigénétiques, traductionnelles ou post-traductionnelles des membres du SAC (Johnson et al., 2015; Simonetti et al., 2019; Wang et al., 2015; Yuan et al., 2006). Toutefois, les conséquences d'une aneuploïdie sur la cellule cancéreuse restent paradoxales. L'aneuploïdie pouvant conduire à un processus oncogénique dans certains modèles (Levine et al., 2017; Michel et al., 2001) ou onco-suppresseur dans d'autres (Weaver et al., 2007; Zasadil et al., 2016). Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par les différents niveaux d'aneuploïdie générés. En effet, il a été suggéré que des faibles niveaux d'aneuploïdie favorisaient une évolution tumorale tandis que des forts niveaux d'aneuploïdie contrecarraient la progression tumorale par inhibition de la prolifération, déclenchement d'une sénescence ou d'une mort cellulaire. Les conséquences d'une aneuploïdie sont de plus dépendantes du fond cellulaire, du contexte ainsi que des chromosomes impliqués (Baker et al., 2007; Ben-David et al., 2014; Liu et al., 1997; Silk et al., 2013; Weaver et al., 2007; Zasadil et al., 2016).

Les cellules ayant échappé à l'arrêt mitotique sont caractérisées par une importante aneuploïdie. Plusieurs études ont rapporté le déclenchement d'une mort cellulaire en réponse à une mauvaise ségrégation des chromosomes induite pharmacologiquement. Ces études ont mis en évidence une stabilisation de P53 et de P73 et l'induction de leurs cibles pro-apoptotiques telles que NOXA, PUMA ou BAX (Castedo et al., 2006; Dar et al., 2008; Ohashi et al., 2015; Shah et al., 2010). Si un consensus émerge sur la nature apoptotique de la mort des cellules aneuploïdes, les signaux à l'origine des réponses P53 ou P73 demeurent mal compris.

Plusieurs stress ou dommages peuvent être à l'origine du déclenchement de l'apoptose dans la cellule aneuploïde. La cellule aneuploïde est en effet soumise à un bouleversement de son homéostasie entraînant d'importants changements du transcriptome comparables à ceux induits par des stress oxydatifs, des défauts en nutriments ou des chocs thermiques : diminution de l'expression des voies impliquées dans la croissance cellulaire, dans le métabolisme des acides nucléiques et la biogénèse des ribosomes et augmentation des voies impliquées dans l'autophagie, la dégradation lysosomale et la glycolyse (Dürrbaum et al., 2014; Sheltzer, 2013; Stingle et al., 2012). Les cellules aneuploïdes présentent également un phénotype pro-inflammatoire avec, notamment, déclenchement d'une réponse interféron (IFN) (Dürrbaum et al., 2014).

De plus, l'analyse des taux de protéines par spectrométrie de masse dans des cellules humaines aneuploïdes indique que les niveaux de protéines sont directement corrélés au nombre de copie des chromosomes les codant, impactant ainsi l'équilibre de la cellule (Halevy et al., 2016; Lockstone et al., 2007; Mao et al., 2005). S'il est présent en deux copies, le chromosome X possède néanmoins un système de régulation via son inactivation par le long ARN non codant XIST (X Inhibitory Specific Transcript), phénomène appelé lyonisation à l'origine du corpuscule de Barr (Barr and Bertram, 1949; Lyon, 1961; Penny et al., 1996). Face à l'augmentation des taux de protéines résultant des chromosomes surnuméraires, les fonctions chaperonnes de la protéine HSP90 (Heat Shock Protein 90) seront dépassées. L'accumulation cytoplasmique de protéines non conformées qui en résultera va induire la formation d'agrégats protéiques et ainsi déclencher un stress protéotoxique. (Donnelly and Storchová, 2015).

Enfin la cellule rendue aneuploïde par échappement à l'arrêt mitotique présente de nombreux micronoyaux, structures dont l'enveloppe peut se rompre spontanément.

6. Les micronoyaux

a. Généralités

Les micronoyaux sont des petites structures contenant de l'ADN (chromosome entier ou partiel) entourées d'une enveloppe nucléaire indépendante du noyau. L'ADN micronucléaire peut être répliqué, traduit et réparé de façon analogue à l'ADN présent dans le noyau principal (Kisurina-Evgenieva et al., 2016). Bien que physiologique pendant le développement embryonnaire de certaines espèces (Lemaitre et al., 1998), l'apparition de micronoyaux est principalement le résultat de dysfonctionnement pendant la mitose, et ainsi considéré comme marqueur d'aneuploïdie et d'instabilité génomique (Fenech, 2007).

Les micronoyaux peuvent être induits par deux types de facteurs : les facteurs aneugènes et clastogènes. Les facteurs aneugènes (e.g. chimiothérapies antimitotiques) induisent la formation de micronoyaux contenant des chromosomes entiers en perturbant la ségrégation du matériel génétique durant la mitose (**Fig. 14**) tandis que les facteurs clastogènes (e.g. chimiothérapies génotoxiques) induisent des micronoyaux contenant des fragments de chromosomes résultant de cassures double brin de l'ADN (Fenech, 2006; Hermine et al., 1997; Kisurina-Evgenieva et al., 2016). Dans le cas d'agents aneugènes, les chromosomes non reliés aux microtubules ou non répartis par défaut de dynamique des microtubules vont être aléatoirement distribués dans l'une des cellules filles ou ils formeront des micronoyaux. Les micronoyaux pourront alors soit être extrudés, réincorporés au noyau, dégradés ou persister (Hintzsche et al., 2017).

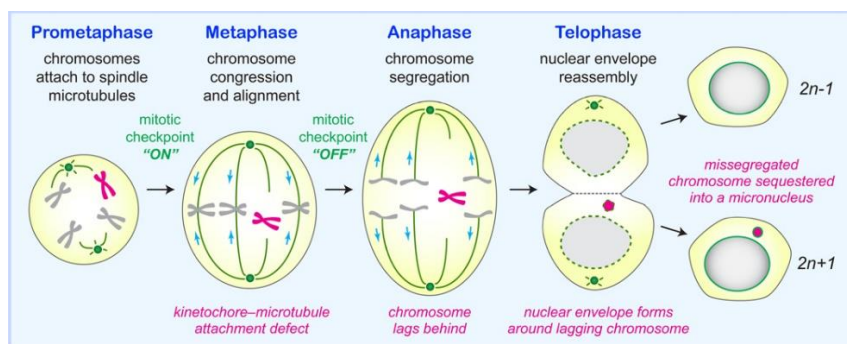


Figure 14 : génération d'un micronoyau par perturbation de la mitose.

Durant la mitose, un chromosome qui est non ou improprement relié aux microtubules n'est pas ségrégué lors de l'anaphase. Une enveloppe nucléaire se forme autour du chromosome engendrant ainsi un micronoyau (Ly and Cleveland, 2017).

b. Modèle d'étude

Il existe plusieurs techniques pour générer des cellules porteuses de micronoyaux. Beaucoup d'antimitotiques, tels que les inhibiteurs de la tubuline ou de l'AURKB, génèrent des micronoyaux après échappement à l'arrêt mitotique ou sortie prématurée de mitose respectivement. Il en est de même pour les inducteurs de dommages à l'ADN tels que les chimiothérapies génotoxiques et les radiations ionisantes (Hintzsche et al., 2017). Ces méthodes génèrent une population cellulaire très hétérogène en nombre de micronoyaux par cellule et en nature des chromosomes impliqués. Il est, de plus, difficile de discriminer les conséquences de la génération des micronoyaux des autres effets des molécules utilisées. Une autre technique, cette fois-ci mécanique, consiste à faire migrer des cellules à travers des pores de 3 μm entraînant une rupture de l'enveloppe nucléaire et la génération de micronoyaux mais également de dommages à l'ADN (Harding et al., 2017; Irianto et al., 2017). Une technique plus raffinée pour générer des micronoyaux consiste à tirer parti d'une spécificité du chromosome Y. En effet, le kinétochore se forme au niveau de la chromatine centromérique grâce à la protéine CENP-C (CENTromere Protein C) recrutée via son interaction avec les protéines CENP-A (CENTromere Protein A) et CENP-B (CENTromere Protein B). L'une ou l'autre de ces protéines est suffisante pour la formation du kinétochore et la ségrégation subséquente des chromosomes. Ces protéines peuvent se fixer sur l'ensemble des chromosomes excepté le chromosome Y qui ne possède pas les séquences nécessaires pour le recrutement de CENP-B. En générant des lignées cellulaires exprimant une protéine CENP-A mutée (CENP-A^{C-H3}) de façon inductible, il est possible d'inactiver spécifiquement le centromère du chromosome Y et par conséquent de bloquer sa ségrégation. Les auteurs ont ainsi pu former des cellules ne contenant qu'un seul micronoyau renfermant uniquement le chromosome Y (Ly et al., 2017) (**Fig. 15**).

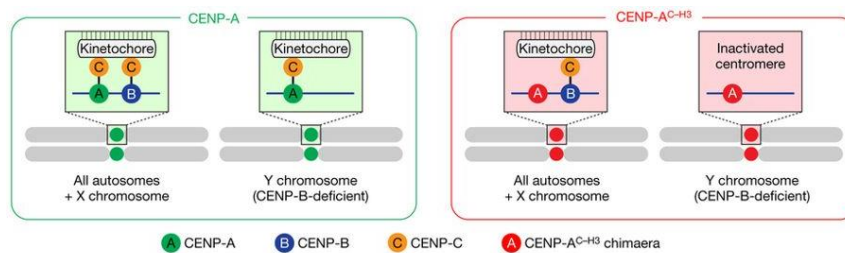


Figure 15 : génération de micronoyaux par inhibition de la formation du kinétochore sur le chromosome Y.

CENP-A et CENP-B sont recrutées au niveau des centromères des chromosomes, la présence d'une seule d'entre elles étant suffisante pour la formation des kinétochores nécessaires pour la ségrégation des chromosomes pendant la mitose. Dépourvu des séquences permettant le recrutement de CENP-B, le centromère du chromosome Y peut être spécifiquement inactivé par la mutation du CENP-A. Ainsi, le chromosome Y ne sera pas ségrégué et sera à l'origine de la formation d'un micronoyau (Ly et al., 2017).

c. Les enveloppes nucléaire et micronucléaire

L'enveloppe nucléaire se forme à la fin de l'anaphase par l'association des membranes du réticulum endoplasmique et de la chromatine. La formation d'un seul noyau dépend de l'interaction de la protéine BAF (Barrier-to-Autointegration Factor) aux chromosomes. Cette protéine compacte les chromosomes entre eux prévenant toute insertion de membrane entre deux chromosomes ce qui aurait pour conséquence la formation de cellules multinuclées. Ce processus nécessite une proximité entre les chromosomes ce qui explique la formation de micronoyau lorsqu'un chromosome entier ou partiel se trouve éloigné des autres (Samwer et al., 2017). L'enveloppe nucléaire est composée des membranes nucléaires, des complexes protéiques constituant les pores et de la lamina. La membrane nucléaire externe est en continuité avec le réticulum endoplasmique tandis que la membrane interne est tapissée du côté nucléoplasmique par une structure fibreuse : la lamina. Ces deux membranes fusionnent

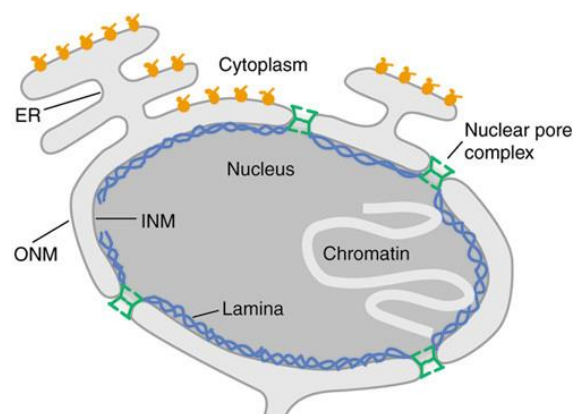


Figure 16 : structure de l'enveloppe nucléaire (Schirmer and Gerace, 2002).

à intervalle régulier pour donner naissance aux pores nucléaires (Anderson and Hetzer, 2008; Lu et al., 2011) (**Fig. 16**).

La lamina nucléaire est formée par la polymérisation de protéines appelées lamines (LMNs) (Aaronson and Blobel, 1974). Les LMNs sont codées, chez les mammifères, par 3 gènes : *LMNA*, *LMNB1* et *LMNB2*. Ces derniers, via un épissage alternatif, codent pour sept protéines : LMNA, LMNA Δ 10, LMNC, LMNC2, LMNB1, LMNB2 et LMNB3. Les LMNs possèdent des rôles structuraux, dictant la taille et la forme du noyau et sa résistance à la déformabilité, mais interviennent également dans la régulation de l'expression de certains gènes en organisant et compartimentant la chromatine (Schirmer and Gerace, 2002; Zullo et al., 2012).

L'enveloppe micronucléaire présente certaines différences de structure conduisant à des dysfonctionnements. En effet, cette enveloppe possède un faible nombre de pores par rapport à l'enveloppe nucléaire. Par conséquent, le transport des protéines du cytoplasme vers les micronoyaux est diminué altérant les capacités répliquatives et de réparation des micronoyaux. Ainsi, seuls 9 % des micronoyaux de fibroblastes humains ont la capacité de se répliquer (Terradas et al., 2009). De plus, dans certains micronoyaux, la lamina présente une discontinuité (Hatch et al., 2013) à l'origine d'une rupture spontanée de l'enveloppe micronucléaire (**Fig. 17**).

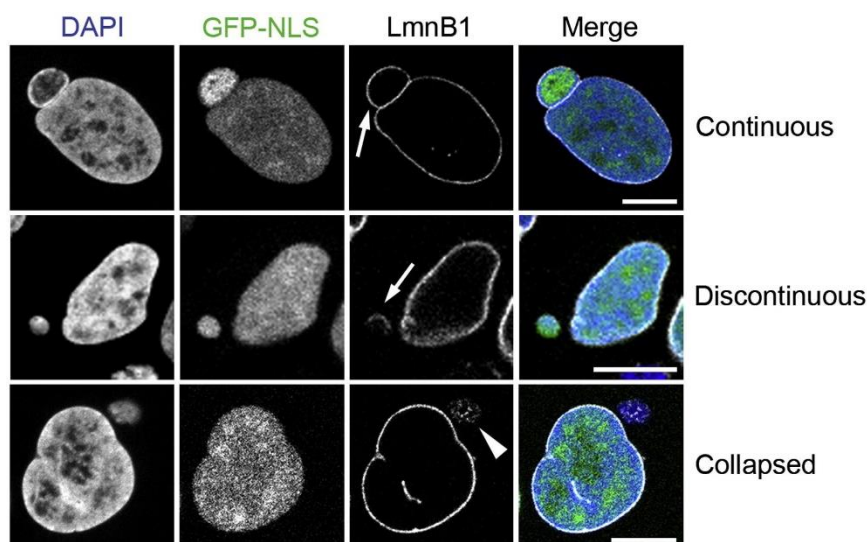


Figure 17 : un défaut d'organisation de la lamina entraîne une rupture de l'enveloppe micronucléaire.

Certains micronoyaux présentent une lamina discontinue (révélée par une discontinuité du marquage LMNB1). Hatch et al ont mis en évidence que l'enveloppe de ces micronoyaux était encline à se rompre (rupture visualisée par une absence d'accumulation de GFP couplée à une séquence d'adressage aux noyaux NLS (Nuclear Localisation Signal) dans certains micronoyaux) (Hatch et al., 2013).

Ce défaut d'organisation de la lamina est probablement le résultat d'un défaut d'accumulation de la LMNB1 à l'intérieur du micronoyau (Zhang et al., 2015) puisque plusieurs équipes ont réussi à prévenir cette rupture en surexprimant la LMNB1 et la LMNB2, dont les fonctions chevauchent celles de la LMNB1 (Bakhoun et al., 2018; Hatch et al., 2013) sans engendrer d'altérations structurales en cas de surexpression contrairement à la LMNB1.

d. Les conséquences de la rupture de l'enveloppe micronucléaire

La rupture de l'enveloppe micronucléaire va avoir deux conséquences majeures :

- la survenue de dommages au niveau de l'ADN jusqu'alors contenu, phénomène probablement à l'origine de la chromothripsis (du grec chromo pour chromosome et thripsis pour briser en éclat) (Hatch et al., 2013). La chromothripsis consiste en la pulvérisation d'un chromosome suivi du réarrangement aléatoire des fragments chromosomiques (parfois des centaines) et ce, en un seul évènement cellulaire. La chromothripsis pourrait jouer un rôle déterminant dans la cancérogénèse ce qui bouleverserait les modèles établis de développement progressif des tumeurs (Stephens et al., 2011).
- La détection de l'ADN jusqu'alors contenu par le senseur d'ADN cytosolique cGAS (cyclic GMP-AMP synthase), quelques minutes après la perte de l'enveloppe micronucléaire, déclenchant une réponse pro-inflammatoire dans la cellule (**Fig. 18**). Cette réponse, à l'origine d'un recrutement de cellule immunitaire, est un mécanisme permettant la clairance des cellules subissant une erreur de mitose (Mackenzie et al., 2017).

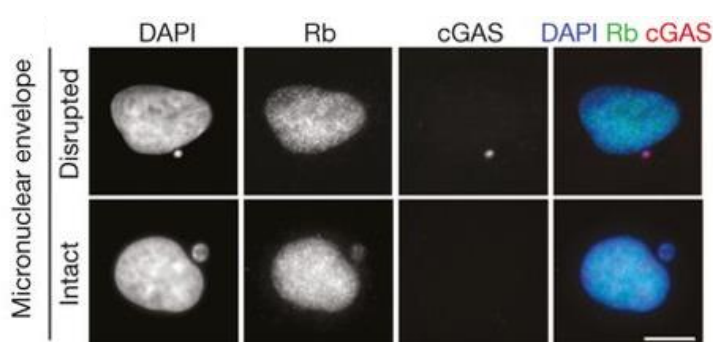


Figure 18 : le senseur de l'ADN cytosolique cGAS s'agrège au niveau des micronoyaux ayant une enveloppe rompue.

Le senseur de l'ADN cytosolique cGAS s'agrège au niveau des micronoyaux ayant une enveloppe rompue (visualisé par une absence de marquage pour la protéine nucléaire Rb) (Mackenzie et al., 2017).

De plus, cet évènement contribue à l'effet abscopal de la radiothérapie (effet anti-tumoral généré par l'irradiation via le recrutement de cellules immunitaires sur des tissus éloignés du site irradié) (Harding et al., 2017).

Nos travaux nous ont conduits à nous intéresser à l'activation de la voie cGAS/STING (STimulator of INterferon Genes) par les micronoyaux générés des suites d'une exposition aux antimétabolites, rendant une description de cette voie nécessaire.

7. La voie cGAS/STING

a. Généralités

Première défense de l'organisme, le système immunitaire inné permet la détection des motifs moléculaires partagés par des pathogènes (PAMP, Pathogene Associated Molecular Pattern) qu'ils soient intra ou extracellulaires, ainsi que la détection de signaux de danger libérés par des cellules endommagées (DAMP). Lorsque les pathogènes pénètrent et se répliquent à l'intérieur de la cellule, de multiples senseurs appartenant à la famille des récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptors) sont activés tels que les récepteurs de la famille des NLR (Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptors) qui détectent des protéines de micro-organismes (Broz and Dixit, 2016) ou les récepteurs de la famille des RLR (Retinoic acid-Inducible Gene (RIG)-I-Like Receptors) qui détectent les ARN viraux présents dans le cytosol (Yoneyama et al., 2015). cGAS, protéine sur laquelle nous allons nous attarder, est un senseur de l'ADN cytosolique.

b. Activation de cGAS

La protéine cGAS possède un domaine nucléotidyl-transférase et deux sites de fixation à l'ADN. En l'absence d'ADN, cGAS demeure dans un état d'auto-inhibition et est activé par de l'ADN double brin indépendamment de toute séquence. *In vitro*, une taille de 15 paires de base est suffisante pour qu'un fragment d'ADN soit détecté par cGAS et puisse l'activer. De

plus, plusieurs études ont mis en évidence que, pour des longueurs totales identiques, des grands fragments d'ADN activaient davantage cGAS que des petits fragments. Enfin, des travaux suggèrent que cGAS détecte la chromatine qu'elle soit condensée ou non, y compris les chromosomes lors de la perte de l'enveloppe nucléaire pendant la mitose. Cependant, cGAS se dissocie de l'ADN du noyau immédiatement à la fin de la mitose via un processus pour l'heure incompris (Harding et al., 2017). cGAS se fixe à l'ADN pour former un complexe 2 : 2, induisant un changement conformationnel au niveau de son site catalytique permettant la synthèse d'un dinucléotide cyclique GMP-AMP (cGAMP, cyclique GMP-AMP) via l'ATP (Adénosine TriPhosphate) et le GTP (Guanosine TriPhosphate). Le cGAMP fonctionne comme un second messenger se fixant à la protéine STING située au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Ishikawa and Barber, 2008; Wu et al., 2013; Zhang et al., 2013) et induisant un changement dans sa conformation. Des travaux ont mis en évidence que le cGAMP pouvait diffuser dans les cellules avoisinantes directement via des connexines ou indirectement via leur présence dans des particules virales nouvellement formées (Chen et al., 2016a; Gentili et al., 2015). Une fois activée, STING migre au niveau du Golgi où il recrutera et activera TBK1 (TANK -Binding Kinase 1) qui, à son tour, activera IRF-3 (Interferon Regulatory Factor 3) par phosphorylation (Fitzgerald et al., 2003; Ishikawa et al., 2009; Saitoh et al., 2009; Tanaka and Chen, 2012). Le facteur de transcription p-IRF-3 va alors se dimériser puis entrer dans le noyau où il induira la transcription des interférons de type I (IFN-I). STING va également activer IKK (Inhibitor of Kappa B Kinase) qui, à son tour, phosphorylera les protéines IκB (Inhibitor of Kappa B), inhibitrices du facteur de transcription NF-κB (Ishikawa and Barber, 2008). La phosphorylation de IκB va induire sa dégradation par le protéasome entraînant la libération et la phosphorylation du facteur de transcription NF-κB, constitué des sous-unités P65 et P50, qui induira alors la transcription de cytokines pro-inflammatoires telles que TNFα, IL-1 (InterLeukine 1) et IL-6 (Hornung et al., 2014) (**Fig. 19**).

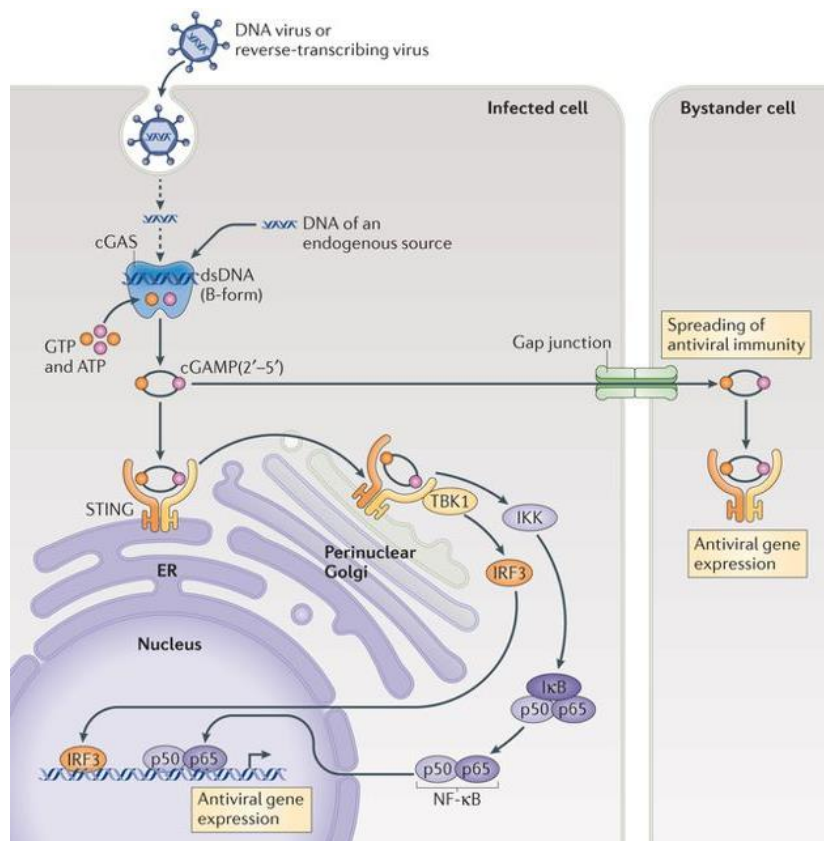


Figure 19 : la voie de signalisation cGAS/STING (Hornung et al., 2014).

c. Voies de signalisation du TNF α

Parmi les cytokines pro-inflammatoires transcrites par NF- κ B suite à l'activation de la voie cGAS/STING, nos recherches nous ont conduits à étudier le TNF α . Cette cytokine est exprimée par de nombreux types cellulaires, les cellules immunitaires étant les principaux producteurs (Vassalli, 1992). Elle est synthétisée sous forme de protéines transmembranaires trimériques pouvant être clivées par l'enzyme TACE (Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme) afin de générer des molécules solubles (Black et al., 1997) et agit via deux récepteurs TNFR1 dont l'expression est ubiquitaire et TNFR2 seulement présent sur les cellules immunitaires, endothéliales et tumorales (Faustman and Davis, 2010). Tandis que TNFR1 interagit avec les formes solubles et membranaires du TNF α , TNFR2 interagit principalement avec la forme membranaire (Grell et al., 1995). De plus, leurs domaines intracellulaires présentent des différences : TNFR1 possède un DD tandis que TNFR2 possède un site d'interaction pour les protéines TRAFs (TNF Receptor Associated Factors) (Wallach et al., 1999) ce qui aura pour conséquences des effets intracellulaires distincts selon le type de récepteurs activés.

En effet, si TNFR1 et TNFR2 peuvent tous les deux activer les voies MAPK et NF- κ B, concourant à la survie cellulaire notamment via la transcription de protéines anti-apoptotiques et à l'amplification de la réponse inflammatoire, seul TNFR1 peut déclencher une réponse apoptotique via son DD (Fig. 20). Cependant, des études ont démontré que l'activation de NF- κ B pouvait également être pro-apoptotique notamment via la transcription de protéines BH3-only telles que NOXA (Bu et al., 2016; Inta et al., 2006; Knowlton et al., 2012).

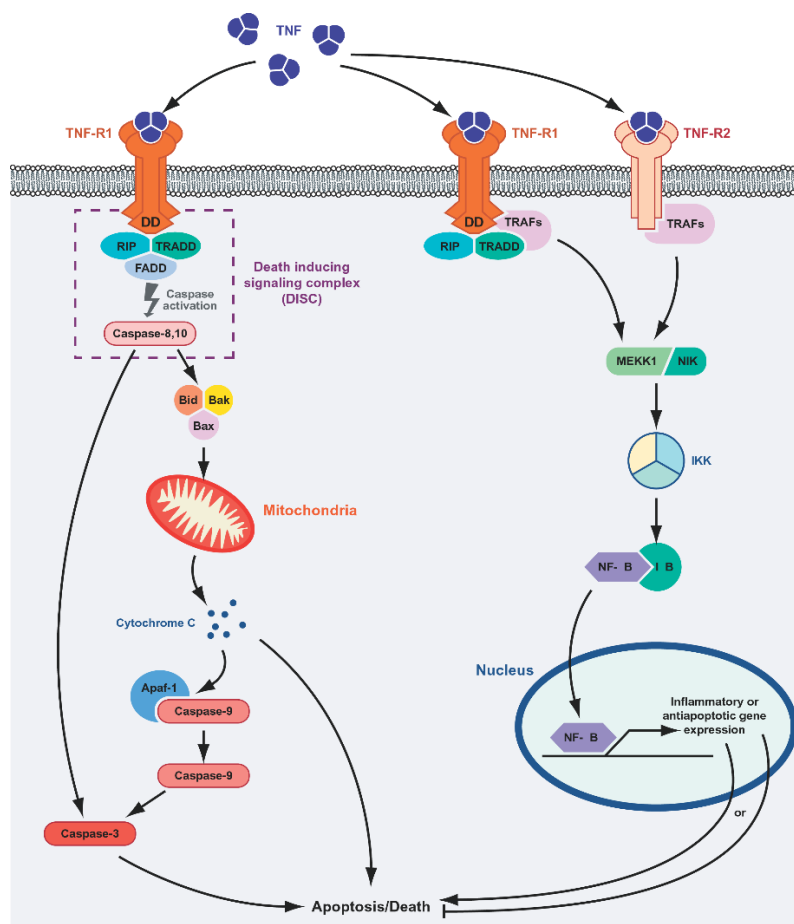


Figure 20 : voies de signalisation du TNF α (Rahman and McFadden, 2006).

d. Voie de signalisation des IFN-I

Les IFN de type I, cytokines de l'immunité innée, ont été découverts il y a plus de 50 ans pour leurs capacités à inhiber la réplication et la propagation virale (Isaacs Alick et al., 1957). Cette famille de protéines comprend les IFN α (protéines homologues codées par 13 gènes, *IFNA1* à *IFNA13*), IFN β et plusieurs autres IFN moins étudiés tels que IFN ϵ , IFN ω et IFN κ . Ils sont

produits par de multiples types cellulaires en réponse à l'activation des PRRs (Kawai and Akira, 2010) et ont un rôle majeur dans les défenses antivirales du système immunitaire.

Les IFN-I ont un récepteur homodimérique IFN α/β receptor 1 (IFNAR1) très affiné pour l'IFN β et un récepteur hétérodimérique IFNAR1-IFNAR2 pouvant fixer tous les IFN-I. La fixation des IFN-I à leur récepteur active les protéines TYK2 (Tyrosine Kinase 2) et JAK1 (Janus Kinase 1) qui induisent le recrutement et la phosphorylation de STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1). STAT1 phosphorylé va alors s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec STAT2 puis migrer au noyau. Le dimère STAT1-STAT2 va fixer IRF9 (Interferon Regulatory Factor 9) pour former le complexe ISGF3 (Interferon-Stimulated Gene Factor 3) qui ira transcrire les gènes possédant une séquence ISRE (IFN-Stimulated Response Element) tandis que l'homodimère STAT1 ira transcrire les gènes possédant une séquence GAS (Gamma-Activated Sequence), ces gènes codant la plupart du temps pour des protéines ayant des propriétés antivirales (Doyle et al., 2015) (**Fig. 21**).

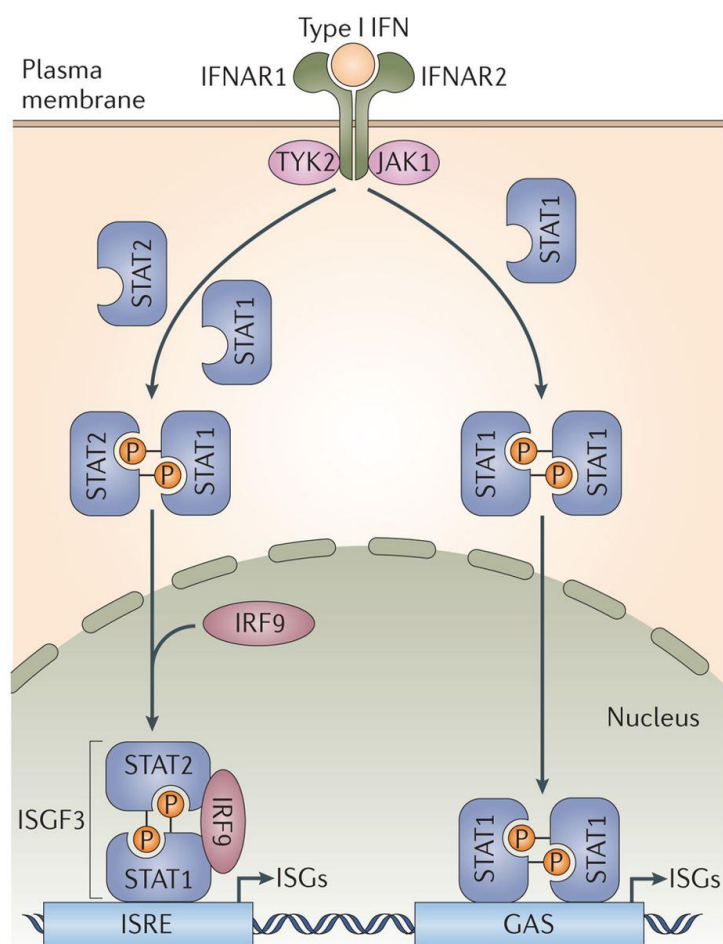


Figure 21: voies de signalisation des IFN-I (Doyle et al., 2015).

Toujours dans le but de bloquer la propagation virale, les IFN-I ont également la capacité de déclencher l'apoptose via l'expression de protéines pro-apoptiques telles que NOXA ou BIM (Dal Col et al., 2012; Eitz Ferrer et al., 2011; Fuertes Marraco et al., 2011; Knowlton et al., 2012; Moore et al., 2012; Rosebeck et al., 2011; Shi et al., 2016; Sun and Leaman, 2005; Wang et al., 2016).

e. Détection de l'ADN hôte par cGAS

cGAS peut détecter l'ADN exogène ou l'ADN hôte si celui-ci est présent dans le compartiment cytosolique. Outre l'ADN contenu dans les micronoyaux, plusieurs autres contextes cellulaires peuvent entraîner la présence d'ADN dans le cytosol et par conséquent l'activation de la voie cGAS/STING (Fig. 22) (Mann and Kranzusch, 2017).

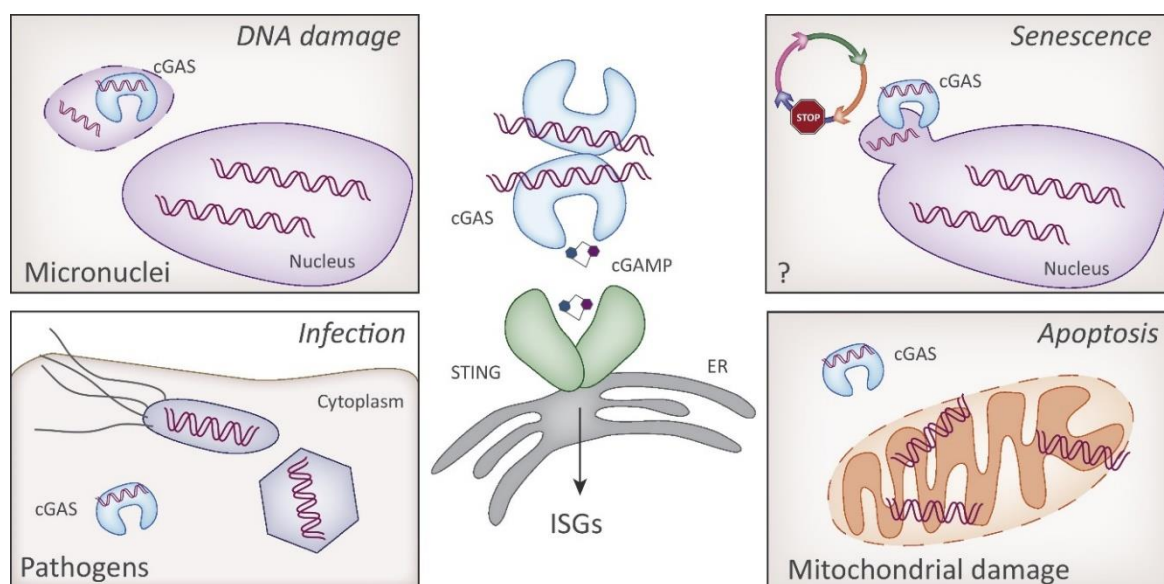


Figure 22 : les différents contextes cellulaires pouvant activer cGAS.

Plusieurs contextes cellulaires peuvent induire la présence d'ADN dans le compartiment cytosolique : (i) la rupture de l'enveloppe d'un micronoyau générée suite à une perturbation de la mitose ou à des dommages de l'ADN (ii) la présence de pathogènes (iii) la fuite d'ADN nucléaire dans les cellules sénescents du fait d'une désorganisation de l'enveloppe nucléaire (iv) la diffusion d'ADN mitochondrial lors de la MOMP ou lors de dommages mitochondriaux (Mann and Kranzusch, 2017).

➤ Fuite d'ADN nucléaire dans les cellules sénescentes et induction du SASP

La sénescence est caractérisée par un arrêt permanent du cycle cellulaire induit par divers stress (Kuilman et al., 2010). Les cellules sénescentes sécrètent une variété de facteurs inflammatoires collectivement appelés SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) via un mécanisme qui demeure mal compris. L'altération de l'enveloppe nucléaire par déficience en LMNB1 à l'origine de la fuite cytosolique de fragments de chromatine est caractéristique d'une cellule sénescente (Freund et al., 2012; Ivanov et al., 2013). Les auteurs d'une récente étude ont mis en évidence que l'enveloppe nucléaire des cellules sénescentes présentait des hernies au niveau desquelles s'agrégeait cGAS, suggérant une fuite de matériel génétique à cet endroit (**Fig. 23**). L'activation subséquente de STING entraîne alors la production du SASP et l'induction paracrine d'une sénescence (Glück et al., 2017).

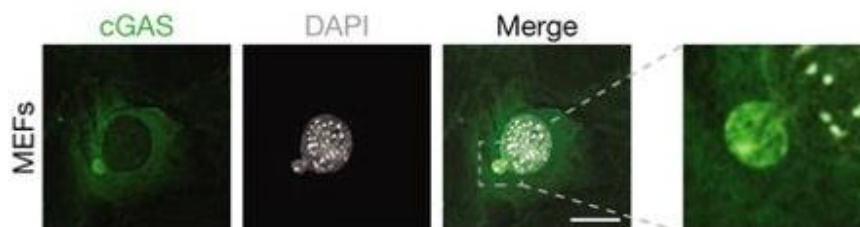


Figure 23 : hernie présente au niveau de l'enveloppe nucléaire de cellules sénescentes où s'agrège cGAS (Glück et al., 2017).

➤ Fuite cytosolique d'ADN mitochondrial

Plusieurs travaux ont mis en évidence la capacité de l'ADN mitochondrial, une fois dans le cytosol, à activer cGAS. L'ADN mitochondrial se présente sous forme de double brin cyclique de 16569 paires de base emballé par la protéine TFAM (Mitochondrial Transcription Factor A) dans des structures appelées nucléoïdes. Une étude récente a montré que la déplétion de TFAM, induite génétiquement ou lors d'une infection virale, entraînait une perte de l'organisation nucléoïdale, une fuite cytosolique de l'ADN mitochondrial et l'activation subséquente d'une réponse inflammatoire via l'activation de la voie cGAS/STING. Les auteurs ont de plus démontré que ce processus contribuait aux défenses antivirales lors d'une infection (West et al., 2015).

De plus, en réponse à des stimuli pro-apoptotiques, le déclenchement d'une MOMP peut également entraîner la fuite cytosolique d'ADN mitochondrial via les pores formés par BAX et

BAK (McArthur et al., 2018; Riley et al., 2018; Rongvaux et al., 2014; White et al., 2014). Par un mécanisme encore inconnu, les auteurs ont démontré que l'activation des CASPASEs consécutive à la MOMP, prévient l'activation de la voie cGAS/STING et ainsi le déclenchement d'une réponse pro-inflammatoire (Rongvaux et al., 2014; White et al., 2014).

Enfin, l'équipe de Richard Youle a récemment mis en évidence qu'un défaut de mitophagie entraînait une accumulation cellulaire de mitochondries altérées dont l'ADN diffuse dans le cytosol. Dans des modèles murins déficients en mitophagie, l'activation subséquente de la voie cGAS/STING induisait une inflammation, la mort des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée et l'apparition des symptômes de la maladie de Parkinson (Sliter et al., 2018).

➤ **ADN exogène phagocyté**

La DNase II (DésoxyriboNucléase II) est une endonucléase lysosomale responsable de la dégradation de l'ADN exogène phagocyté. Des souris déficientes en DNase II meurent au stade embryonnaire via l'induction d'une mort cellulaire dépendante des IFN-I (Kawane et al., 2003). Cette létalité est partiellement sauvée par une délétion des récepteurs aux IFN-I (Yoshida et al., 2005) et totalement par des délétions de STING (Ahn et al., 2012) ou cGAS (Gao et al., 2015) mettant en évidence que cGAS détecte également l'ADN phagocyté non digéré. Chez l'homme, une perte de fonction par mutation de la DNase II est associée à une inflammation des tissus et une production élevée d'anticorps (Rodero et al., 2017).

f. La voie cGAS/STING dans les cancers

➤ **Le versant anti-tumoral de la voie cGAS/STING**

L'activation de cGAS entraîne le recrutement et l'activation de cellules immunitaires permettant d'éliminer les cellules à l'origine de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, cette voie relie toutes mitoses aberrantes générant des micronoyaux au système immunitaire inné, permettant d'éliminer les cellules aneuploïdes dangereuses car douées d'un potentiel oncogénique (Mackenzie et al., 2017).

L'ADN télomérique extrachromosomal (ECTR, Extrachromosomal telomere repeat) s'accumule dans le cytosol des cellules cancéreuses dans lesquelles les télomères sont allongés via un mécanisme de recombinaison homologue appelé prolongation alternative

des télomères (ALT, alternative lengthening of telomeres) (Henson et al., 2009; Kim et al., 1994). Des travaux ont démontré que cette accumulation d'ADN cytosolique activait la voie cGAS/STING déclenchant la sécrétion d'IFN-I à l'origine d'une diminution de la croissance tumorale. Ces travaux ont par ailleurs mis en évidence que les tumeurs ALT (utilisant la RH pour allonger les télomères, 10 à 15 % des tumeurs) présentaient une voie cGAS/STING défectueuse leur permettant d'outrepasser les effets antiprolifératifs dus aux ECTR (Chen et al., 2017).

De plus, cette voie peut contribuer aux effets anti-tumoraux de certaines thérapies comme dans le cas de la radiothérapie. En effet, la formation de micronoyaux détectés par cGAS dans les cellules ciblées par les rayons contribue à l'effet abscopal de la radiothérapie. La libération de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN-I aura pour conséquence le recrutement et l'activation de cellules immunitaires sur la lésion irradiée ainsi que sur les lésions avoisinantes (Harding et al., 2017). La voie cGAS/STING pouvant être à l'origine du SASP des cellules sénescentes, elle permettra de propager la sénescence de façon paracrine et de recruter le système immunitaire qui éliminera ces cellules sénescentes (Glück et al., 2017; Yang et al., 2017) contribuant ainsi aux effets anti-tumoraux des chimiothérapies et radiothérapies. Kitai et al. ont de plus démontré que le traitement de cellules cancéreuses mammaires avec l'inhibiteur de la topoisomérase I topotécan (une chimiothérapie entraînant des cassures double brin de l'ADN) augmentait leur production d'exosomes contenant de l'ADN. Cet ADN exosomal pouvait ainsi stimuler des cellules dendritiques avoisinantes via l'activation de leur voie cGAS/STING, participant ainsi à l'effet anti-tumoral de la chimiothérapie (Kitai et al., 2017). Enfin, des travaux ont montré que l'ADN sous forme de nucléosome pendant la mitose n'empêchait en rien l'agrégation de cGAS sur les chromosomes une fois l'enveloppe nucléaire disparue mais prévenait son activation. Un arrêt mitotique prolongé induit par le paclitaxel entraînait toutefois l'activation de la voie cGAS/STING via un mécanisme inconnu, cette activation contribuant au déclenchement d'une mort mitotique (Zierhut and Funabiki, 2017).

L'ensemble de ces données indique que l'activation de la voie cGAS/STING peut être anti-tumorale via le déclenchement de la sénescence et la stimulation de la surveillance immunitaire. Ainsi, favorisant le développement tumoral, la perte de la voie cGAS/STING a été observée dans des cellules de cancers colorectaux, de mélanomes et donc dans certaines cellules cancéreuses n'exprimant pas de télomérase, les rendant de plus très sensibles à

l'action de virus oncolytique (Chen et al., 2017; Xia et al., 2016a, 2016b). Les mutations de STING et cGAS étant rares dans les cancers, les mécanismes épigénétiques ou post-transcriptionnels permettant la diminution de l'expression de ces deux protéines, restent à élucider (Chen et al., 2016b).

➤ **Le versant pro-tumoral de la voie cGAS/STING**

Une inflammation chronique représente un terrain privilégié pour la cancérogénèse. Il n'est pas étonnant qu'une activation chronique de la voie cGAS/STING puisse induire un processus oncogénique (Ahn et al., 2014; Lemos et al., 2016).

Des travaux ont démontré que la voie cGAS/STING induisait des métastases cérébrales d'une façon cellulaire autonome et non cellulaire autonome. En effet, l'activation de STING dans les astrocytes favorise le développement de métastases cérébrales de cancers du sein et du poumon. De façon surprenante, cGAMP est produit par les cellules cancéreuses et diffuse dans les astrocytes via des gap junctions entre les deux types cellulaires. La production subséquente d'IFN-I et de TNF α par les astrocytes permet, dans ces travaux, de favoriser la prolifération des cellules cancéreuses et leur résistance à la chimiothérapie (Chen et al., 2016a).

La voie cGAS/STING peut également favoriser la dissémination métastatique de façon cellulaire autonome. De récents travaux ont en effet corrélé l'instabilité chromosomique avec la survenue de métastases cérébrales via l'activation de la voie cGAS/STING et l'induction subséquente d'un set de gènes impliqués dans l'EMT (Bakhoum et al., 2018).

En conclusion, ces études démontrent que la voie cGAS/STING peut être anti ou pro-tumorale selon le type et le contexte cellulaire. De plus, il est évident que les activations aiguë ou chronique de cette voie ont des conséquences différentes. En effet, une activation aiguë de cGAS est probablement anti-tumorale via la sécrétion d'IFN-I, l'induction d'une sénescence et la stimulation d'une surveillance immunitaire. En revanche, des cellules soumises à une stimulation chronique de la voie cGAS/STING ou une exposition prolongée aux cytokines en résultant peuvent s'adapter pour en tirer parti et ainsi favoriser un développement tumoral, la résistance à la sénescence ou aux thérapies anti-tumorales (**Fig. 24**) (Bakhoum and Cantley, 2018).

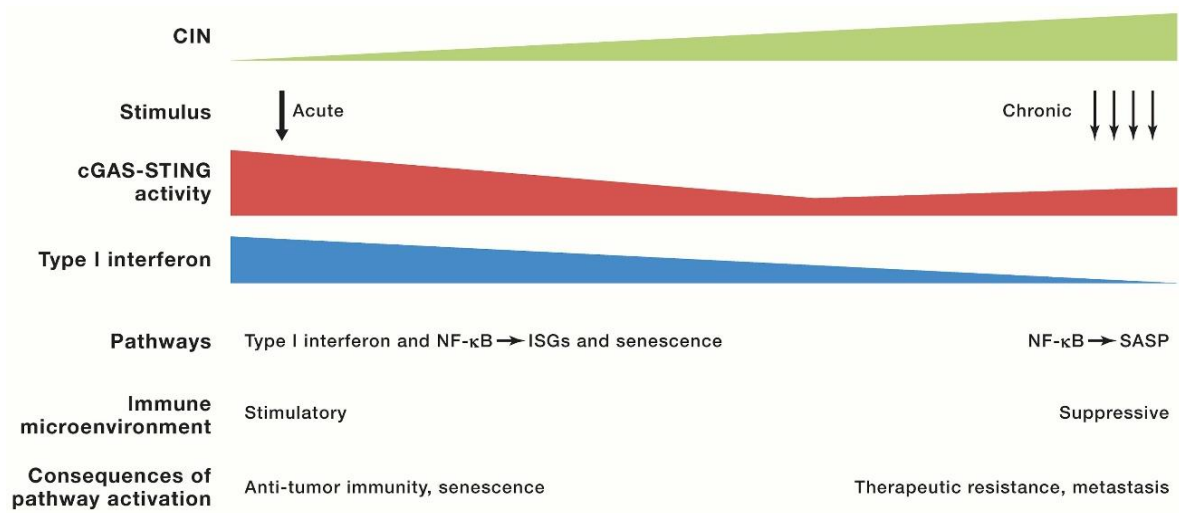


Figure 24 : selon le caractère aiguë ou chronique des stimuli, la voie cGAS/STING pourrait être anti ou pro-tumorale.

Certains cancers instables chromosomiquement activent de façon chronique la voie cGAS/STING. Il est probable que les cellules cancéreuses s'adaptent à cette imprégnation cytokinique pour en tirer parti, rendant ainsi la voie cGAS/STING pro-tumorale (Bakhoun and Cantley, 2018).

III. Justification du sujet

Cibler la mitose est une stratégie anticancéreuse utilisée depuis des décennies. De nombreux agents antimittotiques, perturbant le déroulement de la mitose, ont en effet fait preuve de leur efficacité, et ce, dans les cancers ayant des pronostics les plus défavorables. Les antimittotiques les plus utilisés sont les taxanes, ayant pour chef de file le paclitaxel, inhibiteurs de la β -tubuline perturbant ainsi la dynamique des microtubules nécessaire à la ségrégation des chromosomes dans chaque cellule fille. En raison d'effets indésirables importants engendrés par ces composés (neuropathies), de nouveaux antimittotiques ont été développés, inhibant généralement une kinase impliquée dans le processus mitotique.

Le mécanisme anti-tumoral des antimittotiques classiquement proposé est l'induction d'une apoptose dans la sous population de cellules cancéreuses proliférantes bloquées en prométaphase. En effet, favoriser l'échappement *in vitro* permet à court terme de prévenir le déclenchement d'une réponse apoptotique au prix d'une forte aneuploïdie. Cependant, plusieurs études ont démontré que la robustesse du point de contrôle mitotique n'était pas corrélée à la sensibilité des cellules aux agents antimittotiques suggérant que l'échappement à l'arrêt mitotique contribuait également aux effets de ces chimiothérapies à plus long terme (Rieder and Maiato, 2004; Ryan et al., 2012; Weaver and Cleveland, 2005; Yamada and Gorbsky, 2006).

De plus, plusieurs observations réalisées *in vivo* ont remis en cause le dogme de l'arrêt mitotique comme seule explication aux effets anti-tumoraux de ces chimiothérapies. Premièrement, aucune augmentation du nombre de cellules en mitose n'est visible *in vivo* quelques heures après l'administration d'un antimittotique et ce, malgré des effets anti-tumoraux importants. En revanche, les antimittotiques vont engendrer *in vivo* la formation de cellules multinuclées ayant des durées de vie plus longues qu'en condition *in vitro* (Orth et al., 2011; Zasadil et al., 2014). Au vu de ces observations, on peut se demander quels sont les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de l'effet anti-tumoral des antimittotiques. Ainsi, promouvoir la mort durant l'arrêt mitotique n'est peut-être pas la meilleure stratégie pour traiter le cancer.

Enfin, comment expliquer le déclenchement d'une forte cytotoxicité après traitement par des antimétopiques dans des tumeurs ne possédant que peu de cellules cyclantes (Komlodi-Pasztor et al., 2011, 2012; Mitchison, 2012). Plusieurs études ont mis en évidence des effets cytotoxiques indirects du paclitaxel via la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (Alexandre et al., 2007) ou la production de TNF α (Lanni et al., 1997; Qi et al., 2018; Sprowl et al., 2012). Notre travail s'est axé sur l'hypothèse que les effets anti-tumoraux du paclitaxel sont le résultat d'effets indirects liés à la perturbation des mitoses de quelques cellules en cycle à l'intérieur de la tumeur propageant ainsi des signaux pro-apoptotiques à l'ensemble de la population de cellules cancéreuses. Une mort lente des cellules subissant un stress mitotique pourrait-elle entraîner un effet anti-tumoral plus important ?

Les chimiothérapies antimétopiques sont souvent à l'origine d'une élimination incomplète des cellules cancéreuses responsable de la persistance d'une maladie résiduelle conduisant à terme à une récurrence tumorale (Balko et al., 2014). Une compréhension des mécanismes à l'origine des effets anti-tumoraux des antimétopiques est un préalable indispensable pour comprendre les ressorts biologiques de cet effet partiel et ainsi optimiser ces traitements par des combinaisons d'agents anticancéreux pertinentes via des protocoles d'administration optimaux. C'est dans cette optique qu'ont été réalisés mes travaux de thèse présentés dans ce manuscrit.

IV. Résultats

1. Les cellules aneuploïdes générées par le paclitaxel ont une survie dépendante de BCL-xL suite à l'induction de NOXA.

a. Le paclitaxel génère des cellules aneuploïdes par échappement à l'arrêt mitotique.

Afin de comprendre les mécanismes cytotoxiques des antimitotiques, nous avons choisi d'utiliser, sur des lignées cellulaires cancéreuses mammaires (dont les principales caractéristiques sont présentées en **Table 1**), plusieurs molécules de cette classe possédant des mécanismes d'action différents. Le paclitaxel, inhibiteur de la dynamique des microtubules, largement utilisé en clinique comme agent anticancéreux depuis des décennies ; l'AZD1152 (Barasertib), inhibiteur de l'AURKB, actuellement en essai clinique dans le traitement des cancers solides ; la gédunine, inhibiteur de la protéine P23, co-chaperone d'HSP90, dont nous avons découvert au laboratoire la propriété de bloquer les cellules en phase G2/M du cycle cellulaire. A l'aide d'un immuno-marquage anti-MPM2 (Mitotic Protein Monoclonal #2) (**Fig. 25a**), correspondant à des phospho-antigènes générés par CDK1 donc détectables pendant la mitose, nous avons caractérisé la propension de ces trois molécules à induire un arrêt mitotique. Contrairement à l'AZD1152, le paclitaxel et la gédunine entraînent une accumulation importante de cellules en mitose après 24h de traitement (**Fig. 25b**). Nous avons ensuite évalué la robustesse de l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel ou la gédunine et leurs capacités à déclencher une réponse apoptotique en suivant sur 45h des cellules traitées par vidéomicroscopie (**Fig. 25c**). Pour identifier l'entrée et la sortie de mitose, nous avons tiré parti des changements morphologiques des cellules lors de cette phase. Ces changements morphologiques correspondent à un arrondissement transitoire des cellules, celles-ci ne ré-adhérent au support qu'après la cytokinèse (**Fig. 25d**). De plus, afin d'identifier précocement le déclenchement d'une réponse apoptotique des cellules en arrêt mitotique, une sonde fluorescente substrat de la CASPASE 3, le NucView™, fut ajoutée dans le milieu de culture. La prolifération soutenue des cellules cancéreuses sans déclenchement d'une

apoptose spontanée dans la condition contrôle atteste des bonnes conditions expérimentales. Dans les conditions traitées, nous avons constaté l'induction d'un arrêt mitotique important, toutes les cellules exposées au paclitaxel ou à la gédunine étant en mitose à 15h. Cependant, tandis qu'aucune sortie de mitose n'eut lieu dans la condition gédunine, nous avons constaté la sortie de mitose précoce, parfois en quelques heures, des cellules jusqu'alors bloquées par le paclitaxel et ce, sans cytokinèse. Pour ces deux traitements antimitotiques, nous n'avons constaté qu'une très faible réponse apoptotique des cellules en arrêt mitotique. Cette sortie de mitose sans division appelée échappement à l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel fut confirmée par marquages anti-MPM2 (**Fig. 25e**). Une analyse du contenu en ADN des cellules traitées 24h par du paclitaxel, de la gédunine ou de l'AZD1152 a été réalisée de manière cinétique (**Fig. 25f**). Après 24h, les trois traitements induisent une accumulation massive de cellules avec un matériel génétique dupliqué (4n). Après retrait de la drogue, les cellules traitées par la gédunine reprennent un profil identique à la condition contrôle au bout de 7 jours. En revanche, les profils des conditions paclitaxel et AZD1152 deviennent très altérés présentant un continuum de quantité de matériel génétique dans la population cellulaire reflétant une importante aneuploïdie (les lignées cellulaires cancéreuses utilisées ici étant non diploïdes, le terme aneuploïde utilisé ci-après correspondra à un changement de quantité de matériel génétique résultant de la perturbation pharmacologique des mitoses). Ces résultats attestent des impacts différents qu'ont ces trois antimitotiques sur la mitose et le devenir de la cellule. Tandis que le paclitaxel et la gédunine induisent un arrêt mitotique, la robustesse de cet arrêt présente une différence. La majorité des cellules bloquées en mitose par le paclitaxel a la capacité d'y échapper sans se diviser, ceci étant à l'origine d'une forte aneuploïdie. La gédunine induit un arrêt mitotique sans échappement, le retrait de la drogue permettant aux cellules bloquées en mitose de poursuivre la fin de la division cellulaire avec une cytokinèse normale. L'AZD1152, n'entraînant pas d'arrêt mitotique mais prévenant la cytokinèse, engendre une aneuploïdie comparable à celle générée par le paclitaxel.

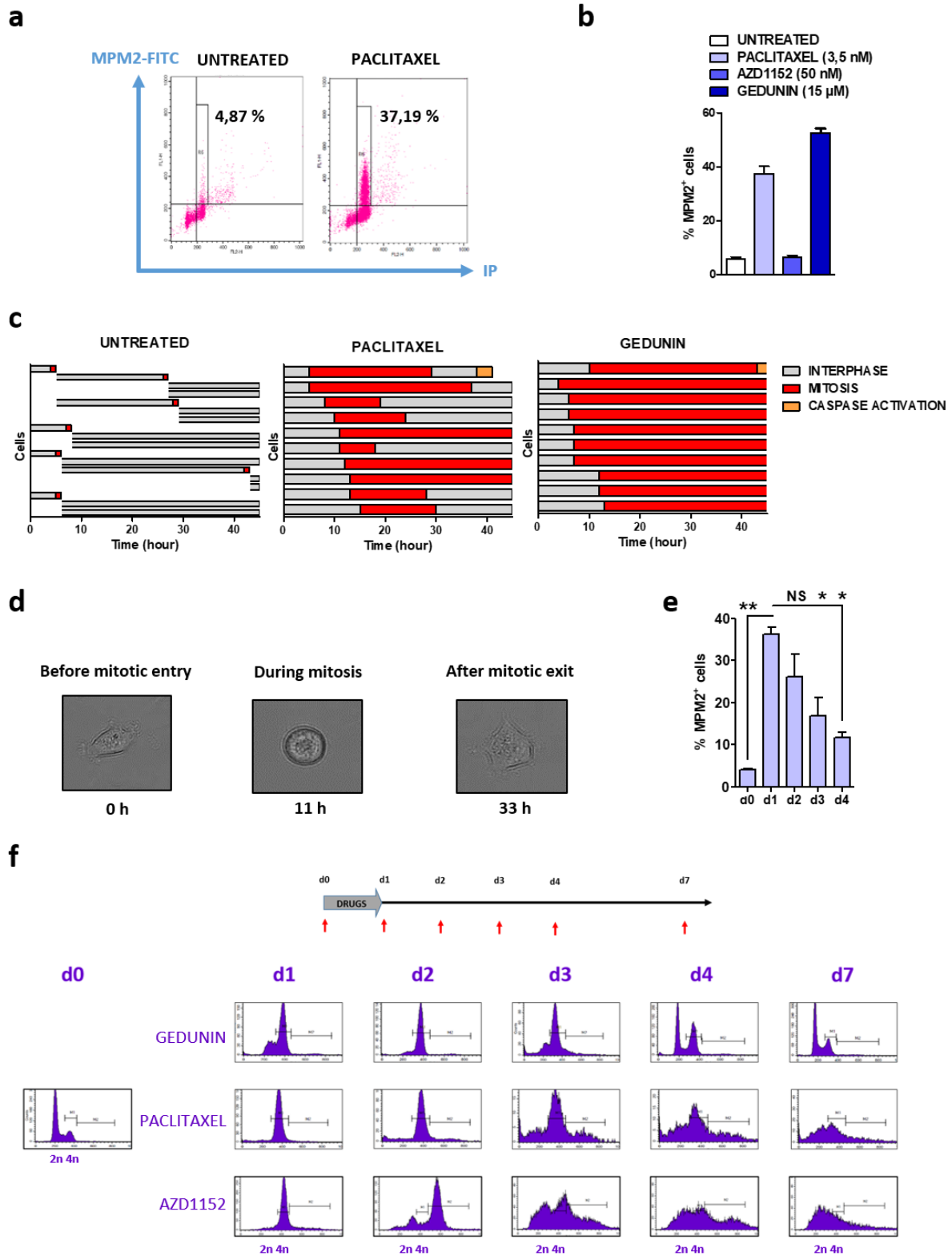


Figure 25 : le paclitaxel génère des cellules aneuploïdes par échappement à l'arrêt mitotique.

a. Dot plot représentatif d'une expérience. **b.** Analyse par immuno-marquage anti-MPM2 dans la lignée MDA-MB-468 du pourcentage de cellules en mitose après 24h des traitements indiqués. **c, d.** Vidéomicroscopie sur 45h de cellules MDA-MB-468 traitées comme indiqué (c). L'entrée et la sortie de mitose ont été analysées sur la base de changements morphologiques des cellules (d) et l'activation des caspases par la sonde fluorescente substrat de la caspase-3 NucView (Barre d'échelle : 20 μm). **e.** Evaluation du pourcentage de cellules en mitose lors d'un traitement par du paclitaxel dans la lignée MDA-MB-468. **f.** Analyse de la quantité de matériel génétique par marquage à l'iodure de propidium de cellules MDA-MB-468 traitées comme indiqué. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05 et **0.01. NS : non significatif.

b. Les cellules aneuploïdes sont dépendantes de BCL-xL.

Nous avons par la suite étudié les réponses apoptotiques des cellules cancéreuses exposées à ces agents antimétaboliques. Nous avons eu recours à une technique d'édition du génome par CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas9 afin de générer de nombreuses lignées cellulaires invalidées pour les gènes (Knock Out, KO) codant pour une ou deux protéines impliquées dans l'apoptose afin d'évaluer sur le plan fonctionnel leurs implications. Ainsi, tandis que les MDA-MB-231 Ctl présentent 40 % de cellules en apoptose 48h après 24h de traitement par du paclitaxel (analyse par marquage à l'Annexine-V), les cellules MDA-MB-231 BAX^{-/-} BAK^{-/-} présentent une réponse apoptotique à hauteur de 15 % indiquant que les cellules traitées par du paclitaxel subissent une mort dépendante de la MOMP. Ensuite, afin d'identifier le rôle des protéines anti-apoptotiques bloquant la MOMP nous avons utilisé deux lignées cellulaires KO pour des gènes codant des protéines anti-apoptotiques : MCL-1 et BCL-xL. Aucune différence de niveau de mort cellulaire n'est mise en évidence dans les cellules MDA-MB-231 MCL-1^{-/-} par rapport aux cellules Ctl tandis que le taux de mort avoisine les 90 % dans des cellules BCL-xL^{-/-} (**Fig. 26a et 26b**). Ces résultats démontrent que le frein au déclenchement de l'apoptose induite par la paclitaxel est BCL-xL, les cellules devenant dépendantes de cette protéine pour leur survie. Pour savoir si cette dépendance était générée pendant l'arrêt mitotique ou après échappement, nous avons réalisé des traitements de 24h par le BH3 mimétique WEHI-539, un inhibiteur spécifique de BCL-xL, de façon différée après une exposition de 24h à l'un des trois antimétaboliques étudiés (**Fig. 26c**). Premièrement, la gédunine, qui induit un arrêt mitotique sans échappement (et donc sans aneuploïdie), n'entraîne une mort ainsi qu'une sensibilité au WEHI-539 qu'à d1 et d2, correspondant à la période de blocage en mitose des cellules. L'AZD1152, molécule n'induisant pas d'arrêt mitotique mais une aneuploïdie par inhibition de la cytokinèse, entraîne une mort et une sensibilité au WEHI-539 croissante à mesure que le traitement par BH3 mimétique est réalisé tardivement. Enfin, le paclitaxel, qui induit un arrêt mitotique suivi d'un échappement générant une forte aneuploïdie, entraîne une mort et une sensibilité au WEHI-539 importante, se maintenant dans le temps au-delà de la période de blocage en mitose. La corrélation entre la mort cellulaire et la dépendance à BCL-xL suggère que le priming apoptotique est un état nécessaire pour la survenue de la MOMP puis de l'apoptose.

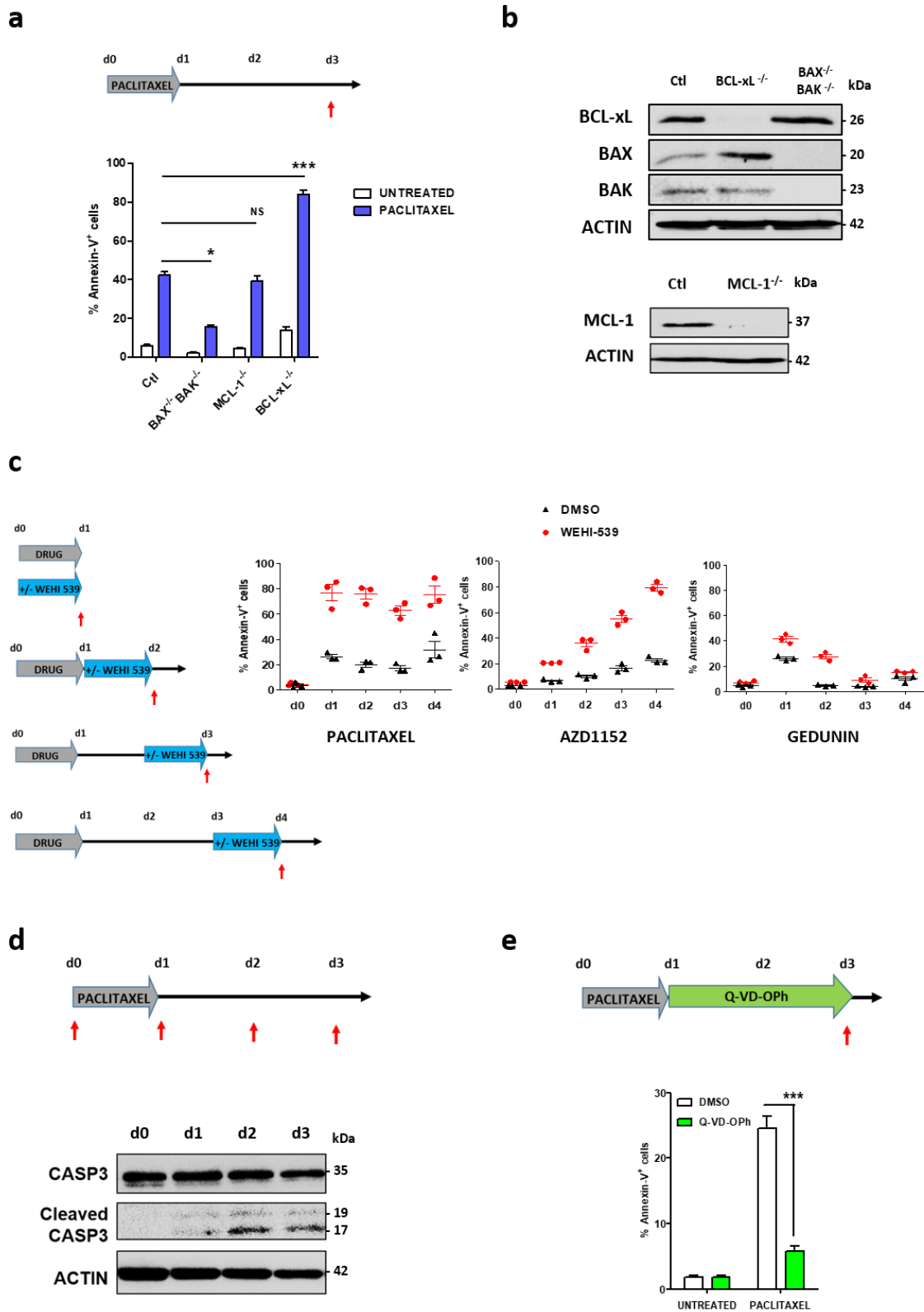


Figure 26 : les cellules aneuploïdes sont dépendantes de BCL-xL.

a. Analyse de la mort par marquage à l'Annexine-V de cellules MDA-MB-231 Ctl, BAX^{-/-} BAK^{-/-}, MCL-1^{-/-} et BCL-xL^{-/-} 48h après un traitement de 24h par du paclitaxel. **b.** Validation par immunoblot des lignées cellulaires générées par la technique CRISPR-Cas9. **c.** Analyse de la mort de cellules MDA-MB-468 traitées 24h par du paclitaxel, de l'AZD1152 ou de la gédunine puis traitées ou non par du WEHI-539 pendant 24h comme indiqué sur le schéma de gauche. **d.** Analyse par immunoblot de cellules MDA-MB-468 traitées par du paclitaxel. **e.** Analyse de la mort de cellules MDA-MB-468 traitées 24h par du paclitaxel puis traitées ou non par du Q-VD-OPh. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05 et ***0.001. NS : non significatif.

La présence de CASPASE-3 clivée, détectable 48h après un traitement de 24h de paclitaxel, associée au blocage de la mort cellulaire par le Q-VD-OPh, un inhibiteur pan-CASPASE, indiquent que la mort des cellules induite par cet agent antimitotique est dépendante de l'activation des CASPASEs (**Fig. 26d et 26e**). Ces données indiquent que les cellules en arrêt mitotique et aussi les cellules aneuploïdes sont dépendantes de la protéine anti-apoptotique BCL-xL pour leur survie.

c. La dépendance à BCL-xL est liée à l'augmentation de l'expression de NOXA dans les cellules aneuploïdes.

La cytotoxicité des antimitotiques dépendant de la MOMP, nous avons analysé l'induction des protéines BH3-only, protéines à l'origine de l'activation des effecteurs BAX et BAK et/ou de l'inhibition des protéines anti-apoptotiques. L'analyse protéique de BH3-only a révélé l'induction de l'expression de NOXA 48h après un traitement de 24h par du paclitaxel ou par de l'AZD1152 (**Fig. 27a**). L'analyse par qPCR du gène *PMAIP1* codant pour NOXA renseigne sur la nature transcriptionnelle de l'induction de l'expression de NOXA et ce, dans toutes les lignées cellulaires testées (**Fig. 27b**). Nous avons par la suite évalué l'importance de NOXA dans la mort cellulaire induite par le paclitaxel en utilisant des lignées KO pour l'un des gènes codant une des protéines BH3-only BID, BIM ou NOXA. Dans les deux lignées cellulaires testées, NOXA est le seul BH3-only dont l'absence entraîne une diminution de la mort induite par le paclitaxel. De plus, la perte de NOXA diminue considérablement la dépendance à BCL-xL des cellules traitées par le paclitaxel 72 h auparavant, temps correspondant à des cellules aneuploïdes (**Fig. 27c et 27d**). Nous avons également observé l'implication de NOXA dans la dépendance à BCL-xL des cellules aneuploïdes par traitement des lignées cellulaires MDA-MB-468 Ctl, BCL-xL^{-/-} et NOXA^{-/-} à l'AZD1152. La réponse apoptotique importante des cellules BCL-xL^{-/-} au traitement et la diminution de la sensibilité au WEHI-539 des cellules NOXA^{-/-} indique que les cellules aneuploïdes ont une survie dépendante de BCL-xL due à l'induction de NOXA (**Fig. 27e**). NOXA inhibant les fonctions anti-apoptotiques de MCL-1, nous avons voulu savoir si la perte de MCL-1, phénocopiant l'induction de NOXA en terme d'activité anti-apoptotique, entrainerait également une dépendance à BCL-xL (**Fig. 27f et 27g**).

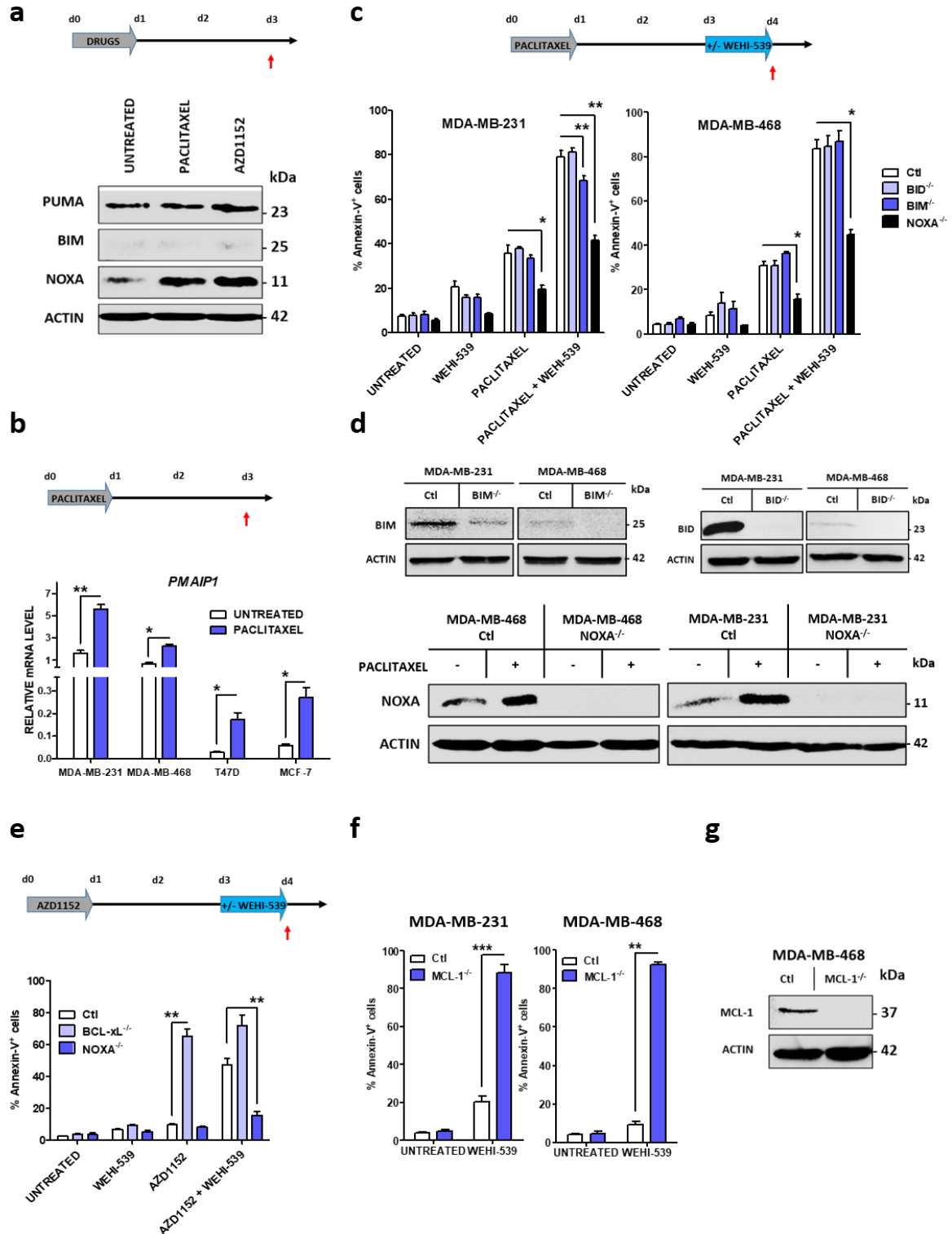


Figure 27 : la dépendance à BCL-xL des cellules aneuploïdes est liée à l'augmentation de l'expression de NOXA.

a. Analyse par immunoblot de cellules MDA-MB-468 48h après un traitement de 24h par du paclitaxel ou de l'AZD1152. b. Analyse par qPCR de lignées cellulaires 48h après un traitement de 24h par du paclitaxel. c. Analyse de la mort de cellules Ctl, BID^{-/-}, BIM^{-/-} et NOXA^{-/-} traitées ou non par du WEHI-539 48h après un traitement de 24h par du paclitaxel. d. Validation par immunoblot des lignées cellulaires générées par la technique CRISPR-Cas9. e. Analyse de la mort de cellules MDA-MB-468 Ctl, BCL-xL^{-/-} et NOXA^{-/-} traitées ou non par du WEHI-539 48h après un traitement de 24h par de l'AZD1152. f. Analyse de la mort de cellules Ctl et MCL-1^{-/-} traitées ou non par du WEHI-539 pendant 24h. g. Validation par immunoblot d'une lignée cellulaire générée par la technique CRISPR-Cas9. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05, **0.01 et ***0.001.

La mort de toutes les cellules MCL-1^{-/-} à un traitement de 24h par du WEHI-539 confirme que les cellules utilisées dans nos travaux possèdent, en conditions basales, deux freins au déclenchement de l'apoptose mitochondriale, MCL-1 et BCL-xL. L'induction de NOXA dans les cellules aneuploïdes altérant les fonctions anti-apoptotiques de MCL-1, les cellules deviennent dépendantes de BCL-xL pour leur survie.

d. L'augmentation de l'expression de NOXA dans les cellules aneuploïdes est prévenue par la surexpression de LMNB2.

Nous avons ensuite étudié les mécanismes à l'origine de l'induction de NOXA dans les cellules aneuploïdes. Une cellule aneuploïde est caractérisée par un nombre important de micronoyaux ayant une enveloppe nucléaire fragile pouvant se rompre spontanément en raison d'une déficience en LMNB1 (Hatch et al., 2013). Cette rupture, qui précède la survenue de cassure double de l'ADN jusqu'alors contenu dans le micronoyau, pourrait être l'évènement à l'origine de l'induction de NOXA. Pour tester cette hypothèse nous avons généré une lignée cellulaire MDA-MB-468 surexprimant une protéine de fusion LMNB2-mCherry (appelée cellules LMNB2) et confirmé son expression au niveau des enveloppes micronucléaires (**Fig. 33a**). Nous avons par la suite évalué l'induction de NOXA dans des cellules aneuploïdes Ctl ou LMNB2 générées par traitement au paclitaxel. Aucune induction de NOXA ne fut détectée, au niveau protéique ou transcriptionnel, dans les cellules LMNB2 (**Fig. 28a**). De plus, nous avons évalué la réponse apoptotique des cellules aneuploïdes Ctl et LMNB2 et leurs sensibilités au WEHI-539 à différents temps après le traitement antimitotique (**Fig. 28b**). Les deux lignées cellulaires présentent une sensibilité identique au paclitaxel mais aussi au co-traitement paclitaxel et WEHI-539 à d1, temps correspondant à l'induction maximale de l'arrêt mitotique. En revanche, à mesure que l'on s'éloigne de la période d'exposition au paclitaxel et que par conséquent soient générées des cellules aneuploïdes, la réponse apoptotique au paclitaxel ainsi que la dépendance à BCL-xL diminuent significativement dans les cellules LMNB2. Nous avons confirmé ce résultat dans des cellules aneuploïdes générées par un traitement par l'AZD1152. Les cellules LMNB2 présentent en effet une réponse apoptotique réduite et une dépendance moindre à BCL-xL que les cellules Ctl (**Fig. 28c**). Ces données arguent pour une induction de NOXA résultant de la rupture des micronoyaux générés suite à la perturbation pharmacologique des mitoses.

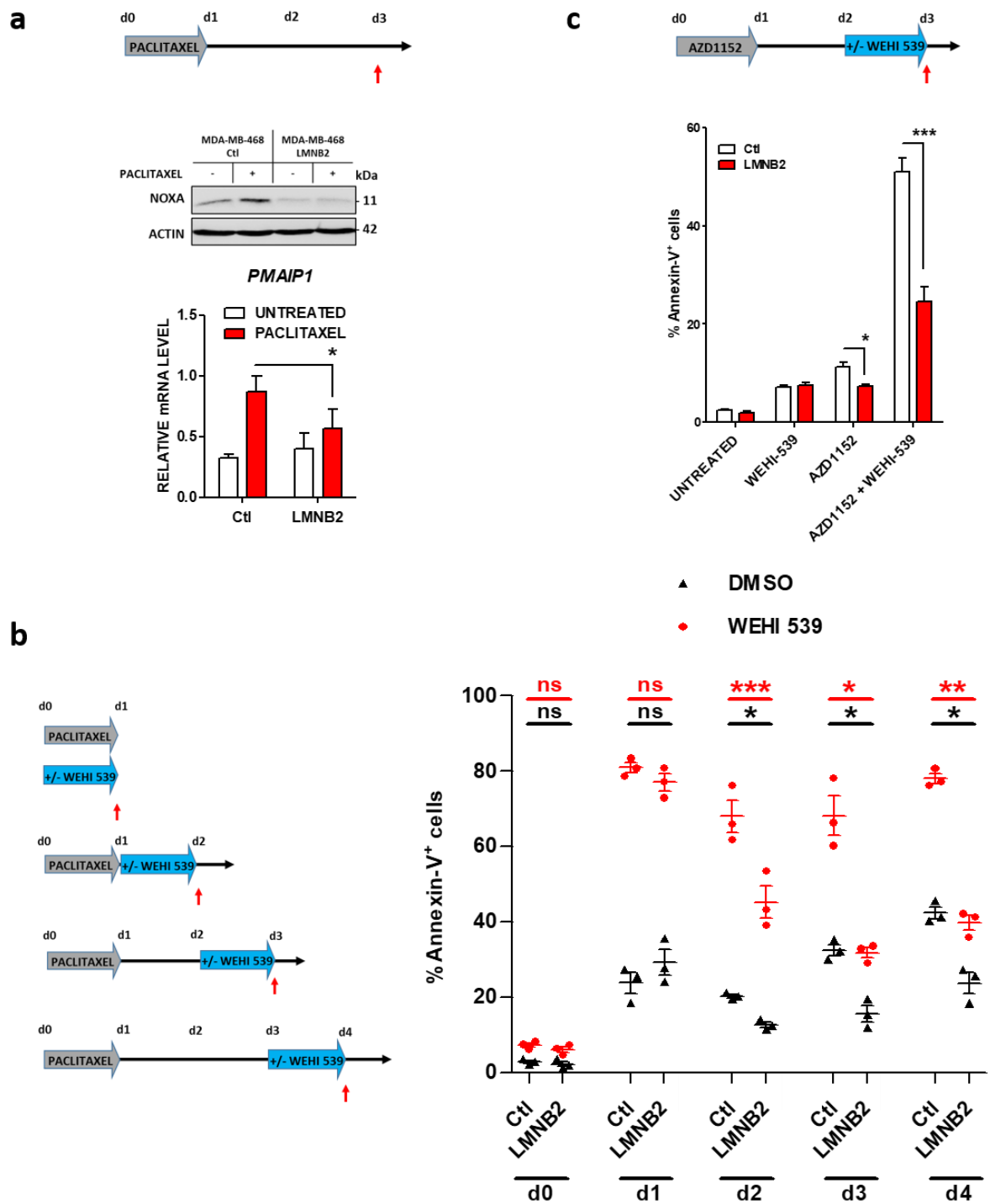


Figure 28 : l'augmentation de l'expression de NOXA dans les cellules aneuploïdes est prévenue par la surexpression de LMNB2.

a. Analyse par immunoblot et par qPCR de cellules MDA-MB-468 Ctl et LMNB2 48h après 24h de paclitaxel. **b.** Analyse de la mort de cellules MDA-MB-468 Ctl et LMNB2 traitées 24h par du paclitaxel puis traitées par du WEHI-539 pendant 24h comme indiqué sur le schéma de gauche. **c.** Analyse de la mort de cellules MDA-MB-468 Ctl et LMNB2 traitées ou non par du WEHI-539 24h après un traitement de 24h par de l'AZD1152. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05, **0.01 et ***0.001. NS : non significatif.

L'ensemble des résultats de cette première partie indique que la majorité des cellules utilisées dans nos travaux échappe à l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel. La survie des cellules à l'arrêt mitotique par échappement se fait cependant au prix d'une importante aneuploïdie. Ces cellules aneuploïdes sont caractérisées par la présence de nombreux micronoyaux dont la déficience en LMNB1 entraîne la rupture spontanée de leur membrane. Il semble que l'induction de l'expression de NOXA détectée dans les cellules aneuploïdes soit la conséquence de la rupture des enveloppes micronucléaires. NOXA, en contrecarrant les fonctions anti-apoptotiques de MCL-1, rend les cellules aneuploïdes dépendantes de BCL-xL. Ces cellules, devenues sensibles à des BH3 mimétiques ciblant BCL-xL, sont dites primées pour l'apoptose.

2. Les cellules cancéreuses subissant un stress mitotique par le paclitaxel augmentent de manière paracrine le priming apoptotique des cellules avoisinantes.

a. Le paclitaxel déclenche l'apoptose de cellules cancéreuses primées pour l'apoptose indépendamment de leur état prolifératif.

Dans la suite de nos travaux, nous nous sommes intéressés à la réponse au paclitaxel dans un contexte de tumeur entière. Que se passe-t-il dans des tumeurs solides souvent peu proliférantes et présentant une hétérogénéité intra-tumorale de priming apoptotique (Koslodi-Pasztor et al., 2011; Márquez-Jurado et al., 2018; Montero et al., 2015) ? Pour cela, nous avons utilisé le modèle de culture organotypique d'explants de tumeurs mammaires mis en place par notre laboratoire (Séveno et al., 2012; Véquaud et al., 2015). Ces tumeurs mammaires, issues de patientes prises en charge à l'ICO (Institut de Cancérologie de l'Ouest), sont acheminées au laboratoire quelques heures après leur résection chirurgicale. Ces tumeurs sont ensuite coupées en tranches de 250 μm et mises en culture 48h avec ou sans traitement dans un milieu de culture optimisé. Les tranches sont ensuite fixées et font l'objet

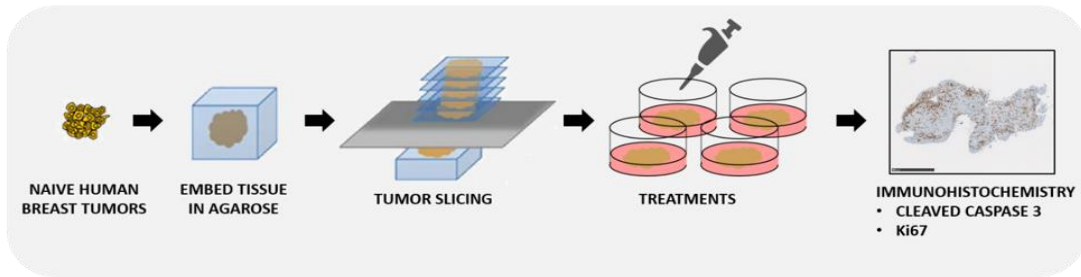
d'une analyse immunohistochimique pour les marqueurs de réponse apoptotique : la CASPASE-3 active et le PARP clivé et pour le marqueur de prolifération Ki-67 (**Fig. 29a**). A noter qu'une tranche est également fixée juste après la coupe de la tumeur pour évaluer une éventuelle apoptose liée à la mise en culture *ex vivo*. Seuls sont conservés les échantillons ayant une apoptose spontanée liée aux conditions de culture inférieure à 15 %. Les résultats présentés ci-après représentent les réponses apoptotiques spécifiques des traitements obtenues par soustraction du score apoptotique de la condition non traitée.

Nous avons vu dans la première partie de notre travail le lien étroit entre l'apoptose mitochondriale et la sensibilité au paclitaxel. Nous avons donc tout d'abord comparé les sensibilités *ex vivo* au paclitaxel et à l'ABT-737, BH3 mimétique ciblant BCL-2 et BCL-xL, utilisé ici comme un outil pour révéler la présence de cellules cancéreuses primées pour l'apoptose dans les tumeurs. 163 tumeurs du sein, dont les caractéristiques sont présentées ici (**Fig. 29b**), ont reçu ces deux traitements séparément *ex vivo*. Considérant un seuil situé à un index apoptotique de 25 %, seuls 14 % des tumeurs ont présenté une sensibilité aigüe au paclitaxel après 48h de traitement contre 42 % pour l'ABT-737. Il est intéressant de voir le continuum d'index apoptotique reflétant l'hétérogénéité inter et intra-tumorale de réponse à ces deux traitements. Un résultat important pour la suite de nos travaux fut l'observation que toutes les tumeurs sensibles au paclitaxel étaient également sensibles à l'ABT-737, et donc qualifiées de primées pour l'apoptose. Cependant, 28 % des tumeurs primées n'ont pas présenté de sensibilité au paclitaxel indiquant que le priming apoptotique est nécessaire mais insuffisant pour déclencher une réponse apoptotique aigüe au paclitaxel (**Fig. 29c**).

Etant donné le mécanisme d'action du paclitaxel, nous avons par la suite évalué si, parmi les tumeurs primées, les sensibles au paclitaxel étaient les plus proliférantes (**Fig. 29d**). De façon surprenante, aucune différence de prolifération ne fut constatée entre les tumeurs sensibles et résistantes au paclitaxel (seuil à 25 % d'index apoptotique). De même, aucune corrélation entre prolifération et la réponse apoptotique au paclitaxel ne fut mise en évidence : des tumeurs peu proliférantes pouvant déclencher une réponse apoptotique massive au paclitaxel et inversement.

L'ensemble de ces données suggère que le paclitaxel dans un contexte de tumeur entière, induit l'apoptose des cellules cancéreuses primées pour l'apoptose indépendamment de leur état prolifératif.

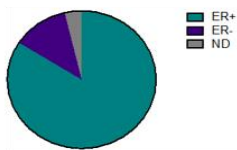
a



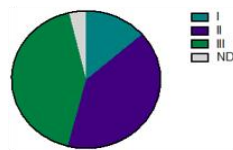
b

N = 163
Tumor size: 23,5 (10-80)mm

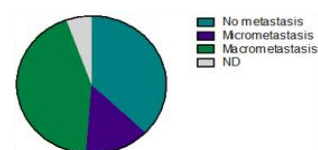
ER IHC $\geq 10\%$



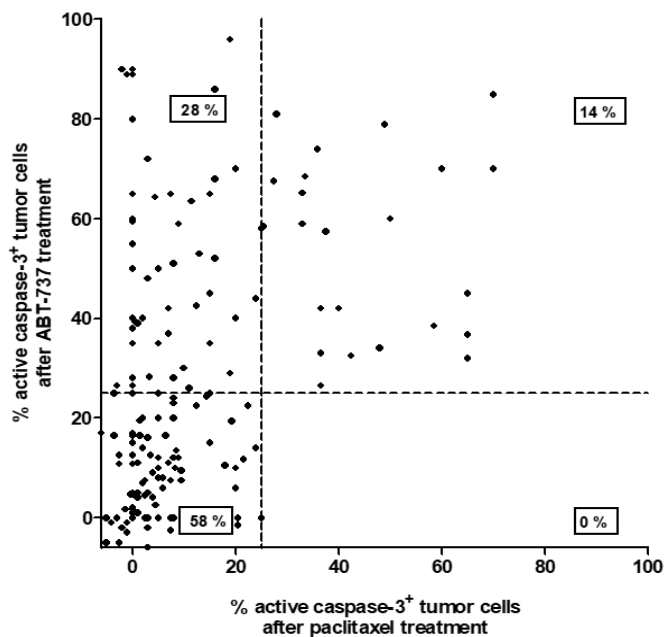
Histological grade



Lymph node metastasis



c



d

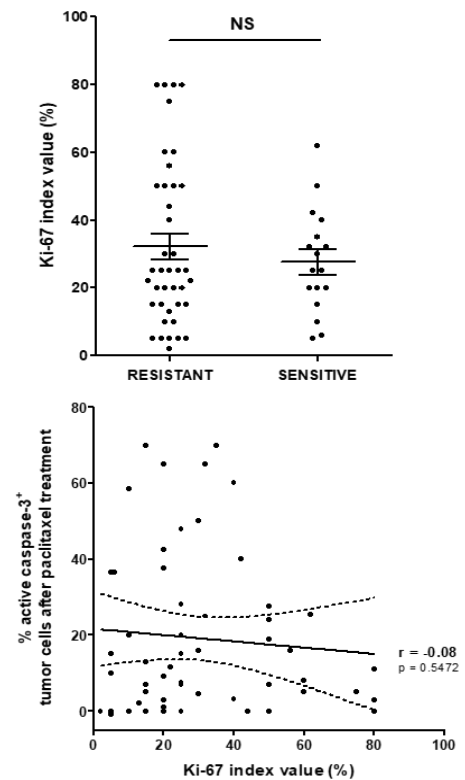


Figure 29 : la paclitaxel déclenche l'apoptose de cellules tumorales primées pour l'apoptose indépendamment de leur état prolifératif.

a. Protocole du modèle d'étude de culture organotypique d'explants de tumeurs mammaires. **b.** Taille tumorale moyenne, expression du récepteur aux œstrogènes (évaluée par IHC), grade tumorale et dissémination ganglionnaire de la cohorte de tumeurs figurant en **c.** **c.** Sensibilité *ex vivo* à l'ABT-737 et au paclitaxel de 163 tumeurs mammaires. **d.** Index Ki-67 de 55 tumeurs sensibles à l'ABT-737 (tumeurs issues de la cohorte figurant en **c**) en fonction de leur sensibilité/résistance au paclitaxel (seuil à 25 %) (panel supérieur) ou de l'index apoptotique après traitement par du paclitaxel (panel inférieur). Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; *t*-test bilatéral non pairé (**d.** panel supérieur) et test de Pearson (**d.** panel inférieur). NS : non significatif.

b. Les cellules prétraitées par le paclitaxel sécrètent des facteurs solubles entraînant une augmentation paracrine du priming apoptotique.

Ces résultats nous ont amené à émettre l'hypothèse que le déclenchement de l'apoptose des cellules primées présentes dans la tumeur était dû à un effet indirect du paclitaxel suite à la génération d'un stress mitotique dans les cellules proliférantes. Nous nous sommes par conséquent demandé si les cellules dont la mitose était impactée par le paclitaxel pouvaient sécréter des facteurs solubles augmentant le priming apoptotique de façon paracrine et, ainsi, induire l'apoptose des cellules avoisinantes les plus primées.

Pour tester cette hypothèse nous avons conditionné pendant 48h des milieux de culture par des cellules traitées par du paclitaxel pendant 24h (cellules donneuses). Ces milieux conditionnés étaient ensuite appliqués sur des nouvelles cellules pendant les 48h suivantes (cellules receveuses). Nous avons traité les cellules receveuses du milieu conditionné par un BH3 mimétique afin de mettre en évidence une éventuelle augmentation du priming. Ayant démontré le rôle clé de BCL-xL lors d'un traitement par paclitaxel, principal frein au déclenchement de l'apoptose mitochondriale dans les lignées cellulaires utilisées dans nos travaux, nous avons utilisé le WEHI-539, inhibiteur spécifique de BCL-xL.

Dans les conditions expérimentales utilisées, aucune des lignées cellulaires utilisées ne présente de sensibilité au WEHI-539 en condition basale (**Fig. 30a**). Cependant, le milieu conditionné par des cellules exposées au paclitaxel permet de sensibiliser 35 % de cellules MDA-MB-468 et 45 % de cellules MDA-MB-231 à l'effet du WEHI-539, le milieu conditionné seul n'ayant que peu d'effet. Afin d'évaluer la durée de cet effet paracrine, nous avons conditionné un deuxième milieu (CM #2) immédiatement après le premier (CM #1), nous rendant ainsi compte du caractère prolongé du phénotype sécrétoire des cellules donneuses. La diminution de l'effet du CM #2 dans la lignée MDA-MB-231 est probablement due à la mort importante des cellules donneuses, plus sensibles au paclitaxel que les cellules MDA-MB-468, et donc à un conditionnement moindre du milieu. Nous avons ensuite voulu savoir si le phénotype sécrétoire des cellules donneuses dépendait bien de la génération d'un stress mitotique par le paclitaxel. Pour cela nous avons utilisé la lignée cellulaire T47D, car seule lignée utilisée dans nos travaux à ne plus proliférer lors d'une privation en sérum (0 % FBS). Nous nous sommes assurés que le paclitaxel n'avait pas d'effet sur les cellules non cyclantes en terme de cycle cellulaire (**Fig. 30b panel supérieur**) ou d'apoptose (**Fig. 30b panel**

inférieur). L'absence complète d'effet du milieu conditionné par des cellules non cyclantes exposées au paclitaxel démontre que le phénotype sécrétoire est lié à la perturbation de la mitose dans les cellules donneuses (**Fig. 30c**). Nous avons également évalué le rôle de la prolifération cellulaire dans les cellules receveuses en utilisant des conditions expérimentales similaires. Le caractère non cyclant des cellules receveuses n'a pas diminué l'effet du milieu conditionné, les taux plus importants de mort en privation de sérum étant dus à un état de priming basal plus élevé (**Fig. 30d**). Enfin, l'absence d'effet du milieu conditionné sur le cycle cellulaire des cellules receveuses permet d'exclure tout effet résiduel du paclitaxel (**Fig. 30e**).

Nos données démontrent qu'un stress mitotique déclenché par le paclitaxel induit un phénotype sécrétoire dans les cellules proliférantes responsable d'une augmentation du priming de manière paracrine des cellules avoisinantes, qu'elles soient proliférantes ou non.

3. Les tumeurs mammaires traitées par du paclitaxel acquièrent un phénotype pro-inflammatoire dépendant de la voie cGAS/STING.

Afin d'identifier le profil du sécrétome produit par les cellules traitées par du paclitaxel, nous avons choisi d'utiliser les modèles *in vivo* les plus pertinents possibles. Nous avons donc établi 3 modèles de PDX de cancer du sein humain orthotopique sur souris immunodéprimées NSG (NOD SCID Gamma). L'intérêt des modèles de PDX réside dans le maintien des caractéristiques histologiques, cellulaires et moléculaires de la tumeur d'origine permettant ainsi, après amplification, de pouvoir travailler sur du matériel biologique très pertinent.

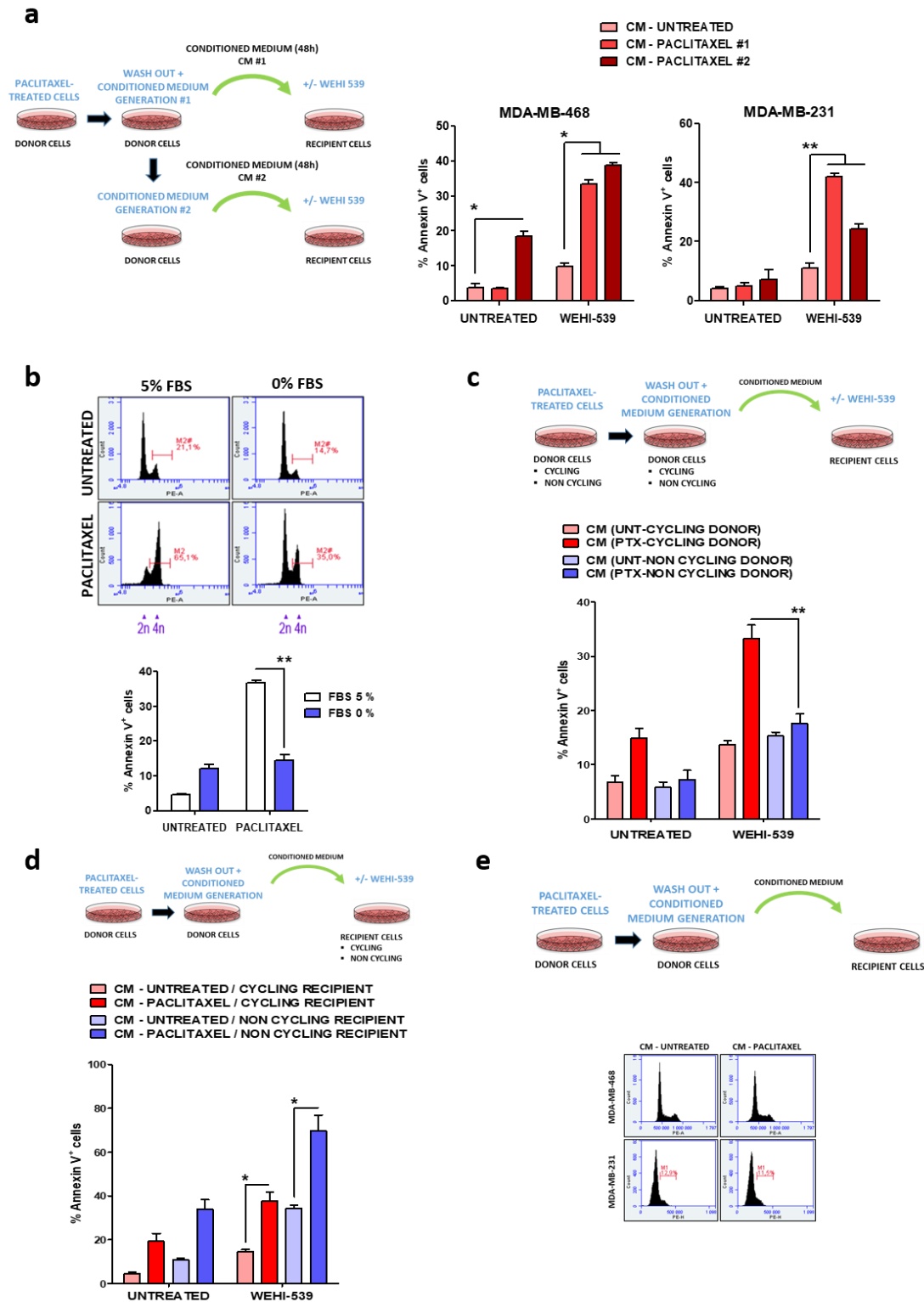


Figure 30 : les cellules traitées par le paclitaxel sécrètent des facteurs solubles entraînant une augmentation du priming apoptotique paracrine.

a. Des cellules traitées 24h par du paclitaxel (donneuses) ont été lavées pour conditionner consécutivement pendant 48h deux milieux appliqués sur des cellules correspondantes (receveuses) pendant 48h en présence ou non de WEHI-539. La mort cellulaire des cellules receveuses a été évaluée par marquage à l'Annexine-V. b. Analyse du cycle cellulaire par marquage à l'iodure de propidium de cellules T47D avec ou sans 5 % de sérum (FBS) traitées 24h par du paclitaxel (panel supérieur). Analyse de la mort par marquage à l'Annexine-V de cellules T47D avec ou sans 5 % de sérum 48h après un traitement de 24h par du paclitaxel. c. Des cellules T47D avec sérum (cyclante) ou sans (non cyclante) traitées 24h par du paclitaxel ont été lavées pour conditionner pendant 48h un milieu appliqué sur des cellules correspondantes (receveuses) pendant 48h en présence ou non de WEHI-539. d. Des cellules T47D traitées 24h par du paclitaxel (donneuses) ont été lavées pour conditionner pendant 48h un milieu appliqué sur des cellules correspondantes (receveuses) avec sérum (cyclante) ou sans (non cyclante) pendant 48h en présence ou non de WEHI-539. e. Analyse du cycle cellulaire de cellules receveuses des milieux conditionnés. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05 et **0.01.

a. Le paclitaxel induit un phénotype pro-inflammatoire dans des modèles de Patient-Derived Xenograft (PDX) de cancer du sein.

Nous avons dans un premier temps caractérisé ces 3 modèles de PDX par analyses histologiques, immunohistochimiques et génétiques à l'aide d'un séquençage sur les hotspot mutationnels de plusieurs gènes, les résultats confirmant une préservation des caractéristiques des tumeurs initiales après plusieurs passages sur souris (**Fig 31a**). Après amplification *in vivo* des 3 PDX, nous avons effectué des traitements par le paclitaxel et récupéré les tumeurs à différents temps après traitement : 6 jours après 1 injection pour le modèle #248 (N = 2 souris par groupe) ; 13 jours après une deuxième injection pour le modèle #249 (N = 3 souris par groupe) ; 10 jours après une première injection, 5 et 25 jours après une deuxième injection pour le modèle #306 (N = 1 souris par condition) (**Fig. 31b**). Ces tumeurs ont ensuite fait l'objet d'une analyse transcriptomique globale par Digital Sequencing (DGSeq) en collaboration avec le Dr Laurent David (CRTI UMR 1064). Cette analyse a permis de mettre en évidence pour chaque modèle de PDX une liste de gènes différentiellement exprimés avant et après traitement par du paclitaxel.

Etant à la recherche de facteurs solubles sécrétés par les cellules ayant subi un stress mitotique par le paclitaxel, nous avons analysé quels ligands endogènes pouvaient être à l'origine de l'expression différentielle des gènes. Nous avons pour cela eu recours à l'outil d'analyse OMIC EnrichR et de la base de données LINCS L1000 Ligand Perturbations up. Cette base de données a été établie par analyse du transcriptome d'un large panel de lignées cellulaires traitées par une variété de ligands endogènes. Les résultats obtenus suggèrent l'induction d'un phénotype pro-inflammatoire des PDX traités par du paclitaxel, la majorité des gènes différentiellement exprimés étant des gènes cibles du TNF α et de l'interleukine-1 (IL-1), deux cytokines pro-inflammatoires (**Fig. 31c**).

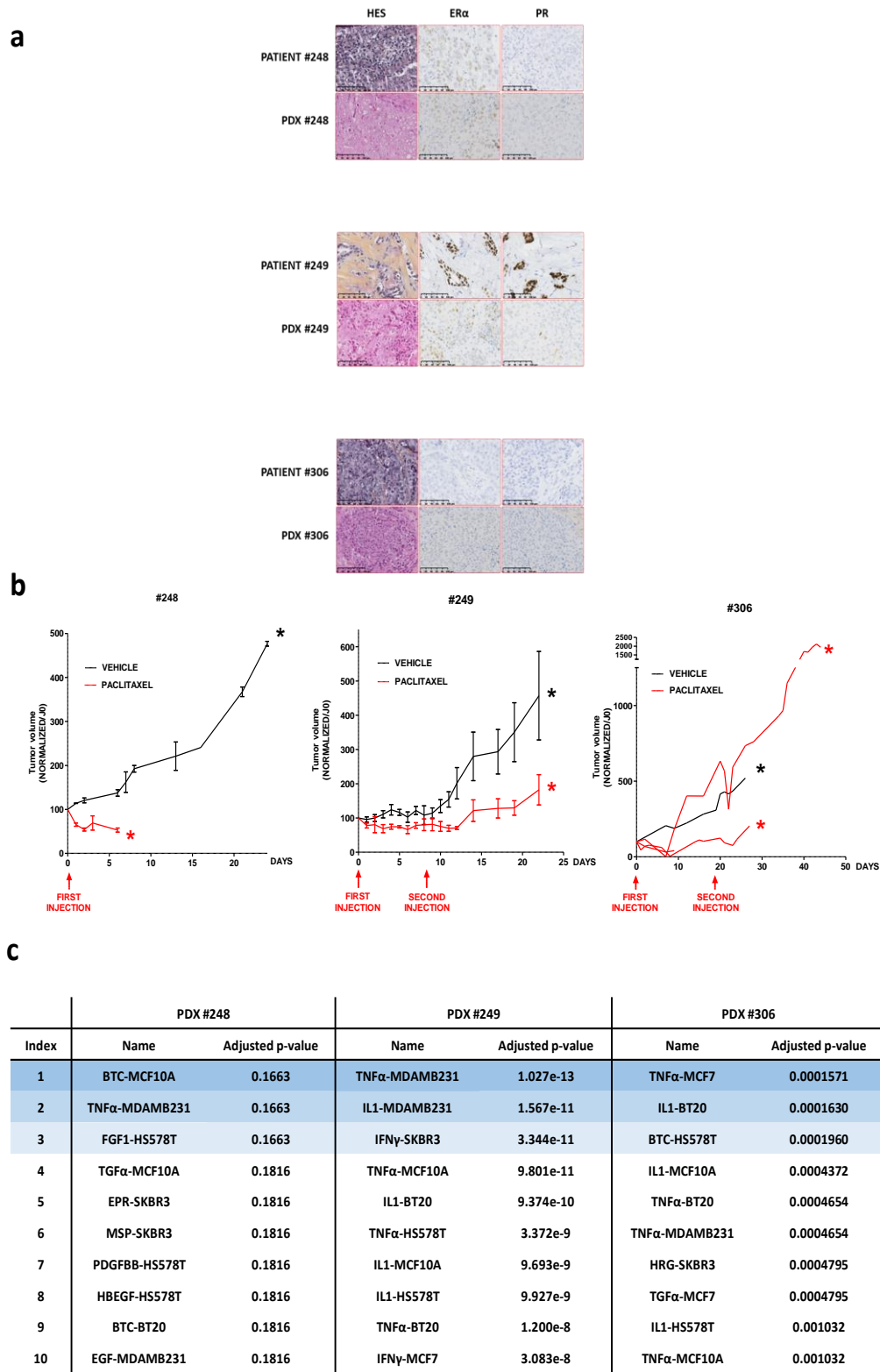


Figure 31 : le paclitaxel induit un phénotype pro-inflammatoire dans des modèles de Patient-Derived Xenograft (PDX) de cancer du sein.

a. Caractérisation des PDX et des tumeurs d'origine correspondantes par IHC (HES (Hématoxyline Eosine Safran) et expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone) **b.** Evolution de la croissance tumorale des 3 modèles de PDX de cancer du sein traités ou non par paclitaxel (N = 2 par groupe pour le PDX #248, N = 3 par groupe pour le PDX #249, N = 1 par condition pour le PDX #306 ; les astérisques correspondent aux exérèses des tumeurs). **c.** Analyse transcriptomique globale des PDX #248, #249, #306 traités ou non par du paclitaxel à l'aide de l'outil EnrichR LINCX L1000 Ligand Perturbations up. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM.

b. Le paclitaxel génère *in vivo* des micronoyaux cGAS positifs et induit durablement le TNF α , les IFN-I et NOXA.

Nous avons par la suite recherché l'origine du phénotype pro-inflammatoire déclenché par un traitement au paclitaxel. Comme nous l'avons précédemment évoqué, cet antiméiotique, en perturbant les mitoses, engendre la formation de micronoyaux. Nous nous sommes alors appuyés sur les travaux de deux équipes ayant démontré que la rupture spontanée des enveloppes micronucléaires permettait à l'ADN, jusqu'alors contenu au sein des micronoyaux, d'être reconnu par le senseur de l'ADN cytosolique cGAS (Harding et al., 2017; Mackenzie et al., 2017).

L'analyse immunohistochimique des PDX a en effet révélé la présence de nombreux micronoyaux marquant cGAS après traitement par le paclitaxel (**Fig. 32a**). Cette donnée, associée au phénotype pro-inflammatoire des PDX traitées, nous ont conduits à analyser par qPCR l'induction du TNF α et de l'IFN β 1. Les résultats montrent une induction transcriptionnelle, même 13 jours après la dernière injection de paclitaxel, du TNF α et de l'IFN β 1 (**Fig. 32b**).

Enfin, nous avons terminé notre analyse de la réponse *in vivo* au paclitaxel en analysant l'évolution de différentes protéines de la famille BCL-2 du PDX #306 après traitement (**Fig.32c**). En ce qui concerne les protéines anti-apoptotiques, l'expression de la protéine MCL-1 diminue considérablement après un traitement par paclitaxel et ce, même 25 jours après. L'expression de BCL-xL augmente considérablement 5 jours après le traitement par paclitaxel et demeure augmentée 25 jours après. Quant à BCL-2, son expression augmente à mesure que l'on s'éloigne du moment de l'injection. Nous avons également analysé plusieurs BH3-only et mis en évidence l'induction transitoire de BIM et surtout l'induction de NOXA, celle-ci se maintenant 25 jours après l'injection de paclitaxel. Nous avons analysé par qPCR le niveau de transcription du gène *PMAIP1* codant pour la protéine NOXA. Les résultats montrent une induction transcriptionnelle dans les modèles #248 et #306 ainsi qu'une tendance dans le modèle #249 (**Fig. 32d**). L'ensemble de ces résultats indique que le paclitaxel génère *in vivo* des micronoyaux, potentiellement reconnus par le senseur de l'ADN cytosolique cGAS, et induit la transcription de manière durable des gènes TNF α , l'IFN β 1 et *PMAIP1*.

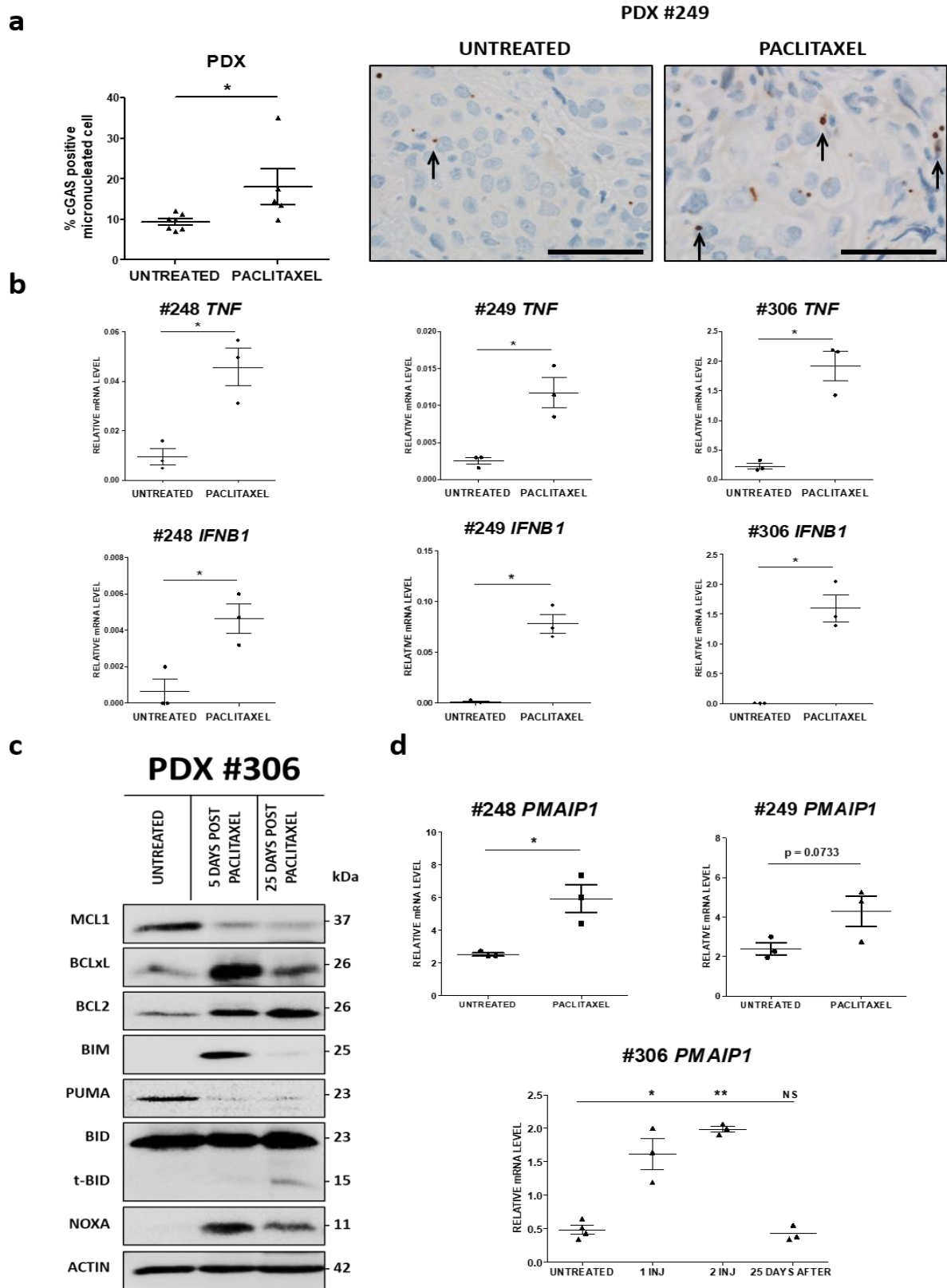


Figure 32 : le paclitaxel génère *in vivo* des micronoyaux cGAS positifs et induit durablement le TNF α , les IFN-I et NOXA.

a. Quantification par IHC des micronoyaux cGAS positifs dans les PDX #248 et #249 traités ou non par du paclitaxel (panel de gauche). Champs représentatifs après marquage IHC du PDX #249 par un anticorps anti-cGAS (panel de droite, barre d'échelle : 50 μ m). **b.** Analyse par qPCR des PDX #248, #249 et #306 traités ou non par du paclitaxel. **c.** Analyse par immunoblot du PDX #306 traité ou non par du paclitaxel. Barre d'erreur : moyenne \pm SEM ; t-test bilatéral non pairé. Les symboles correspondent à une p-valeur inférieure à *0.05 et **0.01. NS : non significatif. Les résultats de qPCR comportent un duplicat technique pour le PDX #248 et un triplicat technique pour le PDX #306.

c. La relocalisation de cGAS sur les micronoyaux générés par des antimitotiques est réduite par la surexpression en LMNB2.

Nous avons par la suite confirmé la formation de micronoyaux cGAS⁺ par des antimitotiques inducteurs d'aneuploïdie. Un traitement de 24h de paclitaxel ou d'AZD1152 sur la lignée MDA-MB-468 entraîne la présence de micronoyaux dans 85 % et 60 % des cellules respectivement. De plus, un marquage immunocytochimique met en évidence dans 60 % des cellules traitées par du paclitaxel et 40 % des cellules traitées par de l'AZD1152 un ou plusieurs micronoyaux cGAS⁺ (**Fig. 33a, 33b et 33c**). Nous avons confirmé que, tout en ne prévenant pas la génération de micronoyaux, la surexpression en LMNB2 diminue de moitié le pourcentage de cellules contenant au moins un micronoyau cGAS⁺ (**Fig. 33a, 33b et 33c**).

d. Le phénotype pro-inflammatoire des cellules traitées par le paclitaxel est dû à l'activation de la voie cGAS/STING via la rupture de l'enveloppe des micronoyaux.

Afin de corréliser la présence de micronoyaux cGAS⁺ et le phénotype pro-inflammatoire des tumeurs traitées par du paclitaxel, nous avons analysé par qPCR et immunoblot des cellules Ctl et LMNB2 48h après un traitement de 24h par du paclitaxel. Nous avons constaté une induction moindre du *TNF α* ainsi que l'absence d'induction d'*IFNB1* dans les cellules LMNB2. De plus, les diminutions des phosphorylations de P65 et de STAT1 dans les cellules LMNB2 traitées au paclitaxel témoignent respectivement d'une activation de la voie NF- κ B et d'une production d'interféron moindres (**Fig. 34a**). Après avoir démontré que le renforcement de la membrane micronucléaire diminuait l'induction d'un phénotype pro-inflammatoire par le paclitaxel, nous avons étudié l'implication de STING. Nous avons par conséquent réalisé cette même expérience en utilisant cette fois-ci des cellules Ctl et STING^{-/-}. Pour chacune des lignées testées, la perte de STING prévient l'induction transcriptionnelle du *TNF α* et de l'*IFNB1*, et diminue l'activation de NF- κ B (sauf pour la lignée T47D) et de STAT1 (**Fig. 34b**). Enfin, aucune production d'IFN α ne fut détectée dans le milieu conditionné pendant 48h par des cellules STING^{-/-} traitées 24h par du paclitaxel (**Fig. 34c**). L'ensemble de ces données démontre que le phénotype pro-inflammatoire des cellules cancéreuses induit par le paclitaxel est le résultat de l'activation de la voie cGAS/STING. Cette activation est due à la rupture des enveloppes des micronoyaux générés suite à la perturbation des mitoses.

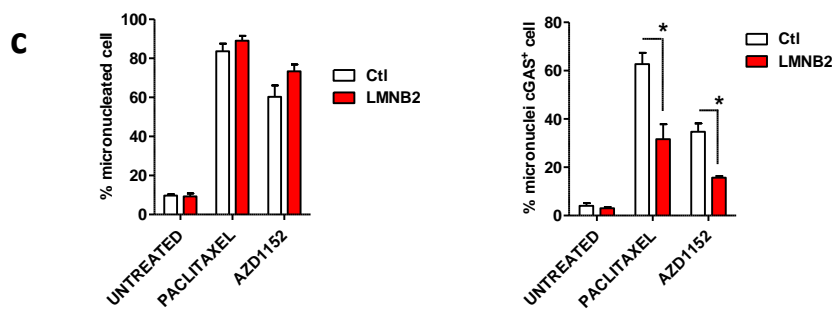
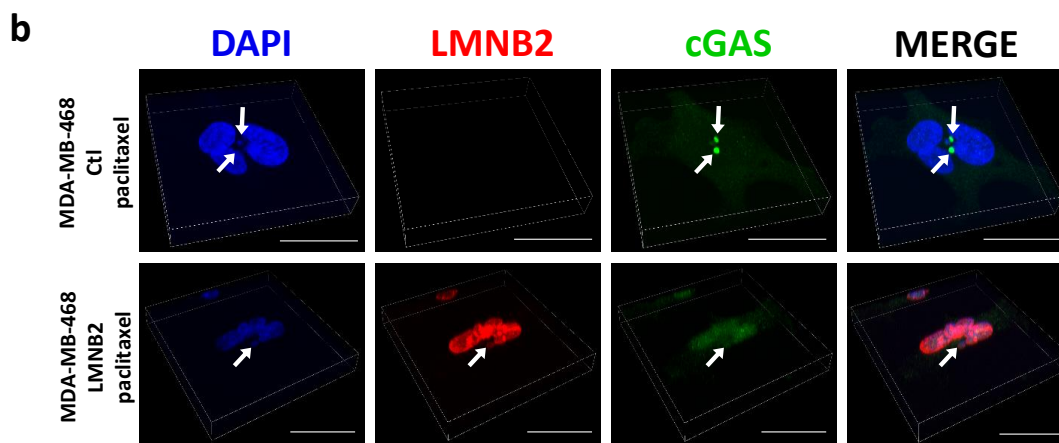
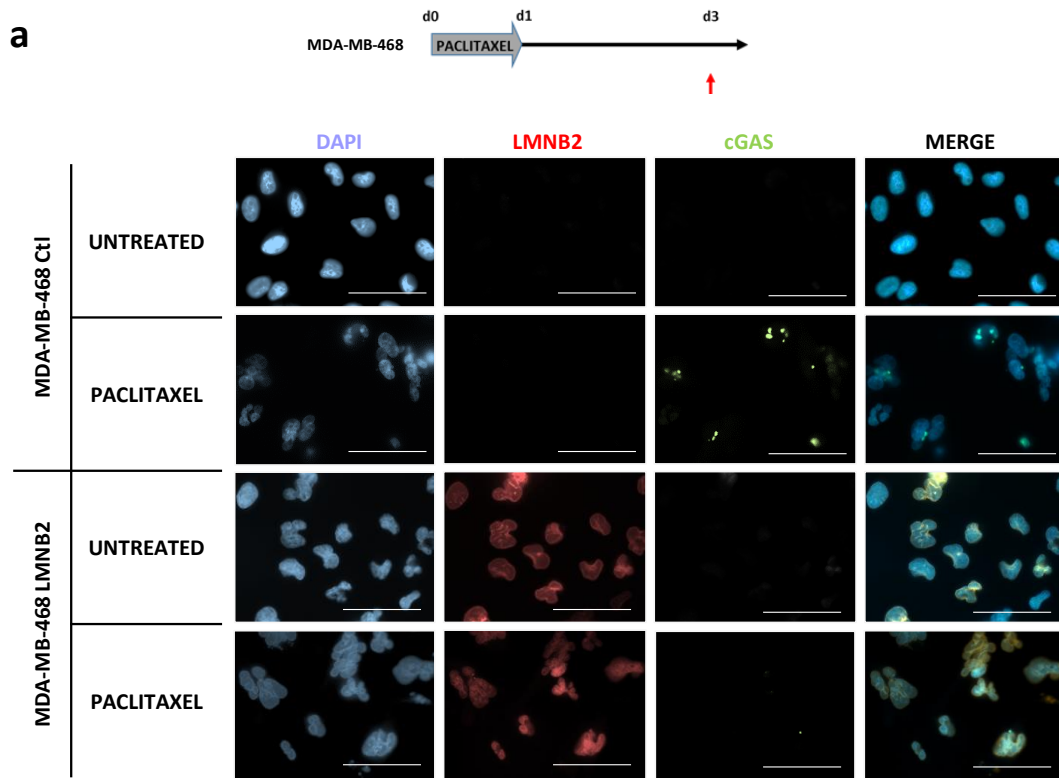


Figure 33 : la détection par le senseur de l'ADN cytosolique cGAS des micronoyaux générés par des antimitotiques est réduite par la surexpression en LMNB2.

a. Visualisation de la localisation de cGAS par immunocytochimie (ICC) dans des cellules MDA-MB-468 Ctl ou LMNB2 traitées ou non par du paclitaxel (barre d'échelle : 60 μ m). b. Même expérience que a. en microscopie confocale (barre d'échelle : 20 μ m). c. Quantification de a. Barre d'erreur : moyenne \pm SEM ; t-test bilatéral païré. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05.

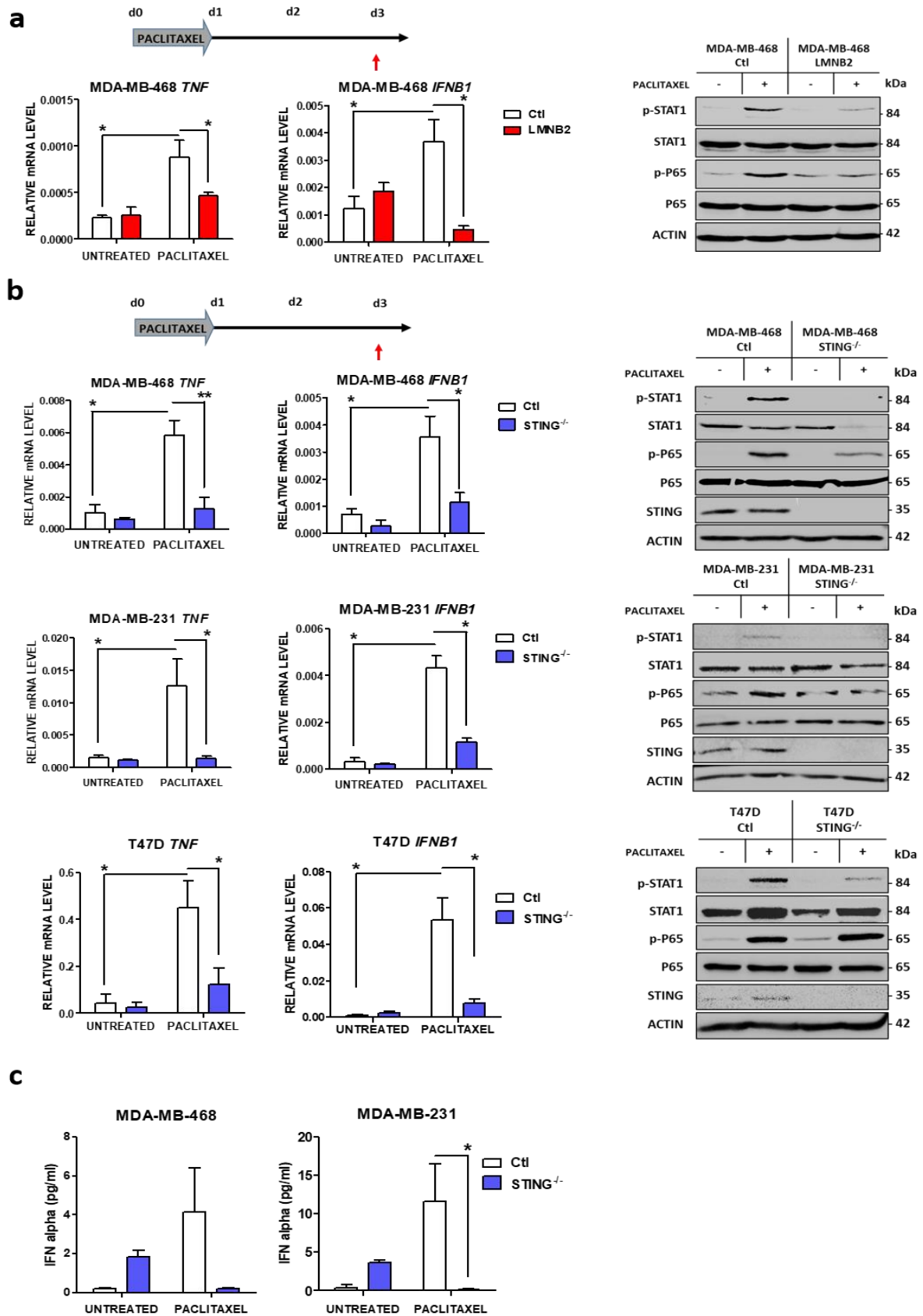


Figure 34 : le phénotype pro-inflammatoire des cellules traitées par le paclitaxel est dû à l'activation de la voie cGAS/STING par la rupture de l'enveloppe des micronoyaux.

a. Analyse par immunoblot et qPCR de cellules MDA-MB-468 Ctl ou surexprimant la LMNB2 48h après un traitement de 24h de paclitaxel. **b.** Analyse par immunoblot et qPCR de cellules Ctl ou STING^{-/-} 48h après un traitement de 24h de paclitaxel. **c.** Quantification de l'IFN α par ELISA dans le milieu conditionné pendant 48h par des cellules Ctl ou STING^{-/-} après un prétraitement de 24h par du paclitaxel. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; *t*-test bilatéral pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05 et **0.01.

4. L'augmentation du priming de manière paracrine dépend de l'activation de la voie cGAS/STING et est prépondérante pour l'activité anti-tumorale du paclitaxel.

a. L'augmentation du priming de manière paracrine par les cellules traitées au paclitaxel est dépendante de STING.

Nos travaux démontrent que des cellules cancéreuses traitées par du paclitaxel acquièrent à la fois un phénotype pro-inflammatoire dépendant de l'activation de la voie cGAS/STING et la capacité d'augmenter de manière paracrine le priming des cellules cancéreuses non directement impactées par le paclitaxel. Nous avons par la suite corrélé ces deux événements en conditionnant des milieux par des cellules Ctl ou STING^{-/-} traitées pendant 24h par le paclitaxel (**Fig. 35a**). La diminution de la sensibilisation au WEHI-539 par les milieux conditionnés par les cellules STING^{-/-} et ce, dans chacune des lignées cellulaires testées, montre que l'augmentation du priming de façon paracrine repose en grande partie sur l'activation de la voie cGAS/STING dans les cellules donneuses. Nous avons voulu confirmer ce résultat dans un modèle de co-culture de cellules traitées ou non par du paclitaxel. Pour cela, nous avons généré des lignées cellulaires exprimant la protéine de fusion Histone 2B-RFP (H2B-RFP) afin de distinguer les cellules traitées des cellules non traitées. Après un traitement de 24h par du paclitaxel, les cellules Ctl et STING^{-/-} ont été lavées puis mises en culture avec des cellules H2B-RFP non traitées à un ratio de 1 : 1. Après 48h de co-culture, les cellules ont été traitées par du WEHI-539 pendant les 48h suivantes, l'apoptose des cellules H2B-RFP fut ensuite évaluée par marquage à l'Annexine-V couplée à l'APC (**Fig. 35b**). La diminution de l'apoptose des cellules H2B-RFP en présence de cellules STING^{-/-} démontre le rôle de STING dans l'effet paracrine (**Fig. 35c**). Enfin, l'effet identique d'un milieu conditionné par des cellules traitées au paclitaxel sur des cellules Ctl ou STING^{-/-} indique que STING est requis pour induire l'effet paracrine mais pas pour y répondre (**Fig. 35d**).

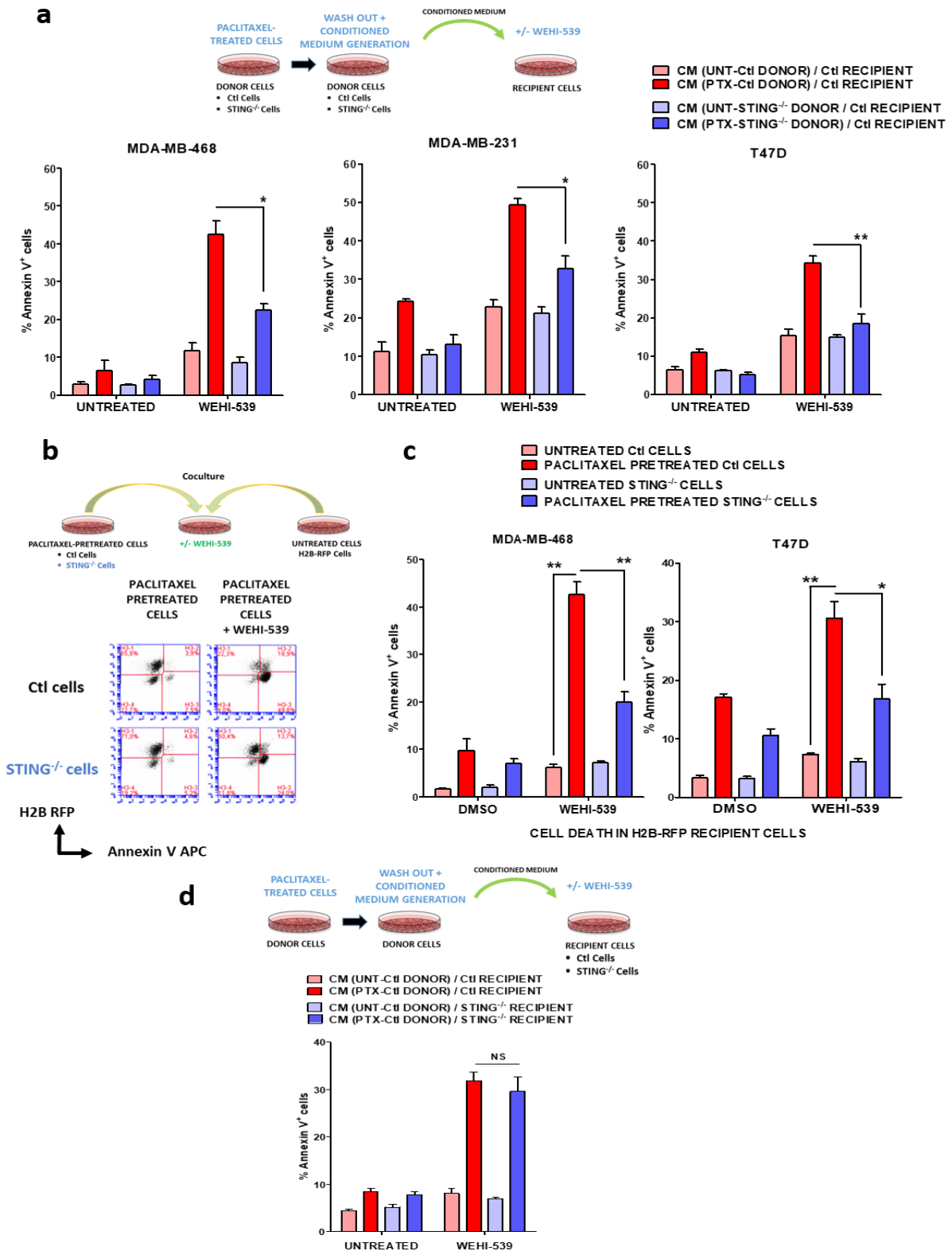


Figure 35 : l'augmentation du priming apoptotique paracrine par les cellules traitées au paclitaxel est dépendante de STING.

a. Des cellules Ctl ou STING^{-/-} traitées 24h par du paclitaxel (donneuses) ont été lavées pour conditionner pendant 48h un milieu appliqué sur des cellules correspondantes (receveuses) pendant 48h en présence ou non de WEHI-539. La mort des cellules receveuses a été évaluée par marquage à l'Annexine-V. **b, c.** Des cellules Ctl ou STING^{-/-} prétraitées 24h par du paclitaxel ont été mises en culture avec des cellules non traitées exprimant la protéine de fusion H2B-RFP (dot plot représentatif d'une expérience en b). Après 48h de co-culture, les cellules ont été traitées par du WEHI-539 pendant les 48h suivantes. La mort des cellules H2B-RFP a été évaluée par marquage à l'Annexine-V (c). **d.** Des cellules MDA-MB-468 traitées 24h par du paclitaxel (donneuses) ont été lavées pour conditionner pendant 48h un milieu appliqué sur des cellules correspondantes Ctl ou STING^{-/-} (receveuses) pendant 48h en présence ou non de WEHI-539. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral païré. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05 et **0.01. NS : non significatif.

- b. L'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine par les cellules traitées au paclitaxel ou à l'AZD1152 dépend de la formation de micronoyaux et de la rupture de leur enveloppe.

Nous savons que l'induction du phénotype pro-inflammatoire par le paclitaxel, résultant de l'activation de la voie cGAS/STING, dépend de la rupture des enveloppes micronucléaires. Nous avons tout d'abord voulu savoir si des traitements par les deux autres antimitotiques étudiés, l'AZD1152 et la gédunine, induisaient un effet paracrine semblable à celui induit par le paclitaxel. Pour rappel, 24h de traitement par l'AZD1152 induit 40 % de cellules contenant un ou plusieurs micronoyaux cGAS⁺, tandis qu'aucune aneuploïdie ne fut détectée après un traitement par de la gédunine. Tout en étant plus faible que le paclitaxel, et contrairement à la gédunine, les cellules traitées par de l'AZD1152 acquièrent la capacité d'augmenter de façon paracrine le priming apoptotique (**Fig. 36a**). De plus, l'association de la gédunine au paclitaxel, bloquant tout échappement à l'arrêt mitotique (**Fig. 36b**), prévient l'effet paracrine des cellules traitées (**Fig. 36a**). Enfin, la diminution de l'effet du milieu conditionné par des cellules LMNB2 traitées au paclitaxel par rapport aux cellules Ctl démontre l'origine micronucléaire de l'effet paracrine (**Fig. 36c**).

- c. L'activation de la voie cGAS/STING est indépendante de l'ADN mitochondrial.

De récents travaux ont montré la possible activation de la voie cGAS/STING par l'ADN mitochondrial relargué lors de la MOMP via les pores formés par les effecteurs BAX et BAK (McArthur et al., 2018; Riley et al., 2018; Rongvaux et al., 2014; White et al., 2014). Nous avons par conséquent évalué son implication en conditionnant des milieux par des cellules BAX^{-/-} BAK^{-/-}, incapables de déclencher une MOMP, traitées 24h par du paclitaxel. Les effets identiques des milieux conditionnés ainsi que le maintien d'un phénotype pro-inflammatoire inductible dans les cellules BAX^{-/-} BAK^{-/-} exposées au paclitaxel démontrent l'absence de contribution de l'ADN mitochondrial dans l'effet paracrine (**Fig. 37a et 37b**). Enfin, nous avons confirmé ce résultat en générant des cellules déplétées en ADN mitochondrial appelées $\rho 0$. Encore une fois, aucune différence d'effet du milieu conditionné par des cellules $\rho 0$ ou Ctl traitées par du paclitaxel ne fut mise en évidence (**Fig. 37c**), un contrôle par qPCR sur l'ADN génomique ayant de plus confirmé la déplétion en ADN mitochondrial (**Fig. 37d**).

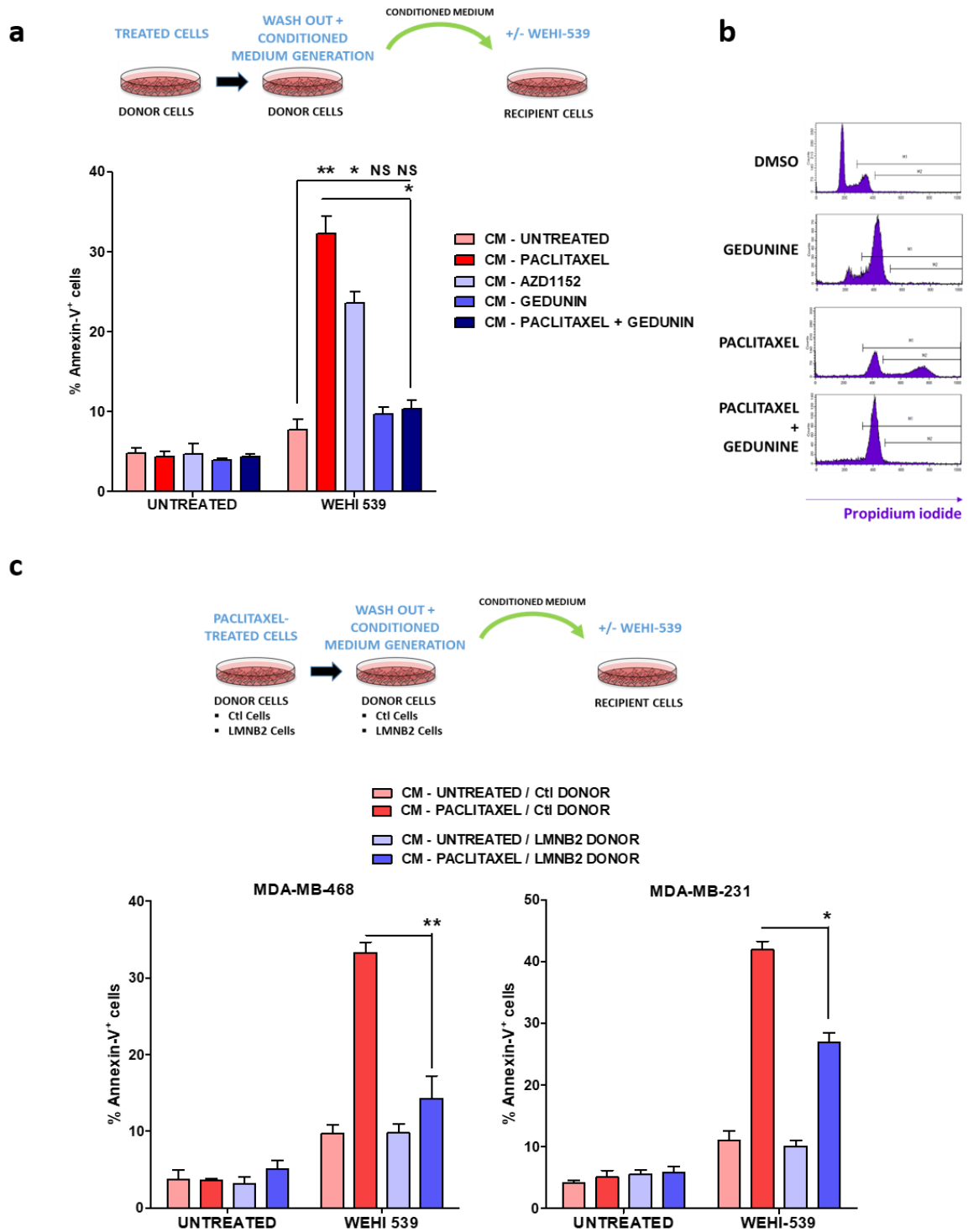


Figure 36 : l'augmentation du priming paracrine par les cellules traitées au paclitaxel dépend de la formation de micronoyaux et de la rupture de leur enveloppe.

a. Des cellules MDA-MB-468 traitées 24h comme indiqué (donneuses) ont été lavées pour conditionner pendant 48h un milieu appliqué sur des cellules correspondantes (receveuses) pendant 48h en présence ou non de WEHI-539. La mort cellulaire des cellules receveuses a été évaluée par marquage à l'Annexine-V. b. Analyse du cycle cellulaire par marquage à l'iodure de propidium de cellules MDA-MB-468 traitées 72h comme indiqué. c. Même expérience que a. en utilisant des cellules Ctl ou LMNB2 en cellules donneuses. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05 et **0.01. NS : non significatif.

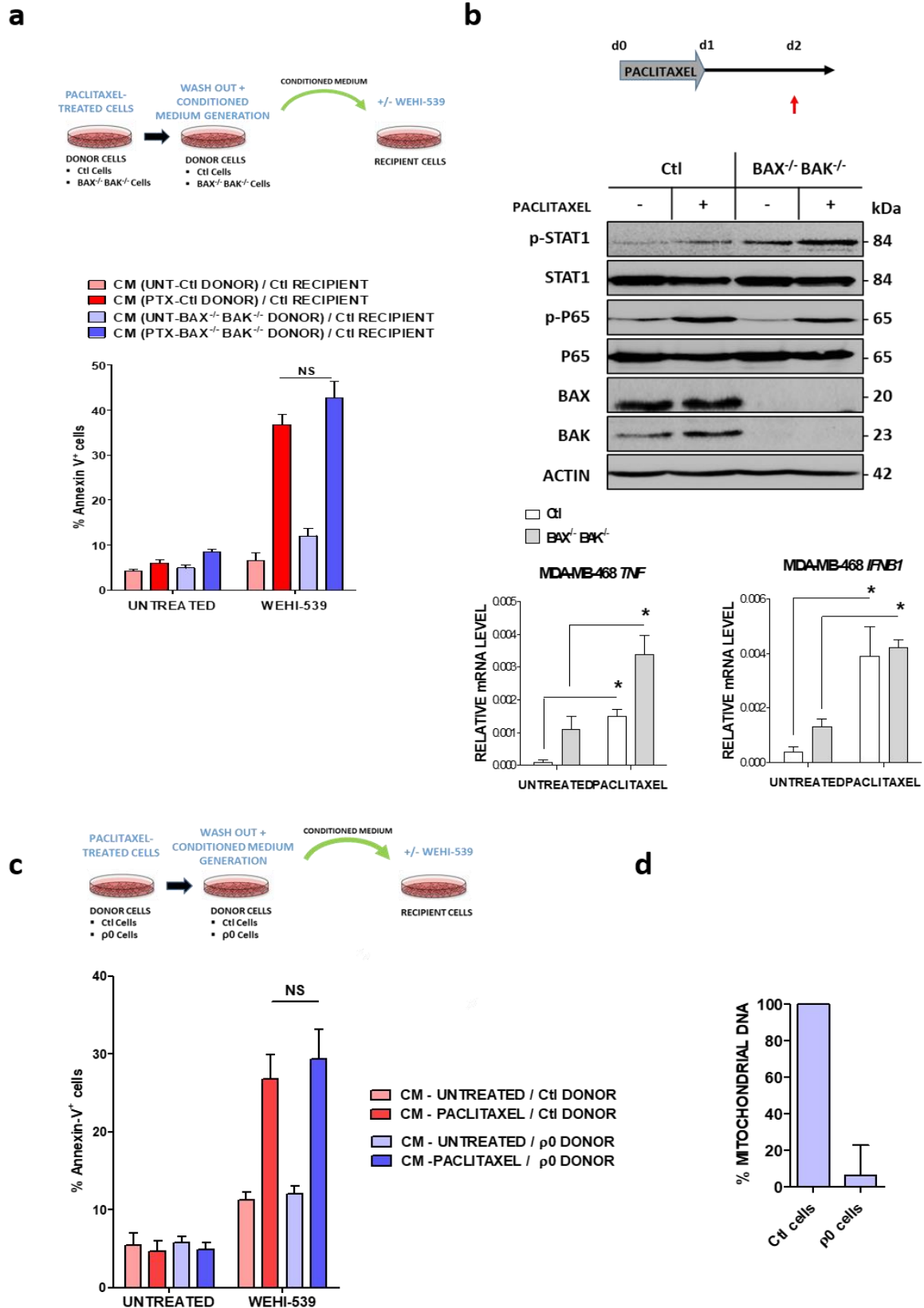


Figure 37 : l'activation de la voie cGAS/STING est indépendante de l'ADN mitochondrial.

a. Des cellules MDA-MB-468 Ctl ou BAX^{-/-} BAK^{-/-} traitées 24h par du paclitaxel (donneuses) ont été lavées pour conditionner pendant 48h un milieu appliqué sur des cellules correspondantes (receveuses) pendant 48h en présence ou non de WEHI-539. La mort cellulaire des cellules receveuses a été évaluée par marquage à l'Annexine-V. **b.** Analyse par immunoblot et qPCR de cellules Ctl ou BAX^{-/-} BAK^{-/-} 24h après un traitement de 24h de paclitaxel. **c.** Même expérience que (a) en utilisant des cellules Ctl ou p0 en cellules donneuses. **d.** Quantification de la déplétion en ADN mitochondrial dans les cellules p0. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; *t*-test bilatéral pairé. Les symboles correspondent à une *p*-value inférieure à *0.05. NS : non significatif.

d. L'induction de NOXA dans les cellules aneuploïdes est indépendante de STING.

Après avoir démontré que l'augmentation du priming apoptotique dans les cellules receveuses est dépendante de la présence de STING dans les cellules donneuses, nous avons voulu savoir si l'activation de cette voie jouait également un rôle dans la mort des cellules aneuploïdes (donneuses) suite à un traitement par antimétoproscique. Aucune différence de sensibilité, que ce soit en terme de mort cellulaire ou de priming, ne fut mise en évidence après un traitement par paclitaxel ou par AZD1152 (**Fig. 38a et 38b**). Nous avons également montré que l'induction de NOXA, principal contributeur de la charge pro-apoptotique dans les cellules aneuploïdes, bien que légèrement diminuée, était toujours visible dans les cellules STING^{-/-} donneuses (**Fig. 38c**).

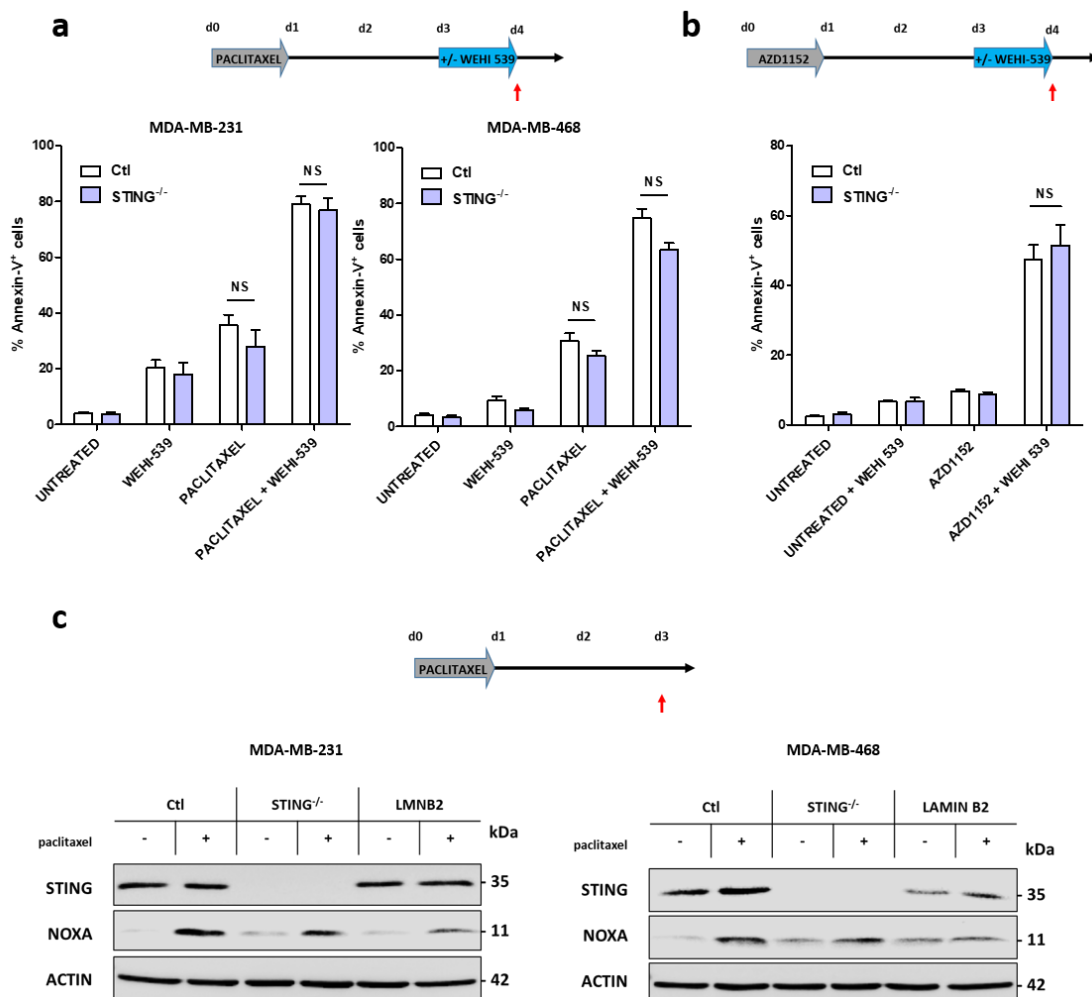


Figure 38 : l'induction de NOXA dans les cellules aneuploïdes (donneuses) est indépendante de STING.

a, b. Analyse de la mort de cellules Ctl et STING^{-/-} traitées ou non par du WEHI-539 48h après un traitement de 24h par du paclitaxel (a) ou de l'AZD1152 (b). **c.** Analyse par immunoblot de cellules Ctl, STING^{-/-} et LMNB2 48h après un traitement de 24h par du paclitaxel. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral pairé. NS : non significatif

e. La sensibilité des tumeurs mammaires au paclitaxel dépend de STING.

Nous avons ensuite évalué la contribution de l'augmentation du priming de façon paracrine dans la réponse *in vivo* au paclitaxel. Des cellules MDA-MB-231 Ctl et STING^{-/-} ont été xéno greffées dans la glande mammaire de souris immunodéprimées NSG, permettant ainsi de s'affranchir de tout effet du système immunitaire. De façon surprenante, une perte complète de la sensibilité fut observée dans les tumeurs STING^{-/-} après deux injections de paclitaxel (Fig. 39).

L'ensemble de ces résultats démontre que le sécrétome de cellules traitées au paclitaxel, induisant une augmentation paracrine du priming apoptotique, est le résultat de l'activation de la voie cGAS/STING consécutive à la rupture des enveloppes des micronoyaux. L'activation de cette voie n'est pas impliquée dans l'induction de NOXA se produisant dans les cellules aneuploïdes (cellules donneuses) et par conséquent dans leur mort mais a cependant une contribution majeure dans la sensibilité *in vivo* des tumeurs mammaires au paclitaxel.

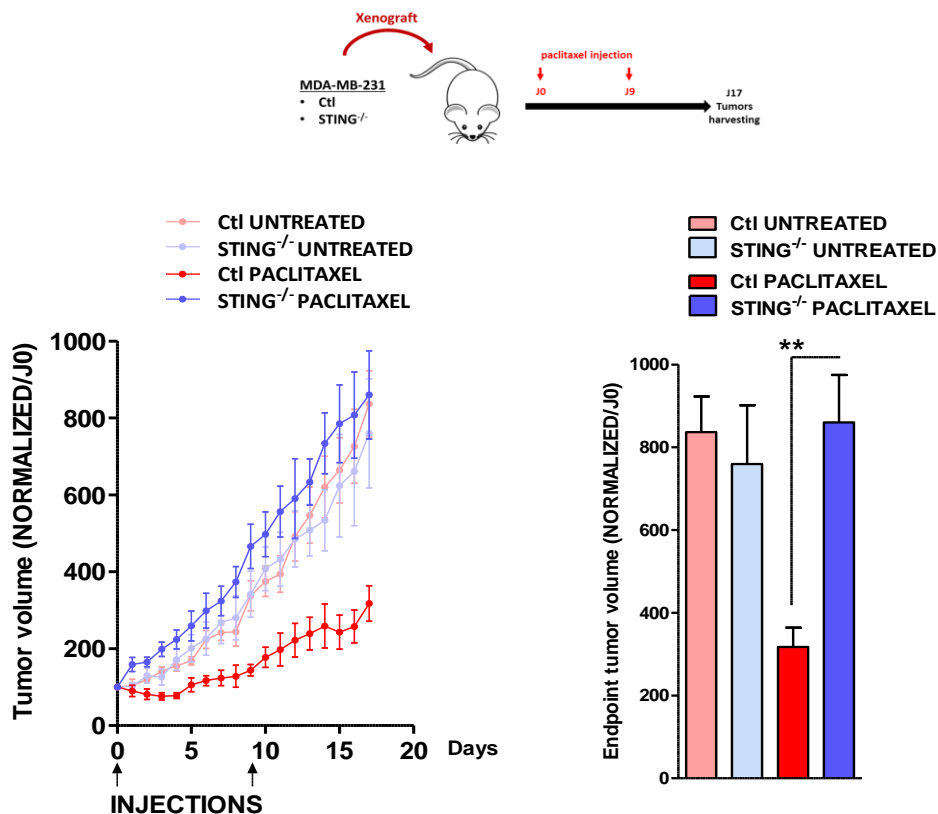


Figure 39 : la sensibilité des tumeurs mammaires au paclitaxel dépend de STING.

Xéno greffes orthotopiques de cellules MDA-MB-231 Ctl et STING^{-/-} traitées par du paclitaxel (10 mg/Kg en intrapéritonéal) comme indiqué. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral non pairé. Le symbole correspond à une p-value inférieure à **0.01.

5. L'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine est le résultat de la transcription du gène codant pour NOXA dans les cellules receveuses.

a. Induction transcriptionnelle de NOXA dépendante de STING dans des modèles de tumeurs mammaires traitées au paclitaxel.

Nous avons analysé les xénogreffes de MDA-MB-231 à J17, soit 8 jours après la seconde injection de paclitaxel. Nous avons confirmé l'induction par le paclitaxel d'un phénotype pro-inflammatoire par la présence de p-STAT1 et de p-P65 et par l'induction transcriptionnelle du TNF α et de l'IFN β , ainsi que d'une cible des IFN-I, l'IFIT1. De plus, afin de comprendre les ressorts biologiques de l'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine, nous avons analysé des protéines de la famille BCL-2 et mis en évidence une induction transcriptionnelle de NOXA détectable uniquement dans les tumeurs Ctl traitées au paclitaxel (Fig. 40).

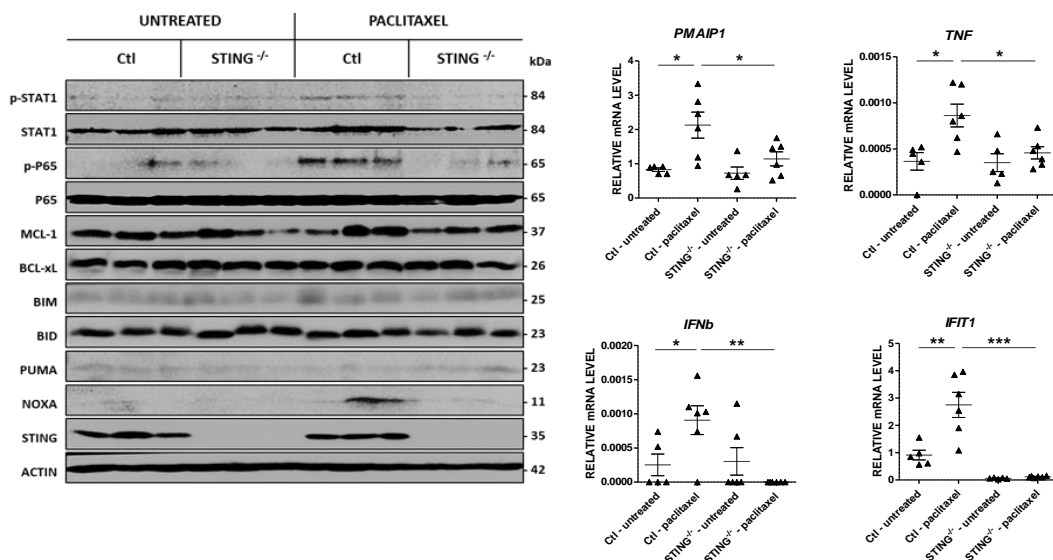


Figure 40 : induction transcriptionnelle de NOXA dépendante de STING dans les xénogreffes de cellules MDA-MB-231 traitées au paclitaxel.

Analyse par immunoblot et qPCR des xénogreffes de cellules MDA-MB-231 Ctl et STING^{-/-} issues de la figure 15 à j17 (soit 8 jours après la deuxième injection de paclitaxel). N = 7 souris par groupe. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral non pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05, **0.01 et ***0.001.

b. Le milieu conditionné par des cellules traitées par du paclitaxel induit l'expression de NOXA dans les cellules receveuses.

Nous avons démontré précédemment que l'induction de NOXA dans les cellules aneuploïdes était indépendante de STING. La détection dans les xénogreffes traitées par du paclitaxel d'une induction de NOXA, dépendante de STING, suggère que l'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine résulte de l'induction transcriptionnelle de ce BH3-only.

Nous avons donc analysé les variations de différentes protéines de la famille BCL-2 dans des cellules MDA-MB-231 exposées à un ou deux milieux conditionnés successivement par des cellules traitées 24h par du paclitaxel. Parmi plusieurs BH3-only, seul NOXA est induit (**Fig. 41a**). En conditionnant des milieux par des cellules Ctl ou STING^{-/-} traitées par du paclitaxel, nous avons mis en évidence que l'induction de NOXA dans les cellules receveuses est dépendante de l'activation de la voie cGAS/STING dans les cellules donneuses (**Fig. 41b**).

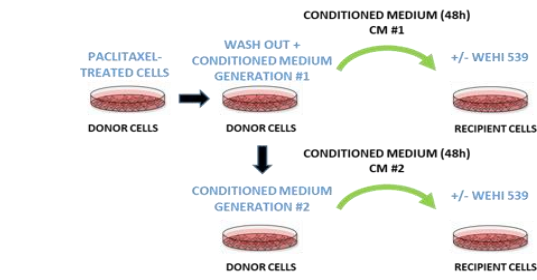
c. L'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine est due à l'induction de NOXA dans les cellules receveuses.

L'absence complète d'effet du milieu conditionné sur des cellules BAX^{-/-} BAK^{-/-} a tout d'abord confirmé l'implication de la MOMP dans la sensibilisation au WEHI-539 (**Fig. 42a**). Pour mettre en évidence l'implication de NOXA dans l'augmentation paracrine du priming, nous avons évalué l'effet du milieu conditionné sur des cellules KO pour les gènes codant un des BH3-only BIM, BID ou NOXA. Seule la perte de NOXA dans les cellules receveuses permis de prévenir la sensibilisation au WEHI-539 confirmant son implication dans l'augmentation du priming apoptotique de façon paracrine et ce, dans les trois lignées cellulaires testées (**Fig. 42b**).

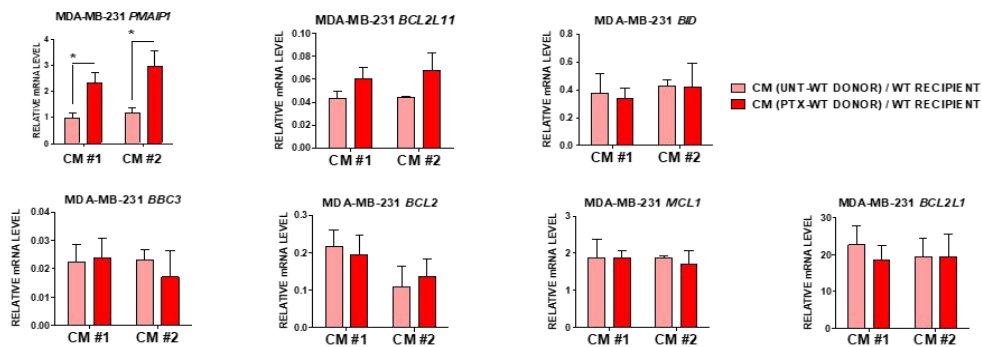
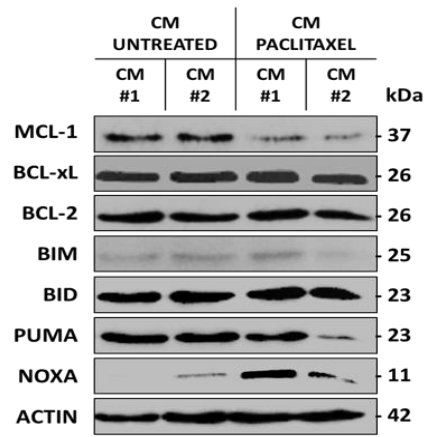
Enfin, la sensibilité des cellules BCL-xL^{-/-} au milieu conditionné seul est en accord avec la spécificité du WEHI-539 pour BCL-xL. NOXA antagonisant MCL-1, ceci explique l'absence d'effet du milieu conditionné sur les cellules MCL-1^{-/-} (**Fig. 42c**).

Nos résultats démontrent que l'augmentation paracrine du priming apoptotique est le résultat de l'induction transcriptionnelle de NOXA dans les cellules receveuses. L'inhibition de MCL-1 qui s'en suit rend les cellules dépendantes de BCL-xL pour leur survie.

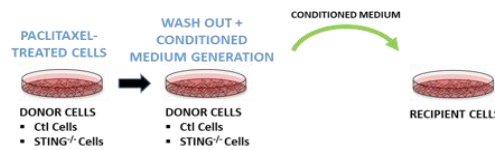
a



MDA-MB-231 RECIPIENT CELLS



b



MDA-MB-468 RECIPIENT CELLS

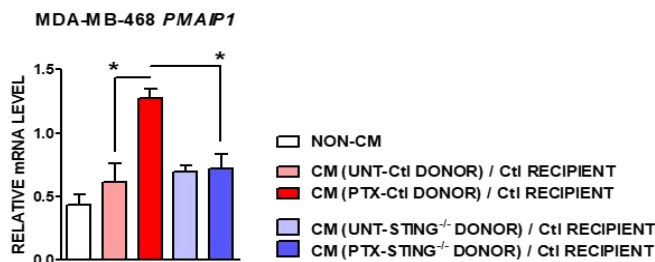
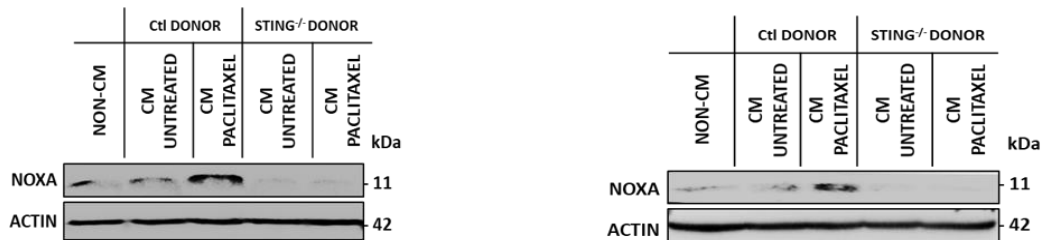
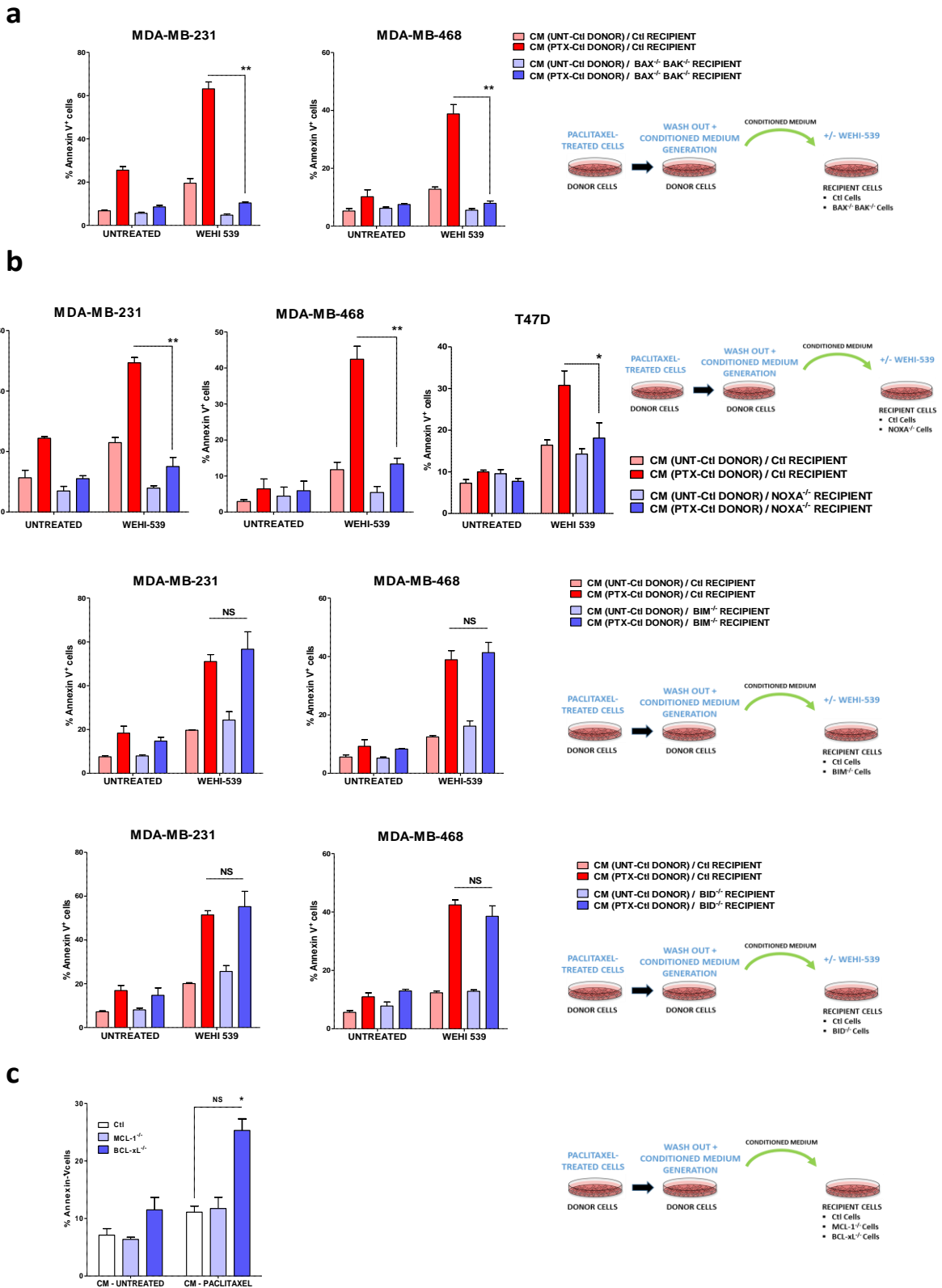


Figure 41 : le milieu conditionné par des cellules traitées par du paclitaxel induit NOXA dans les cellules receveuses.

a. Analyse par immunoblot et qPCR de cellules MDA-MB-231 ayant été incubées 48h avec des milieux conditionnés successivement pendant 48h par des cellules prétraitées 24h par du paclitaxel. **b.** Analyse par immunoblot et qPCR (seulement pour la lignée cellulaire MDA-MB-468) de cellules ayant été incubées 48h avec un milieu conditionné pendant 48h par des cellules correspondantes Ctl ou STING^{-/-} prétraitées 24h par du paclitaxel. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral paillé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05.



6. L'induction de NOXA est dépendante du TNF α et est amplifiée par les IFN-I.

Nous savons à présent que l'activation de la voie cGAS/STING dans des cellules traitées au paclitaxel entraîne la production d'un sécrétome capable d'induire l'expression de NOXA dans les cellules receveuses. Nous nous sommes ensuite intéressés aux facteurs solubles, présents dans ce sécrétome, responsables de l'induction de NOXA. Après un traitement par du paclitaxel, nous avons mis en évidence que les niveaux transcriptionnels du TNF α et des IFN-I, induits suite à l'activation de la voie cGAS/STING, étaient augmentés durablement. Nous avons donc étudié leur contribution dans l'induction paracrine de NOXA.

a. Une signature IFN-I dans une tumeur mammaire est prédictive d'une sensibilité aigüe au paclitaxel.

Plusieurs données issues du modèle de culture *ex vivo* mis en place par l'équipe suggèrent une contribution de ces cytokines dans l'effet du paclitaxel. Ainsi, dans le but d'identifier des marqueurs prédictifs de réponse au paclitaxel, nous avons sélectionné 60 tumeurs, naïves de tout traitement, dont les sensibilités *ex vivo* au paclitaxel et les caractéristiques tumorales étaient connues (**Fig 43a et 43b**), pour faire l'objet d'une analyse transcriptomique globale. Nous avons analysé les transcriptomes de ces tumeurs en identifiant des différences de signature d'expression génique (Jézéquel et al., 2015) selon la sensibilité/résistance *ex vivo* au paclitaxel. Parmi l'ensemble des signatures testées, seules les signatures STAT-1 et IFN-I étaient différentes dans le sens d'une forte signature dans les tumeurs sensibles (**Fig 44a et 44b**). Aucune différence dans le score de prolifération ne fut mise en évidence, suggérant une nouvelle fois que la sensibilité au paclitaxel n'est pas directement corrélée à la prolifération tumorale. Un des avantages de la culture organotypique des explants de tumeurs mammaires est la conservation du stroma tumoral. Pour évaluer l'éventuelle contribution du stroma et notamment de l'infiltrat immunitaire dans les différences de signature IFN-I, nous avons calculé les scores stromal et immun pour chaque tumeur basé sur les données transcriptomiques (**Fig 44c**). Si aucune différence dans le score stromal n'apparaît entre les

tumeurs sensibles et résistantes *ex vivo* au paclitaxel, une tendance à un score immun supérieur dans les tumeurs sensibles est visible. A ce stade de nos travaux, une contribution d'un infiltrat immun aux signatures STAT-1 et IFN-I ne peut être exclue. De plus, nous avons analysé la présence d'IFN α dans le surnageant de tranches tumorales traitées ou non par du paclitaxel. Du fait d'une cellularité non calibrée entre les différentes tumeurs, nous n'avons pas pu comparer les tumeurs entre elles mais seulement la condition non traitée à la condition traitée pour une même tumeur. Nous avons constaté que, parmi les tumeurs primées pour l'apoptose (sensibles à l'ABT-737), les tumeurs produisant de l'IFN α sous paclitaxel étaient en majorité des tumeurs sensibles (**Fig. 44d**). Ces résultats suggèrent qu'une voie de signalisation IFN-I actionnable est importante pour une réponse apoptotique aigüe de la tumeur au paclitaxel.

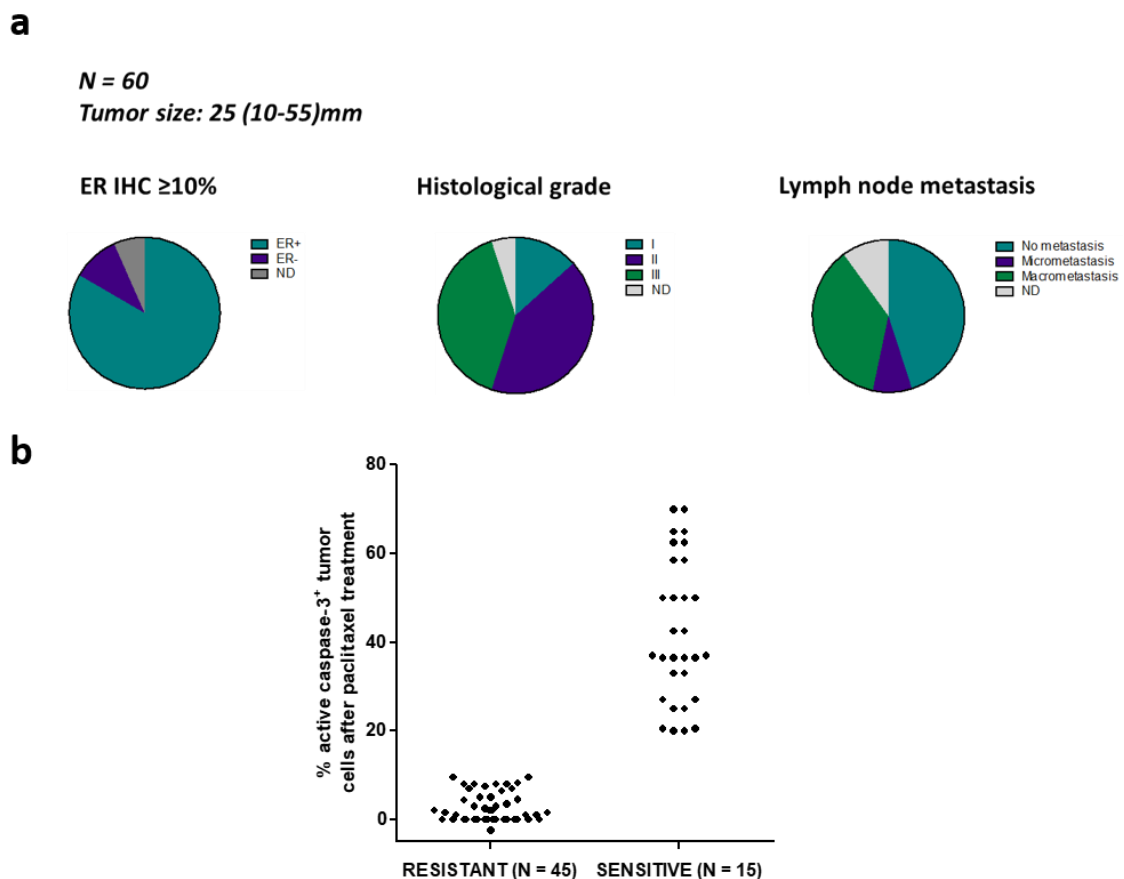


Figure 43 : caractéristique de la cohorte de tumeurs mammaires naïves de traitement dont le transcriptome a été analysé.

a. Taille tumorale moyenne, expression du récepteur aux œstrogènes (évaluée par IHC), grade tumorale et dissémination ganglionnaire de la cohorte de tumeur. **b.** Sensibilité *ex vivo* au paclitaxel de la cohorte de tumeur.

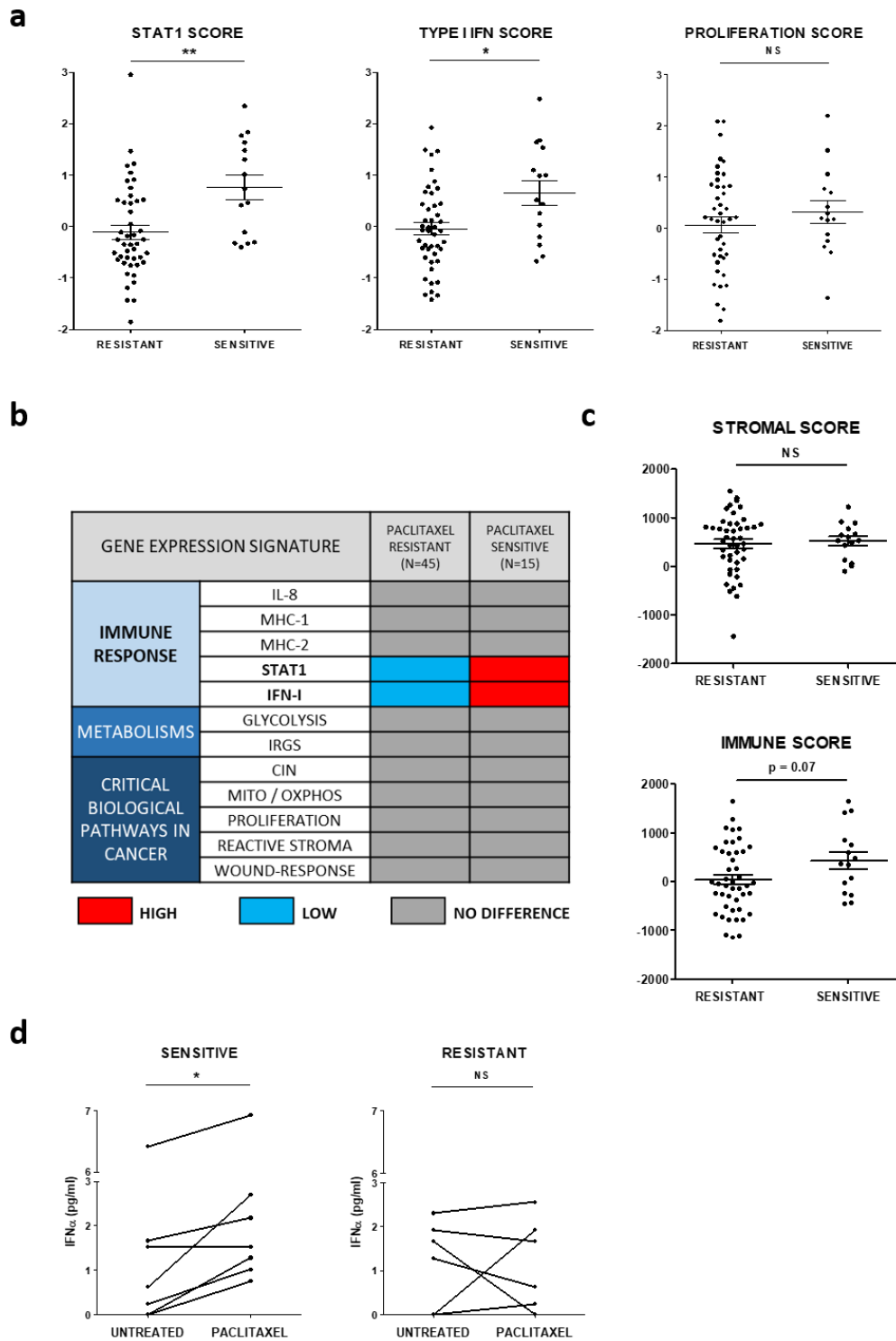


Figure 44 : une signature IFN-I dans une tumeur mammaire est prédictive d'une sensibilité aigüe au paclitaxel.

a. Signatures d'expression génique STAT1, TYPE I IFN et PROLIFERATION issues du transcriptome de la cohorte de tumeur présentée Figure 43 selon la sensibilité *ex vivo* au paclitaxel. **b.** Tableau récapitulant l'ensemble des signatures d'expression génique analysées. **c.** Scores stromal et immunitaire issus de l'analyse transcriptomique de la cohorte de tumeur selon la sensibilité *ex vivo* au paclitaxel. **d.** Quantification de l'IFN α par ELISA dans le surnageant de tranches tumorales traitées ou non par du paclitaxel pendant 48h. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral non pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure *0.05 et **0.01. NS : non significatif.

b. Corrélacion entre les sensibilités *ex vivo* au TNF α et au paclitaxel.

Nous avons ensuite analysé les résultats de 33 tumeurs traitées *ex vivo* à la fois au TNF α et au paclitaxel. Nous avons constaté que les sensibilités d'une même tumeur aux deux traitements étaient corrélées. Cette corrélation semble être spécifique de l'antimitotique puisque ce résultat ne fut pas retrouvé entre des traitements *ex vivo* au TNF α et à un intercalant de l'ADN, la doxorubicine, dans une cohorte de 14 tumeurs ayant reçu ces deux traitements (**Fig. 45a**). Nous avons également constaté que, dans une cohorte de 29 tumeurs mammaires, le TNF α élevait le priming apoptotique des cellules cancéreuses augmentant leur sensibilité à l'ABT-737 (**Fig. 45b**). De plus, dans 42 % des tumeurs, ces deux traitements présentaient un effet synergique (**Fig. 45c**). Ces résultats, issus du modèle d'étude *ex vivo*, suggèrent que le TNF α , en augmentant le priming apoptotique des cellules cancéreuses, contribue aux effets cytotoxiques du paclitaxel.

c. L'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine dépend de la sécrétion de TNF α et d'IFN-I par les cellules donneuses.

Afin d'étudier les rôles du TNF α et des IFN-I dans l'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine, nous avons généré des lignées KO pour les gènes codant pour le TNF α et pour le récepteur aux IFN-I, IFNAR1, par la technique CRISPR-Cas9. La diminution de la sensibilisation au WEHI-539 par le milieu conditionné par des cellules TNF α ^{-/-} traitées au paclitaxel démontre la contribution de cette cytokine dans l'augmentation paracrine du priming apoptotique (**Fig. 46a et Fig. 46d**). Nous avons de plus confirmé ce résultat en ajoutant des anticorps neutralisant le TNF α dans les milieux conditionnés (**Fig. 46b**). Une réduction de l'effet du milieu conditionné fut également constatée lorsque les cellules receveuses étaient des cellules IFNAR1^{-/-} démontrant le rôle des IFN-I dans le processus (**Fig. 46c**).

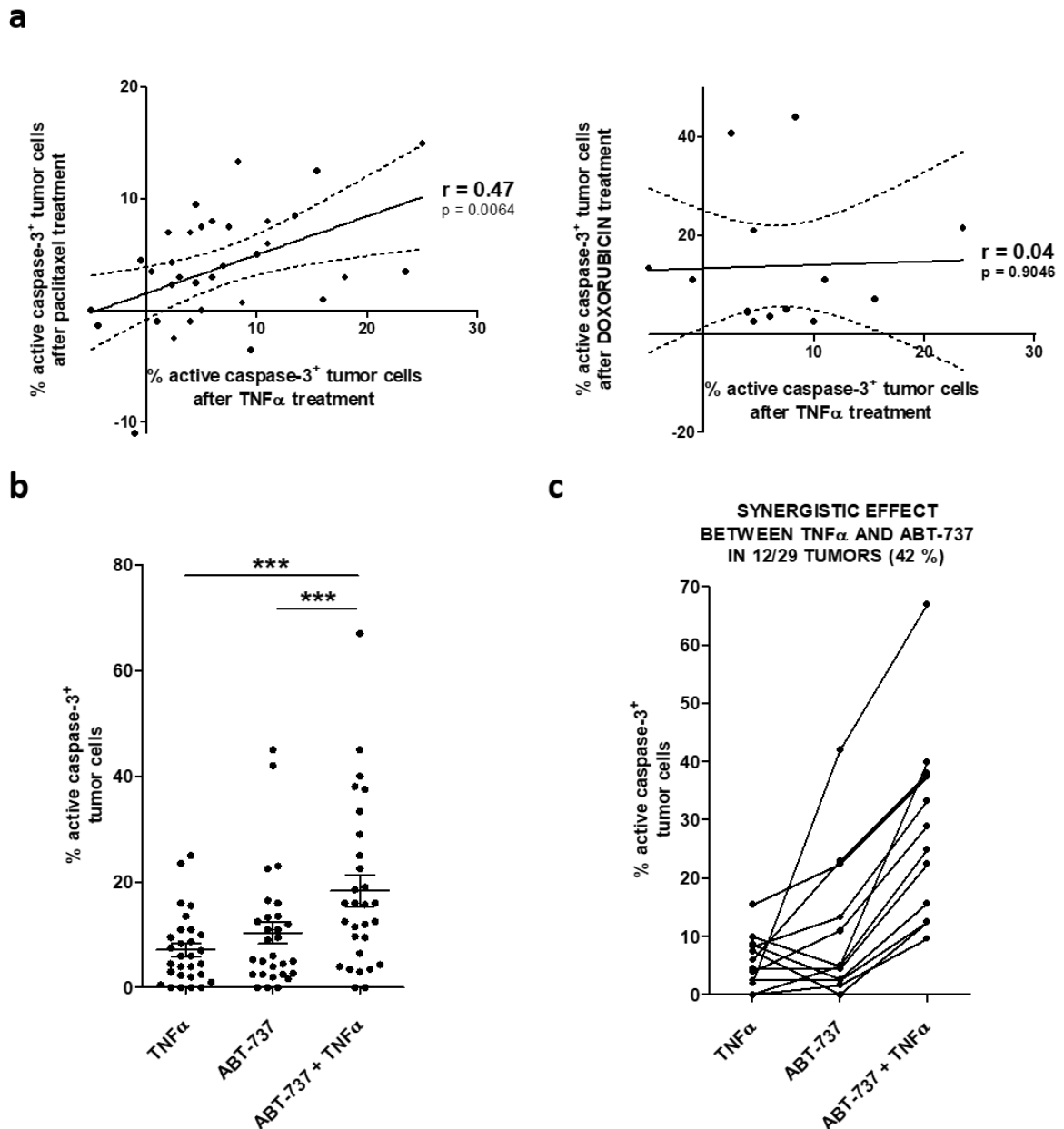


Figure 45 : corrélation entre les sensibilités *ex vivo* au TNF α et au paclitaxel.

a. Index apoptotique de 33 (panel de gauche) et 14 (panel de droite) tumeurs mammaires après 48h de traitement *ex vivo* par du paclitaxel et du TNF α séparément (gauche) ou par de la doxorubicine et du TNF α séparément (droite). **b.** Index apoptotique de 29 tumeurs mammaires après 48h de traitement *ex vivo* par du TNF α et de l'ABT-737 séparément et en combinaison. **c.** Index apoptotique des 12 tumeurs mammaires issues de la cohorte figurant en (b) ayant présenté une réponse apoptotique synergique avec la combinaison TNF α et ABT-737 (index apoptotique supérieur à la somme des index apoptotiques résultant des traitements séparés). Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; test de Pearson (a) et *t*-test bilatéral pairé (b). Les symboles correspondent à une p-value inférieure ***0.001.

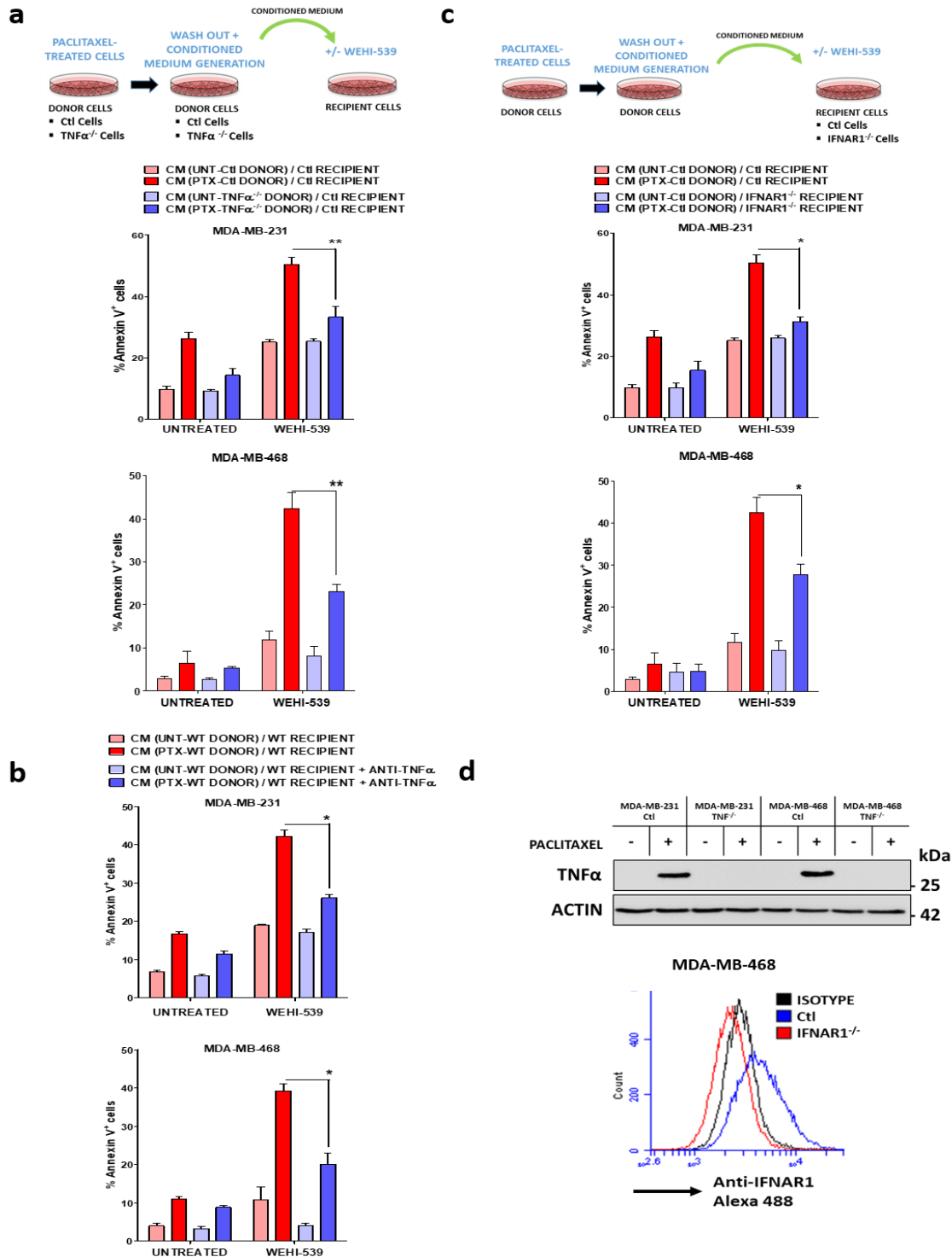


Figure 46 : l'augmentation paracrine du priming dépend de la sécrétion de TNFα et d'IFN-I par les cellules donneuses.

a. Des cellules Ctl ou TNFα^{-/-} traitées 24h par du paclitaxel (donneuses) ont été lavées pour conditionner pendant 48h un milieu appliqué sur des cellules correspondantes (receveuses) pendant 48h en présence ou non de WEHI-539. La mort cellulaire des cellules receveuses a été évaluée par marquage à l'Annexine-V. **b.** Des cellules traitées 24h par du paclitaxel (donneuses) ont été lavées pour conditionner pendant 48h un milieu appliqué sur des cellules correspondantes (receveuses) pendant 48h en présence ou non de WEHI-539 et d'un anticorps neutralisant le TNFα. **c.** Des cellules traitées 24h par du paclitaxel (donneuses) ont été lavées pour conditionner pendant 48h un milieu appliqué sur des cellules correspondantes Ctl ou IFNAR1^{-/-} (receveuses) pendant 48h en présence ou non de WEHI-539. **D.** Validation par immunoblot de lignées cellulaires générées par la technique CRISPR-Cas9 : analyse par immunoblot de cellules Ctl et TNFα^{-/-} traitées 24h par du paclitaxel puis incubées 72h avec de la monensine ; analyse par cytométrie en flux de cellules Ctl et IFNAR1^{-/-} après marquage par un anticorps anti-IFNAR1. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05 et **0.01.

d. L'induction paracrine de NOXA dans les cellules receveuses dépend du TNF α et des IFN-I.

Etant donné le rôle du TNF α et des IFN-I dans l'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine, nous avons évalué leur contribution dans l'induction transcriptionnelle de NOXA. Nous avons donc analysé par immunoblot des cellules receveuses d'un milieu conditionné par des cellules Ctl ou TNF α ^{-/-} traitées par du paclitaxel et avons mis en évidence que l'induction de NOXA était dépendante du TNF α (**Fig. 47a**). Nous avons par la suite analysé des cellules receveuses Ctl ou IFNAR1^{-/-} soumises aux mêmes milieux conditionnés. Les résultats obtenus indiquent que l'induction de NOXA est également dépendante de la présence du récepteur IFNAR1 et donc de l'action des IFN-I (**Fig. 47b**). Ces résultats indiquent que le TNF α et les IFN-I agissent de concert pour augmenter le priming apoptotique en induisant NOXA.

e. La combinaison des protéines recombinantes TNF α /IFN-I induit l'expression de NOXA.

Nous nous sommes alors demandé si ces cytokines induisaient NOXA seulement dans le contexte d'un milieu conditionné par des cellules traitées par du paclitaxel, c'est-à-dire de manière dépendante d'autres facteurs solubles, ou si elles se suffisaient à elles-mêmes. Nous avons donc traitées des cellules avec du TNF α et de l'IFN- α recombinants. Les analyses par immunoblot et qPCR des cellules traitées confirment l'induction de NOXA par la combinaison de cytokines. Dans les cellules MDA-MB-231, nous avons constaté que le TNF α seul induit NOXA, cette induction étant renforcée par l'addition de l'IFN α (**Fig. 48**). L'analyse d'autres protéines de la famille BCL-2 a également mis en évidence l'induction de BIM par ces cytokines.

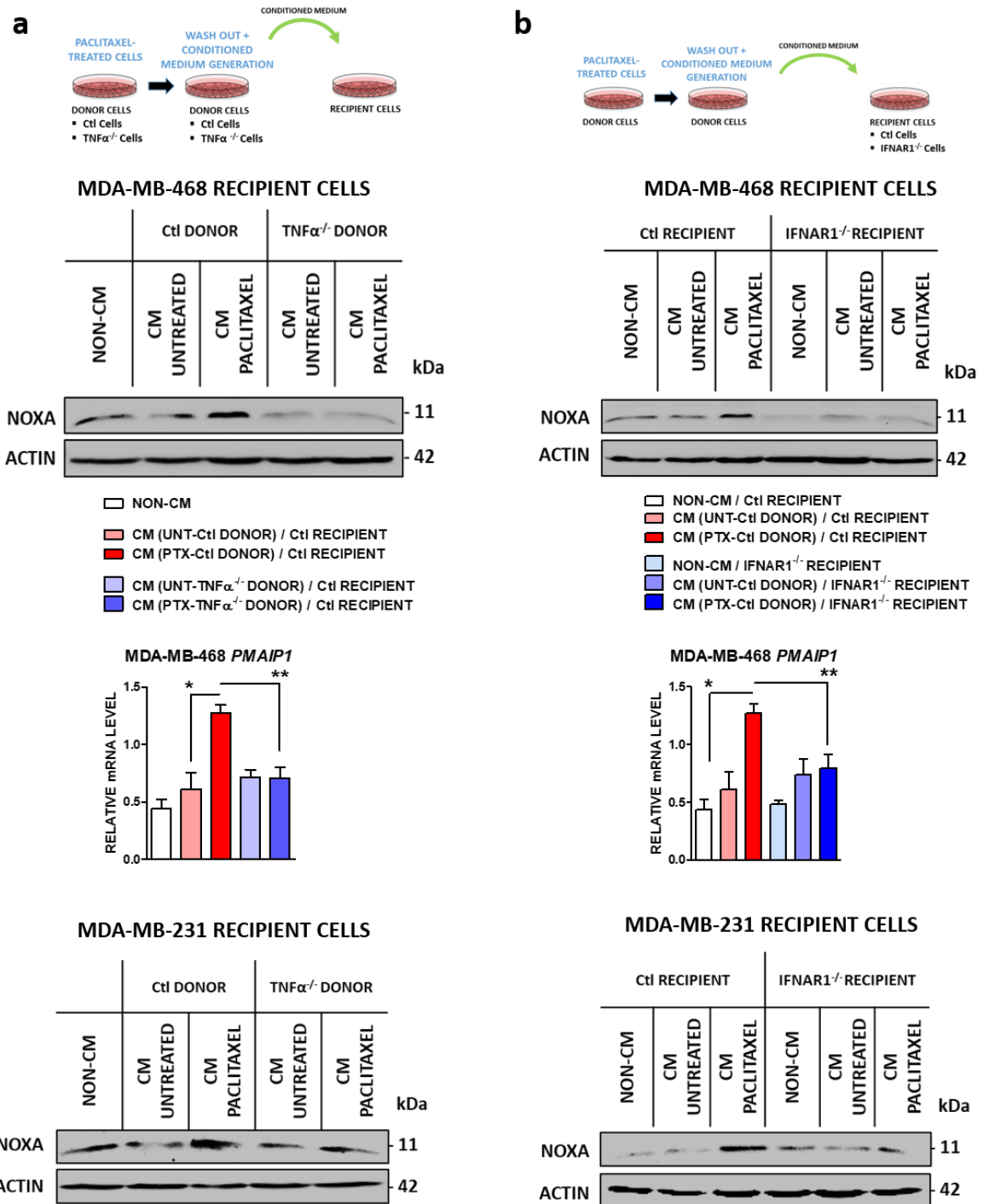


Figure 47 : l'induction paracrine de NOXA dans les cellules receveuses dépend du TNF α et des IFN-I.

a. Analyse par immunoblot et qPCR (seulement pour la lignée cellulaire MDA-MB-468) de cellules ayant été incubées 48h avec un milieu conditionné pendant 48h par des cellules correspondantes CtI ou TNF $\alpha^{-/-}$ prétraitées 24h par du paclitaxel. **b.** Analyse par immunoblot et qPCR (seulement pour la lignée cellulaire MDA-MB-468) de cellules CtI ou IFNAR1 $^{-/-}$ ayant été incubées 48h avec un milieu conditionné pendant 48h par des cellules correspondantes prétraitées 24h par du paclitaxel. Barre d'erreur : moyenne \pm SEM ; t-test bilatéral pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05 et **0.01.

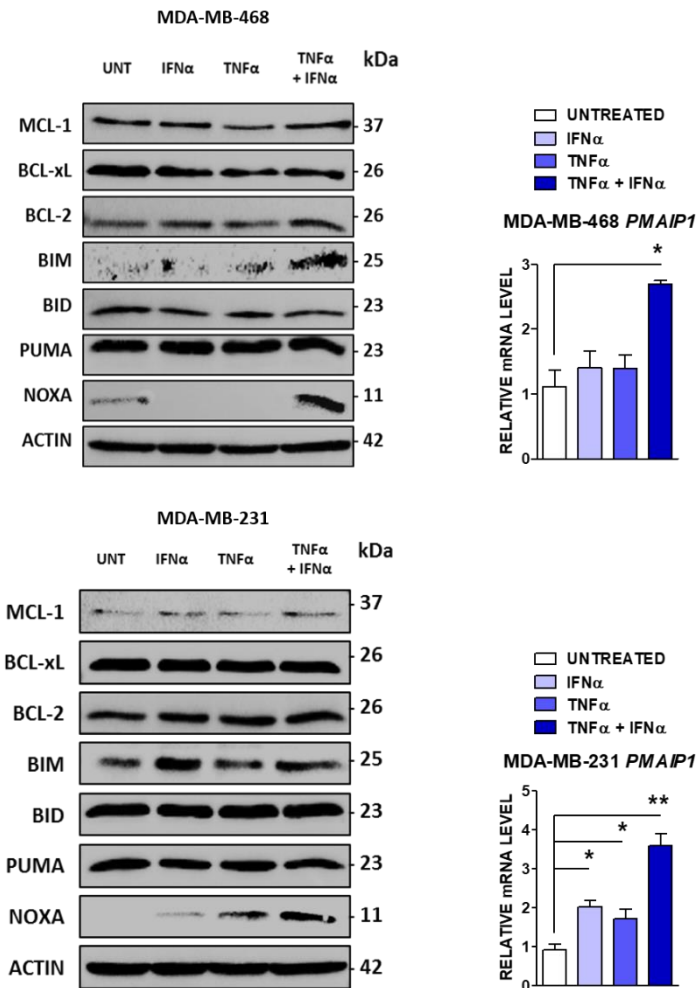


Figure 48 : la combinaison des protéines recombinantes TNF α /IFN α induit l'expression de NOXA.

Analyse par immunoblot et qPCR de cellules traitées pendant 48h par TNF α et IFN α . Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05 et **0.01.

f. L'augmentation du priming apoptotique induite par la combinaison TNF α /IFN-I est dépendante de NOXA.

Par la suite nous avons confirmé que la combinaison TNF α /IFN-I, en entraînant une augmentation du priming apoptotique, induisait une sensibilisation au WEHI-539. Dans les cellules MDA-MB-468, tandis que l'IFN α n'a que peu d'effet seul avec le WEHI-539, il potentialise le priming induit par le TNF α faisant passer de 25 à 55 le pourcentage de cellules en apoptose lors de l'ajout du WEHI-539 (Fig. 49a). Nous avons traité de la même façon une batterie de lignées cellulaires dérivées des cellules MDA-MB-468, KO pour les gènes codant pour une ou plusieurs protéines par CRISPR-Cas9. Nous avons ainsi confirmé que l'augmentation du priming induite par le duo de cytokine était dépendante de NOXA. L'induction d'une apoptose dans les cellules BCL-xL^{-/-} mais pas dans les cellules MCL-1^{-/-} confirmant que l'induction de NOXA érode les propriétés anti-apoptotiques de MCL-1 rendant les cellules dépendantes de BCL-xL pour leur survie (Fig. 49a). Nous avons confirmé la dépendance à NOXA du priming induit par les cytokines dans des lignées cellulaires dérivées

des MDA-MB-231 (**Fig. 49b**). Ces données démontrent que le TNF α augmente le priming apoptotique de façon paracrine en induisant l'expression de NOXA, cet effet étant potentialisé par les IFN-I.

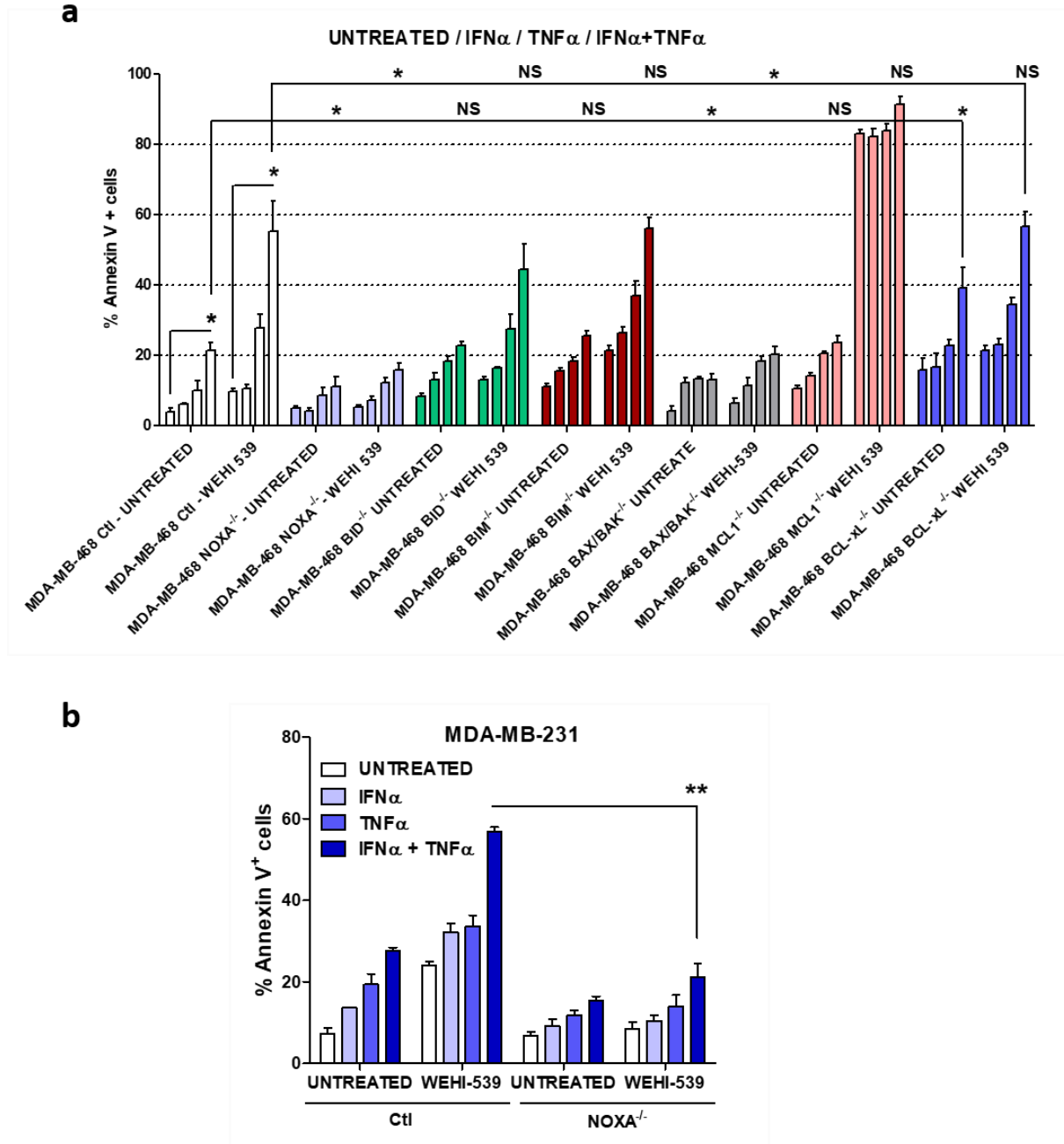


Figure 49 : l'augmentation du priming induite par la combinaison TNF α /IFN-I est dépendante de NOXA.

a, b. Analyse de la mort cellulaire des lignées MDA-MB-468 Ctl, NOXA^{-/-}, BID^{-/-}, BIM^{-/-}, BAX^{-/-} BAK^{-/-}, MCL-1^{-/-} et BCL-xL^{-/-} (a, les histogrammes correspondent de gauche à droite aux conditions UNTREATED, IFN α , TNF α et IFN α +TNF α) et des lignées MDA-MB-231 Ctl et NOXA^{-/-} (b) traitées 48h par la combinaison TNF α et IFN α associée ou non au WEHI-539. Barre d'erreur : moyenne \pm SEM ; t-test bilatéral pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05 et **0.01. NS : non significatif.

g. La sensibilité au paclitaxel *in vivo* est dépendante du TNF α .

Enfin, nous avons démontré *in vivo* que la perte de sensibilité au paclitaxel des tumeurs STING^{-/-} était liée à l'absence d'augmentation paracrine du priming apoptotique. Etant donnée le rôle majeur du TNF α dans le priming paracrine induit par l'antimitotique, nous avons réalisé des xénogreffes de cellules MDA-MB-231 Ctl et TNF α ^{-/-} et les avons traitées au paclitaxel comme indiqué (Fig. 50). L'absence complète de sensibilité au traitement des tumeurs TNF α ^{-/-} confirme le rôle majeur de l'augmentation du priming paracrine après traitement par du paclitaxel.

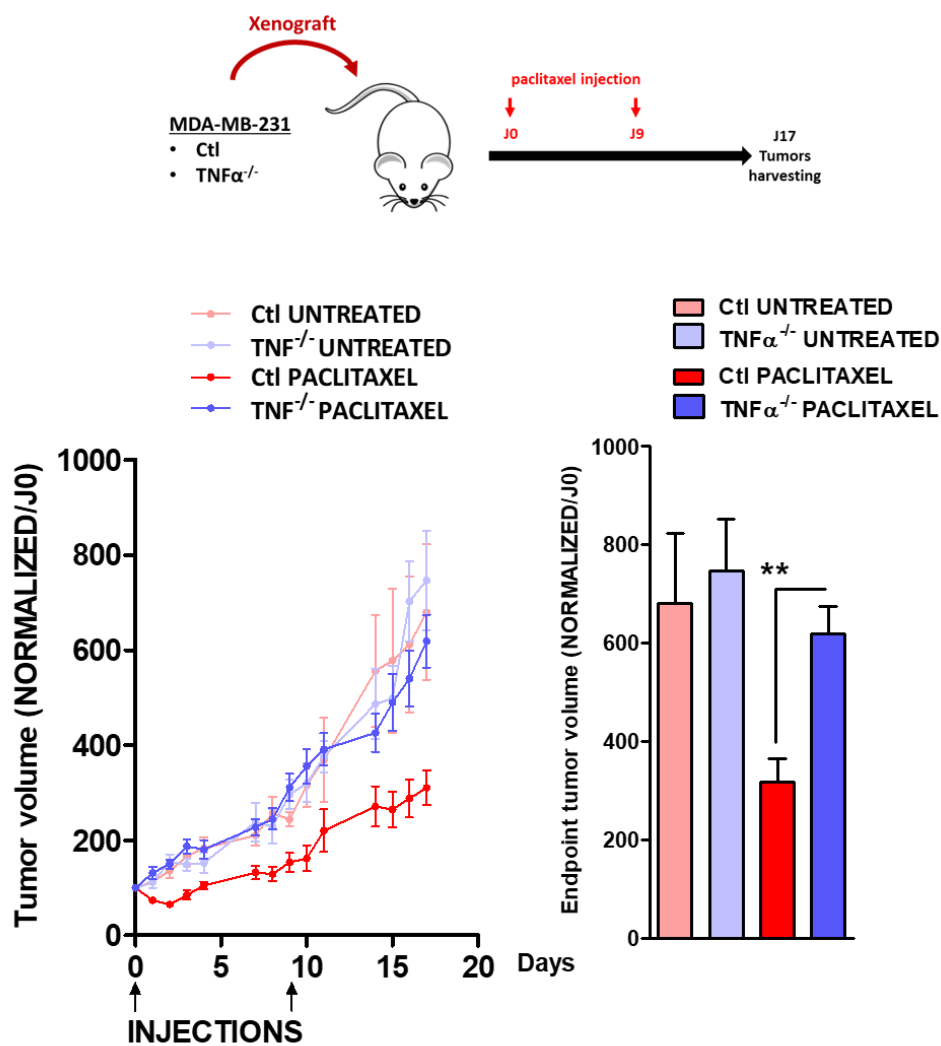


Figure 50 : la sensibilité au paclitaxel *in vivo* est dépendante du TNF α .

Xénogreffes orthotopiques de cellules MDA-MB-231 Ctl et TNF α ^{-/-} traitées par du paclitaxel (10 mg/Kg en intrapéritonéal) comme indiqué. N = 7 souris par groupe. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral non pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à **0.01.

7. Un traitement paclitaxel/ABT-263 différé permet de mieux exploiter l'augmentation du priming apoptotique dépendante de STING.

Nos résultats nous ont conduits à évaluer l'effet *in vivo* d'un BH3 mimétique ciblant BCL-xL associé au paclitaxel. Nous avons démontré que les cellules subissant un stress mitotique par le paclitaxel deviennent dépendantes de BCL-xL pour leur survie. De plus, ces cellules ont la capacité de propager au sein de la tumeur une augmentation du priming apoptotique rendant les cellules avoisinantes également dépendantes de BCL-xL. Nous nous sommes alors demandé si l'augmentation du priming de manière paracrine, que nous savons prépondérante dans l'effet *in vivo* du paclitaxel, était mieux exploitée par l'addition d'un BH3 mimétique de façon séquentielle par rapport au paclitaxel. L'idée, ici, est de laisser les cellules cancéreuses rendues aneuploïdes par le paclitaxel vivre assez longtemps pour propager une augmentation du priming apoptotique. Nous avons donc réalisé des xénogreffes de cellules MDA-MB-231 Ctl ou STING^{-/-} et nous les avons traitées suivant deux protocoles : un protocole #1 où l'ABT-263, BH3 mimétique utilisable par voie orale ciblant BCL-2 et BCL-xL, est utilisé simultanément au paclitaxel ; et un protocole #2 où l'ABT-263 est utilisé de façon décalée par rapport au paclitaxel (**Fig 51**). Seul le protocole #2, correspondant aux traitements décalés, permet d'améliorer les effets du paclitaxel. Parmi les xénogreffes STING^{-/-}, aucune sensibilité ne fut détectée démontrant que la sensibilisation au BH3 mimétique, *in vivo*, est dépendante de l'augmentation du priming apoptotique de façon paracrine médiée par l'activation de la voie cGAS/STING.

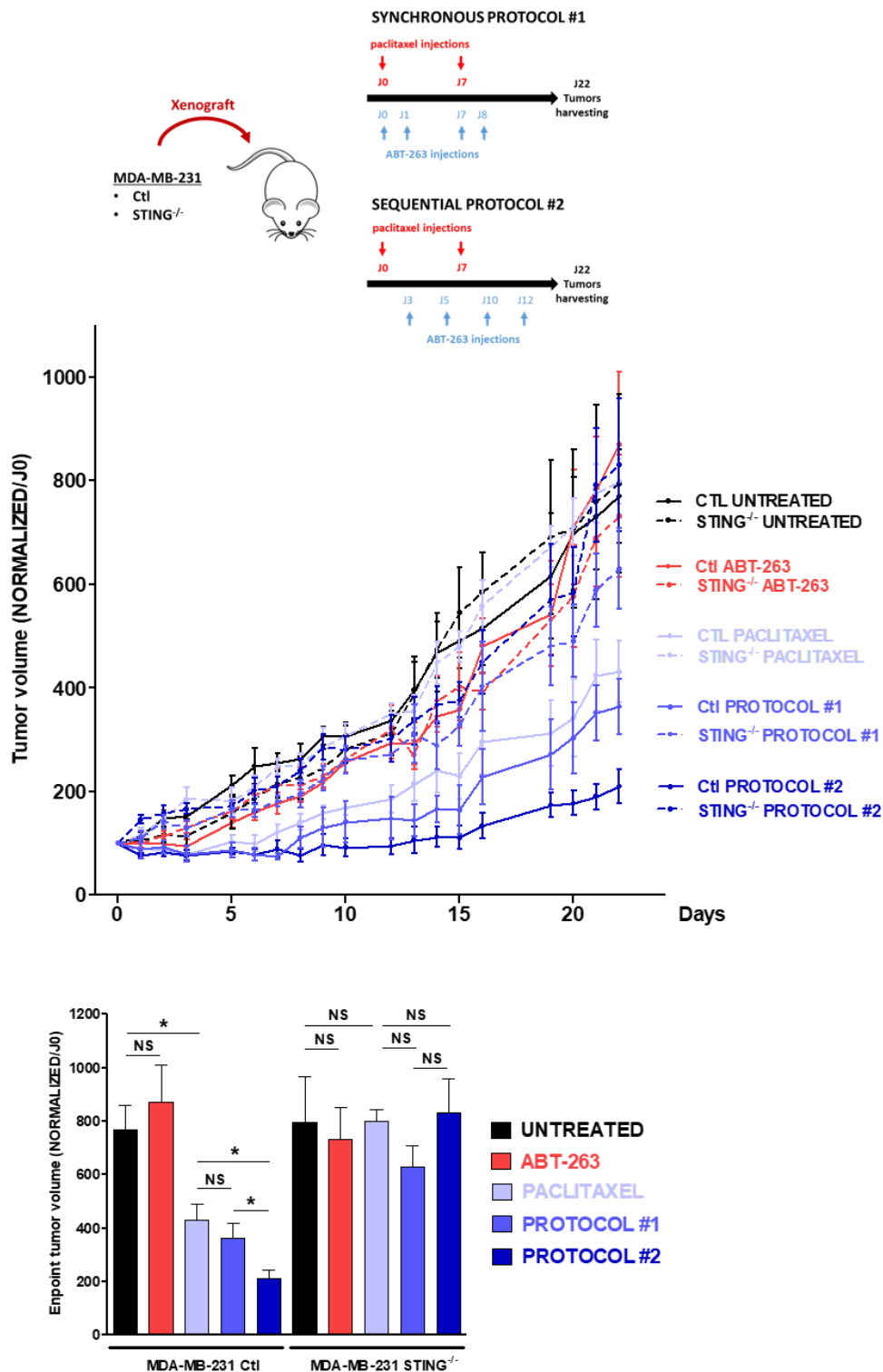


Figure 51 : un traitement paclitaxel/ABT-263 différé permet de mieux exploité l'augmentation paracrine du priming dépendant de STING.

a. Xéno greffes orthotopiques de cellules MDA-MB-231 Ctl et STING^{-/-} traitées par du paclitaxel (10 mg/Kg en intrapéritonéal) permettant d'étudier l'efficacité antitumorale de 2 protocoles différents de traitement par l'ABT-263 (100 mg/Kg en intrapéritonéal) comme indiqué sur le schéma. N = 5 souris par groupe. Barre d'erreur : moyenne +/- SEM ; t-test bilatéral non pairé. Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.01. NS : non significatif.

V. Discussion

1. Réponse apoptotique des cellules cancéreuses mammaires suite à un stress mitotique.

a. La majorité des cellules cancéreuses cyclantes échappe à l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel

Afin de maintenir l'intégrité du génome lors de la mitose, la cellule possède un mécanisme onco-suppressif intégré dans son code génétique, le point de contrôle mitotique ou SAC, qui garantit le bon déroulement de la division cellulaire. Il est activé par l'absence de liaison ou par une liaison trop lâche des microtubules aux kinétochores lors de la métaphase (Hwang et al., 1998; Li and Murray, 1991; Sudakin et al., 1995, 2001). Le paclitaxel, agent prévenant la dépolymérisation des microtubules et donc les empêchant d'exercer une tension adéquate, entraîne l'activation de ce point de contrôle. Il a été démontré par plusieurs équipes que l'activation de ce point de contrôle favorisait la survenue d'une apoptose par déclenchement de la MOMP. Dans un contexte de matériel génétique condensé et donc avec une activité transcriptionnelle réduite, l'activation du SAC entraîne l'érosion des signaux anti-apoptotiques via des modifications post-traductionnelles (Bah et al., 2014; Bekier et al., 2009; Gascoigne and Taylor, 2008; Haschka et al., 2015; Topham et al., 2015). En accord avec plusieurs études, nos travaux démontrent cependant que peu de cellules entrent en apoptose pendant l'arrêt mitotique (Bah et al., 2014; Gascoigne and Taylor, 2008). En effet, les cellules cancéreuses possèdent deux mécanismes anti-apoptotiques majeurs leur permettant de survivre à l'arrêt mitotique : la surexpression de la protéine anti-apoptotique BCL-xL et un point de contrôle mitotique moins robuste que les cellules normales permettant leur échappement à l'arrêt mitotique.

Plusieurs études ont en effet démontré que BCL-xL représente le principal frein au déclenchement de la MOMP lors de l'arrêt mitotique (Bah et al., 2014; Bennett et al., 2016; Shi et al., 2011). Les cellules deviennent ainsi dépendantes de cette protéine pour leur survie

et, par conséquent, sensibles à des BH3 mimétiques ciblant BCL-xL. Les lignées cellulaires cancéreuses ne possédant pas toutes des niveaux équivalents de BCL-xL, certaines sont plus promptes à déclencher une apoptose lors d'un blocage en mitose.

Le second mécanisme est la capacité des cellules à échapper à l'arrêt mitotique induit par les antimitotiques activant le SAC, et ce, en quelques heures après le début du blocage. Cette sortie de mitose se fait au prix d'une forte aneuploïdie (Cahill et al., 1998; Iwanaga et al., 2007).

Etant donné la prépondérance de cellules échappant à l'arrêt mitotique après un traitement par du paclitaxel, nous avons étudié le devenir de ces cellules devenues aneuploïdes. Afin de mimer une exposition *in vivo* des cellules aux agents anticancéreux, nous avons effectué des traitements de 24h puis retiré la drogue. Les marquages anti-MPM2 indiquent que 48h après un traitement de 24h, la majorité des cellules cancéreuses testées a échappé à l'arrêt mitotique. Nous avons donc choisi d'étudier les cellules principalement à ce temps. De plus, nous avons comparé les effets du paclitaxel à deux autres antimitotiques ayant des mécanismes d'action différents permettant ainsi de distinguer les effets de l'arrêt mitotique transitoire des effets dus à l'état d'aneuploïdie : la gédunine entraînant un arrêt mitotique sans échappement propriété découverte par notre équipe lors de travaux sur une molécule analogue ayant des propriétés antimitotiques similaires (Dioum et al., 2016) et l'AZD1152 générant des cellules aneuploïdes sans induction d'un arrêt mitotique. Nous avons alors constaté à l'aide d'un suivi sur plusieurs jours que des cellules exposées à 24h de gédunine présentaient une réponse apoptotique brève, les cellules, une fois la drogue enlevée, se remettant à proliférer. Au contraire, les cellules traitées par du paclitaxel ou de l'AZD1152 présentaient une réponse apoptotique durable qui augmentent avec le temps, les cellules devenant de plus non proliférantes. Ces résultats suggèrent qu'un échappement à l'arrêt mitotique condamne les cellules à entrer en apoptose parfois plusieurs jours après le retrait de la drogue.

b. Déclenchement d'une réponse apoptotique dans les cellules aneuploïdes.

Nos travaux démontrent que les cellules aneuploïdes, générées après un arrêt mitotique ou par absence de cytokinèse, sont dépendantes de la protéine BCL-xL pour leur survie. Ceci est

en accord avec des travaux de (Shah et al., 2010), qui par l'intermédiaire d'un screening de molécules, a mis en évidence que les cellules exposées à l'AZD1152 devenaient sensibles à l'ABT-263, un BH3 mimétique ciblant BCL-2 et BCL-xL. Une étude des variations de protéines de la famille BCL-2 indique une induction du BH3-only NOXA dans les cellules aneuploïdes. Cette induction de NOXA après traitement antimitotique a été montrée par plusieurs équipes (Bates et al., 2013; Shah et al., 2010; Zall et al., 2010). Via l'utilisation de lignées cellulaires NOXA^{-/-} générées par CRISPR-Cas9, nous avons démontré son rôle majeur dans la mort des cellules aneuploïdes et dans leur dépendance à BCL-xL. NOXA a pour fonction d'antagoniser les fonctions anti-apoptotiques de MCL-1 en se fixant dans sa poche hydrophobe, libérant potentiellement d'autres protéines BH3-only ou des protéines effectrices BAX ou BAK jusqu'alors séquestrées. Ces effecteurs pourront alors soit être tamponnés par d'autres protéines anti-apoptotiques telles que BCL-xL, rendant les cellules dépendantes de cette protéine, soit déclencher une MOMP et donc l'apoptose. L'importante sensibilité des cellules MCL-1^{-/-}, par rapport à la lignée contrôle, à un traitement inhibant BCL-xL indique que les cellules utilisées dans nos travaux ont, dans des conditions basales, deux principaux freins à l'apoptose MCL-1 et BCL-xL. Bien qu'exprimé dans nos modèles, BCL-2 ne semble pas jouer un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la MOM.

D'après nos connaissances, aucun travail n'a permis de comprendre les processus cellulaires à l'origine de l'induction de NOXA dans des cellules aneuploïdes. L'équipe de Martin Hetzer a montré que la rupture des enveloppes des micronoyaux précédait la survenue de dommages au niveau de l'ADN jusqu'alors contenu (Hatch et al., 2013). Les cellules aneuploïdes étant caractérisées par un nombre important de micronoyaux, nous avons émis l'hypothèse que l'induction de NOXA pouvait résulter du déclenchement d'un processus apoptotique suite à la rupture des enveloppes micronucléaires. Pour incriminer les micronoyaux comme étant à l'origine de l'induction de NOXA, nous nous sommes appuyés sur les travaux de (Hatch et al., 2013) ayant démontré que la rupture spontanée des micronoyaux résultait d'une déficience en LMNB1. Dans plusieurs travaux, les auteurs ont par conséquent réussi à renforcer les enveloppes micronucléaires en surexprimant la LMNB2 (Bakhom et al., 2018; Hatch et al., 2013) dont les fonctions chevauchent celles de la LMNB1. Dans nos travaux, la prévention de l'induction de NOXA dans des cellules LMNB2 appuie cette hypothèse. Il reste cependant à confirmer ce résultat par d'autres expériences, l'absence d'induction de NOXA pouvant être

simplement due à l'impossibilité pour certains facteurs de transcription d'accéder au noyau du fait d'une surexpression en LMNB2. La suite de nos travaux nous a conduits à étudier le rôle de la voie cGAS/STING dans les effets anti-tumoraux des antimétoproloides. Cette voie, que nous savons activée après rupture de l'enveloppe micronucléaire, a été décrite comme pouvant être à l'origine de l'induction de NOXA dans des lymphocytes (Gulen et al., 2017). L'induction de NOXA étant toujours détectable dans des cellules STING^{-/-} traitées au paclitaxel, l'induction de NOXA semble être le résultat de la rupture de l'enveloppe micronucléaire tout en étant indépendante de l'activation de la voie cGAS/STING. D'autres travaux suggèrent également que la cytotoxicité du paclitaxel serait fonction du taux de multinucléation post échappement (Huang et al., 2011; Zhu et al., 2014).

Nos résultats indiquent que cette induction est indépendante de P53, car ayant également lieu dans des cellules ayant une perte de fonction de la protéine par mutation. Les travaux de (Dar et al., 2008) ont démontré que l'induction de NOXA dans les cellules traitées par des inhibiteurs d'AURKB était dépendante de P73. Cependant, aucune des pistes que nous avons étudiées, telles que l'implication des facteurs de transcription P73, E2F1 et ATF4, connus pour induire la transcription de NOXA, ne se sont révélées concluantes (données non montrées).

L'ensemble de ces résultats démontre que les cellules devenues aneuploïdes suite à l'échappement à l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel déclenchent des processus apoptotiques principalement via l'induction transcriptionnelle de NOXA. L'échappement, s'il représente à court terme un mécanisme de résistance promouvant la survie des cellules cancéreuses à l'arrêt mitotique, permet à long terme de prolonger les effets anti-tumoraux d'un antimétoproloide bien au-delà de son temps d'exposition. Ceci peut expliquer les résultats de plusieurs études démontrant que le statut du point de contrôle mitotique, robuste à l'origine d'une mort mitotique importante ou faible entraînant un échappement massif, n'affecte en rien la sensibilité au paclitaxel (Rieder and Maiato, 2004; Ryan et al., 2012; Weaver and Cleveland, 2005; Yamada and Gorbisky, 2006).

2. Diffusion paracrine de signaux pro-apoptotiques par les cellules ayant subi un stress mitotique.

a. Effets cytotoxiques du paclitaxel : l'arrêt mitotique comme unique réponse ?

Les mécanismes anti-tumoraux des antimitotiques, impactant uniquement la sous-population de cellules proliférantes lors de l'exposition à la drogue, restent à élucider. Plusieurs observations nous ont laissé penser que l'arrêt mitotique induit n'était peut-être pas la seule réponse. Premièrement, les données issues du modèle d'étude *ex vivo* mis en place par le laboratoire indiquent que la prolifération tumorale ne permet pas de prédire la sensibilité au paclitaxel. De plus, aucune corrélation entre la sensibilité au paclitaxel et la prolifération de la tumeur ne fut mise en évidence, des tumeurs peu proliférantes pouvant déclencher une apoptose massive et inversement. Enfin, aucune augmentation de l'index mitotique ne fut détectée dans les tranches tumorales traitées *ex vivo* au paclitaxel (données non montrées). L'hypothèse que la cytotoxicité du paclitaxel pourrait être expliquée par d'autres événements que l'induction d'un arrêt mitotique avait été suggérée par plusieurs chercheurs arguant d'un trop faible nombre de cellules passant en mitose pendant l'exposition au paclitaxel (Komlodi-Pasztor et al., 2011, 2012; Mitchison, 2012). Cette hypothèse est de plus alimentée par différents résultats. Dans les travaux de (Zasadil et al., 2014), bien que le paclitaxel engendra une régression tumorale importante, aucune augmentation de l'index mitotique ne fut décelée dans des biopsies de cancers du sein réalisées chez des patientes 20h après l'injection. Dans cette étude, les auteurs ont par ailleurs montré une intéressante corrélation entre la réduction du volume tumoral et l'induction par le paclitaxel de cellules aneuploïdes par mauvaise ségrégation des chromosomes. De façon similaire, malgré la présence de microtubules stabilisés, aucun arrêt mitotique ne fut détecté dans quatre biopsies de cancer du sein 24h après un traitement par de l'ixabepilone, un autre inhibiteur de la dynamique des microtubules (Komlodi-Pasztor et al., 2011). Enfin, utilisant une technique d'imagerie par microscopie *in vivo*, Orth et al. ont mis en évidence que l'induction d'un arrêt mitotique par le paclitaxel était considérablement plus faible *in vivo* que *in vitro*, entraînant pourtant une régression tumorale de 80 % deux semaines après l'injection. De plus, les auteurs ont constaté que, *in vivo*, les cellules dont la mitose était impactée par l'antimitotique survivaient très

longtemps après échappement à l'arrêt mitotique et devenaient multinucléées, représentant environ 15 % des cellules cancéreuses une semaine après le traitement (Orth et al., 2011).

Par ailleurs, nous avons constaté que seules les tumeurs possédant des cellules primées pour l'apoptose, c'est-à-dire sensibles à l'ABT-737, présentaient une sensibilité au paclitaxel après 48h de traitement. Il semble donc que le priming apoptotique des cellules cancéreuses soit nécessaire mais insuffisant pour être sensible au paclitaxel puisque 28 % des tumeurs étaient sensibles à l'ABT-737 tout en étant résistantes au paclitaxel. Nous nous sommes alors demandé si le paclitaxel, en perturbant la dynamique des microtubules, pouvait déclencher une apoptose dans les cellules cancéreuses les plus primées pour l'apoptose même non proliférantes. En accord avec de précédentes études (Baguley et al., 1995; Gascoigne and Taylor, 2008), l'absence d'effet de l'antimitotique sur des cellules non proliférantes bien que primées pour l'apoptose par privation de sérum, infirme cette hypothèse.

Face à l'ensemble de ces données, nous avons fait l'hypothèse que les cellules directement impactées par le paclitaxel pouvaient augmenter le priming apoptotique de l'ensemble de la population cellulaire entraînant ainsi le déclenchement précoce de l'apoptose des cellules cancéreuses les plus primées.

b. Les cellules échappant à l'arrêt mitotique augmentent le priming apoptotique de façon paracrine via l'activation de la voie cGAS/STING.

Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié les effets de milieux conditionnés par des cellules traitées au paclitaxel. Nos travaux mettent en évidence la capacité de ces cellules à augmenter le priming apoptotique de façon paracrine. Nous démontrons de plus que cet effet est généré par les cellules aneuploïdes obtenues soit suite à un échappement à l'arrêt mitotique soit par blocage de la cytokinèse.

De récents travaux ont mis en évidence que les micronoyaux, structures possédant des enveloppes nucléaires fragiles se rompant spontanément, induisaient un phénotype pro-inflammatoire de la cellule (Harding et al., 2017; Mackenzie et al., 2017). En effet, suite à la rupture de l'enveloppe nucléaire, l'ADN, jusqu'alors contenu dans le micronoyau, est reconnu par le senseur de l'ADN cytosolique cGAS qui par l'intermédiaire de STING, déclenche la

synthèse de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN-I. Les cellules aneuploïdes étant caractérisées par la présence de nombreux micronoyaux, nous nous sommes demandé si l'induction d'un sécrétome pro-inflammatoire dans les cellules traitées au paclitaxel pouvait être responsable de l'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine. Pour tester cette hypothèse, nous avons généré des lignées cellulaires *STING*^{-/-} par la technique CRISPR-Cas9 et avons mis en évidence que l'augmentation du priming apoptotique de façon paracrine par les cellules traitées par du paclitaxel dépendait de la présence de cette protéine dans les cellules donneuses. Pour incriminer les micronoyaux comme étant à l'origine de l'activation de cGAS, nous avons utilisé les lignées cellulaires LMNB2 et avons mis en évidence une diminution significative du nombre de micronoyaux cGAS⁺ associée à une réduction de l'effet paracrine des milieux conditionnés par ces cellules par rapport aux cellules Ctl. Plusieurs travaux ont mis en évidence que cGAS pouvait également être activé par de l'ADN mitochondrial (Rongvaux et al., 2014; White et al., 2014). La présence de cet ADN dans le compartiment cytosolique résultait de sa sortie par les pores formés par l'oligomérisation de BAX et/ou BAK lors de la MOMP (McArthur et al., 2018; Riley et al., 2018). Récemment, l'équipe de Richard Youle a également démontré qu'une déficience en mitophagie, entraînant l'accumulation de mitochondries défectueuses, permettait la libération d'ADN mitochondrial au niveau cytosolique et l'activation de cGAS (Sliter et al., 2018). Afin d'identifier une éventuelle contribution de l'ADN mitochondrial dans l'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine nous avons généré des cellules appelées $\rho 0$ déplétées en ADN mitochondrial. Nous n'avons pu mettre en évidence de contribution de cet ADN dans l'effet paracrine suggérant que ce dernier est uniquement le résultat de la rupture des enveloppes micronucléaires.

De façon très intéressante, aucune différence de sensibilité au paclitaxel ne fut mise en évidence entre les lignées cellulaires Ctl et *STING*^{-/-}, celles-ci pouvant toutes deux induire la protéine NOXA après échappement à l'arrêt mitotique. En revanche, ces mêmes cellules prétraitées par du paclitaxel avaient des effets différents sur des cellules non traitées mises en co-culture. Confirmant nos précédents résultats, les cellules *STING*^{-/-} avaient un impact nettement moindre sur le priming apoptotique des cellules non traitées. Ces résultats démontrent que l'effet paracrine est visible lorsque deux populations de cellules co-existent : des cellules subissant un stress mitotique produisant un sécrétome pro-apoptotique et des

cellules non directement impactées par le paclitaxel sur lesquelles pourra s'exercer l'effet paracrine. La perte totale de l'effet anti-tumoral du paclitaxel dans des tumeurs STING^{-/-} démontre que les effets du paclitaxel ne sont pas seulement le résultat d'un stress mitotique induit dans les cellules passant en mitose lors du traitement mais également les conséquences de l'augmentation du priming apoptotique de façon paracrine par les cellules aneuploïdes sur l'ensemble de la population cellulaire de la tumeur. Une récente étude a mis en évidence que le phénotype sécrétoire des cellules sénescents (SASP) était dépendant de la voie cGAS/STING (Glück et al., 2017). De plus, ce phénotype est à l'origine d'une amplification de la sénescence via une induction paracrine de cet état caractérisé par un arrêt définitif de la prolifération cellulaire (Acosta et al., 2013). Etant donné que le sécrétome des cellules directement impactées par le paclitaxel s'apparente à un SASP, une induction paracrine de sénescence par ces cellules ne peut être exclue, plusieurs travaux ayant mis en évidence l'induction d'une sénescence par l'agent antimitotique (Demaria et al., 2017; Khongkow et al., 2016). Ainsi, la perte d'effet du paclitaxel sur des xénogreffes STING^{-/-} pourrait également être expliqué par l'absence de sénescence. Une analyse par IHC de la β -galactosidase, marqueur de sénescence, dans les xénogreffes de MDA-MB-231 serait un premier élément de réponse pour évaluer le rôle du processus de sénescence dans l'effet paracrine que nous observons.

c. L'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine repose sur l'induction de la protéine BH3-only NOXA dans les cellules receveuses.

L'analyse des xénogreffes de MDA-MB-231 Ctl et STING^{-/-} à J17 (soit 8 jour après la deuxième injection de paclitaxel) a tout d'abord montré le déclenchement par le paclitaxel d'un phénotype pro-inflammatoire fonctionnel dépendant de STING *in vivo*. Ensuite, l'évaluation de protéines de la famille BCL-2 a mis en évidence l'induction transcriptionnelle de NOXA, elle aussi dépendante de STING. Etant donné que l'induction de NOXA dans les cellules devenues aneuploïdes par un traitement antimitotique ne dépendait pas de STING, nous avons fait l'hypothèse que l'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine dans les cellules receveuses reposait sur l'induction de NOXA. Nous avons par conséquent analysé l'impact du milieu conditionné par des cellules traitées au paclitaxel sur les protéines de la

famille BCL-2 de cellules receveuses. Nous avons ainsi confirmé que le sécrétome déclenché par l'activation de la voie cGAS/STING dans des cellules traitées par du paclitaxel induisait NOXA, aucune autre variation de protéines de la famille BCL-2 n'ayant été détectée. Nos travaux mettent donc en évidence que le paclitaxel induit NOXA par deux mécanismes différents : un mécanisme indépendant de STING dans les cellules aneuploïdes et dépendant de STING par effet paracrine. La détection dans les xénogreffes d'un NOXA dépendant de STING confirme la contribution majeure de cette voie dans l'effet *in vivo* du paclitaxel.

Nos travaux démontrent le rôle majeur de NOXA dans la réponse apoptotique au paclitaxel. Plusieurs études ont également mis en évidence le déclenchement d'une apoptose dépendante de l'induction de NOXA suite à des traitements par différents agents anticancéreux tels que des agents antimitotique (Bates et al., 2013; Shah et al., 2010; Zall et al., 2010), des agents génotoxiques (Mei et al., 2007; Oda et al., 2000; Saha et al., 2013; Shibue et al., 2003), des inhibiteurs des HDAC (Histone DésACétylase) (Brinkmann et al., 2013; Fritsche et al., 2009; Inoue et al., 2007; Xargay-Torrent et al., 2011), des inhibiteurs du protéasomes (Brinkmann et al., 2013; Fernández et al., 2005; Nikiforov et al., 2007) ou des molécules entraînant un stress du réticulum endoplasmique (Armstrong et al., 2010; Gupta et al., 2012; Nadanaka et al., 2004; Verfaillie et al., 2013; Wang et al., 2008).

d. L'induction de NOXA est dépendante du TNF α et est amplifiée par les IFN-I.

Parmi les facteurs solubles présents dans le sécrétome de cellules aneuploïdes résultant de l'activation de la voie cGAS/STING, nous avons identifié le TNF α et les IFN-I comme étant responsables de l'induction transcriptionnelle paracrine de NOXA. Nos données suggèrent que ces cytokines agissent de façon synergique, les IFN-I amplifiant l'induction de NOXA par le TNF α . De récents travaux ont également démontré la coopération de ces cytokines pour déclencher une nécroptose sans toutefois comprendre les ressorts biologiques de cette synergie (Brault et al., 2018). En l'état actuel de nos travaux, nous ne connaissons pas les facteurs de transcription responsables de l'induction transcriptionnelle de NOXA dans nos modèles. Plusieurs travaux ont démontré que le facteur de transcription NF- κ B, activé par le TNF α , pouvait se fixer au promoteur de NOXA et induire son expression (Bu et al., 2016; Inta et al., 2006; Knowlton et al., 2012). De même, de nombreuses études ont mis en évidence que

les IFN-I pouvaient également entraîner l'induction de NOXA, notamment via les facteurs de transcription IRFs (Dal Col et al., 2012; Eitz Ferrer et al., 2011; Fuertes Marraco et al., 2011; Knowlton et al., 2012; Rosebeck et al., 2011; Sun and Leaman, 2005; Wang et al., 2016). Une récente étude a mis en évidence que les IFN-I, par modification épigénétique, pouvaient amplifier les effets transcriptionnels du TNF α (Park et al., 2017). Ceci pourrait expliquer les effets synergiques de ces cytokines sur l'induction de NOXA d'autant plus que des données du laboratoire mettent en évidence des changements importants de l'épigénome après traitement par du paclitaxel (données non montrées). Ainsi, une perspective intéressante de ce travail consiste à étudier de façon ciblée les changements épigénétiques de PMAIP1 après une exposition au paclitaxel. Il est possible que, dans d'autres fonds cellulaires, ces cytokines induisent un autre BH3-only que NOXA. En effet, des travaux ont démontré des actions pro-apoptotiques des IFN-I via l'induction du BH3-only BIM (Dal Col et al., 2012; Fuertes Marraco et al., 2011; Moore et al., 2012; Shi et al., 2016). En accord avec ceux-ci, nous avons constaté que l'IFN α induisait BIM dans la lignée cellulaire MDA-MB-231 et, de façon synergique avec le TNF α , dans les cellules MDA-MB-468, sans pour autant mettre en évidence d'induction par des milieux conditionnés par des cellules traitées par du paclitaxel.

Nous avons de plus constaté une corrélation entre les sensibilités au paclitaxel et au TNF α de tranches tumorales traitées *ex vivo*, corrélation qui ne fut pas retrouvée entre la doxorubicine, une chimiothérapie génotoxique, et le TNF α , suggérant que le mécanisme d'action paracrine serait spécifique des antimitotiques. Renforçant notre modèle dans lequel le paclitaxel exerce un effet paracrine via l'action du TNF α , les xénogreffes TNF $\alpha^{-/-}$ ne présentèrent aucune sensibilité *in vivo* à l'antimitotique. En accord avec nos résultats, plusieurs études avaient auparavant mis en évidence la production de TNF α par les cellules traitées par du paclitaxel ainsi que sa contribution à l'effet cytotoxique de la chimiothérapie (Lanni et al., 1997; Qi et al., 2018; Sprowl et al., 2012).

De nombreuses études attribuent également au TNF α des effets anti-apoptotiques via l'activation de NF- κ B et l'induction subséquente de protéines anti-apoptotiques (Chen et al., 2000; Grossmann et al., 2000; Grumont et al., 1999). Il est certain que le fond cellulaire a un rôle prépondérant dans ces effets contradictoires, certaines cellules tirant avantage d'une imprégnation par cette cytokine. De plus, il est probable que les conséquences d'une exposition soient différentes si celle-ci est aiguë ou chronique. Ces hypothèses amènent à une

intéressante perspective de ce travail : le secrétome déclenché par le paclitaxel est-il à l'origine d'une sélection de sous clones tumoraux présents dans la tumeur sur lesquels les cytokines auraient eu des effets anti-apoptotiques ? Cette hypothèse est de plus alimentée par l'observation d'une induction transcriptionnelle du TNFR2 dans tous les modèles de PDX de cancers du sein traités par du paclitaxel (données non montrées). L'expression du TNFR2 est-il un mécanisme d'adaptation permettant aux cellules cancéreuses qui l'exprime de tirer avantage de la présence du TNF α . Plusieurs études ont en effet corrélé l'expression de TNFR2 par les cellules cancéreuses à un stade avancé de la maladie et un mauvais pronostic (Cui et al., 2008; Dobrzycka et al., 2009; Vanamee and Faustman, 2017; Yang et al., 2017). De plus, TNFR2 induit une progression tumorale via l'activation de différentes voies de signalisation. Dans les cellules cancéreuses mammaires, TNFR2 protège les cellules cancéreuses des dommages à l'ADN via l'activation de la voie AKT et accélère la croissance tumorale via l'activation des voies NF κ B et MAPK (Rivas et al., 2008). Enfin, la délétion de TNFR2 dans des modèles de xéno greffe de cancer des poumons induit une diminution importante de la croissance (Sasi et al., 2014).

Afin de répondre à cette question, nous avons envisagé de générer, au sein des cellules Ctl et STING^{-/-}, deux populations exprimant soit la protéine H2B-GFP soit la protéine H2B-RFP conjointement à une invalidation du gène codant pour le TNFR2 par CRISPR-Cas9. Une xéno greffe de ces deux populations cellulaires aux fluorescences distinctes avec un rapport 1 : 1 permet leur suivi avant et après traitement paclitaxel. Un enrichissement de la population GFP, visible dans les xéno greffes Ctl et non dans les xéno greffes STING^{-/-}, serait un premier élément de réponse quant à un éventuel rôle pro-survie du TNFR2 lors de l'activation de la voie cGAS/STING par le paclitaxel.

e. L'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine est mieux exploitée par un traitement par BH3 mimétique différé.

Les BH3 mimétiques ciblant BCL-xL sont de prometteuses stratégies thérapeutiques dans les cancers du sein. En effet, nous avons vu que près d'une tumeur sur deux présentait une sensibilité *ex vivo* à l'ABT-737 après 48h de traitement. De plus de nombreuses études ont démontré une synergie d'effet *in vivo* entre des chimiothérapies et des BH3 mimétiques dans

différents types de cancer (Chen et al., 2011; Kotschy et al., 2016; Levenson et al., 2015; Tan et al., 2011). Un frein important au développement clinique de tels inhibiteurs est la survenue d'un effet indésirable grave, la thrombopénie, la survie des plaquettes étant dépendante de BCL-xL (Vogler et al., 2011). Lors d'un essai clinique du Navitoclax dans des cancers ovariens, cet effet indésirable a pu être maîtrisé par la diminution du nombre d'administration du BH3 mimétique. Il est donc intéressant de connaître le moment optimal pour l'utilisation du BH3 mimétique afin de minimiser l'impact sur les plaquettes tout en conservant un effet thérapeutique.

Nos travaux démontrent qu'une cellule cancéreuse subissant un stress mitotique par le paclitaxel, devenant alors primée pour l'apoptose sur BCL-xL, va avoir la capacité de primer les cellules avoisinantes également sur BCL-xL. Nous nous sommes alors demandé si un traitement par BH3 mimétique différé par rapport à l'injection de paclitaxel permettrait de laisser en vie plus longtemps les cellules aneuploïdes et, ainsi, de mieux exploiter l'augmentation du priming apoptotique de façon paracrine. Nous avons donc établi deux protocoles : un protocole où le paclitaxel et l'ABT-263 (forme orale de l'ABT-737) furent administrés de façon concomitante et un protocole où les injections d'ABT-263 furent différées par rapport à celles de l'antimitotique. Nous avons constaté que seul le protocole de traitements différés permet d'améliorer l'effet du paclitaxel. De plus, ce même protocole de traitement n'eut aucun effet sur des tumeurs STING^{-/-}, confirmant que la synergie d'effet entre paclitaxel et ABT-263 est dépendante de l'augmentation du priming apoptotique de manière paracrine et que celle-ci est mieux exploitée en différant le traitement par l'ABT-263.

Contrairement aux travaux affirmant que l'échappement à l'arrêt mitotique est un mécanisme de résistance au paclitaxel (Brito and Rieder, 2006; Huang et al., 2009; Sudo et al., 2004), nous avons démontré, à l'aide d'un suivi à long terme de cellules exposées à l'antimitotique, que l'effet anti-tumoral de l'antimitotique repose principalement sur la capacité qu'ont les cellules cancéreuses d'échapper au blocage en mitose. Nos travaux permettent de comprendre les effets anti-tumoraux moindres des inhibiteurs de kinases mitotiques induisant un arrêt mitotique robuste sans échappement (Otto and Sicinski, 2017).

f. Une imprégnation de la tumeur en IFN-I est prédictive d'une réponse au paclitaxel.

L'étude de signatures d'expression génique du transcriptome de 60 tumeurs naïves de traitement dont la sensibilité *ex vivo* au paclitaxel était connue a mis en évidence des scores STAT1 et IFN-I supérieurs dans les tumeurs sensibles au paclitaxel. Plusieurs travaux avaient également mis en évidence une corrélation entre une signature IFN-I et la sensibilité des tumeurs à des agents génotoxiques (Legrier et al., 2016; Sistigu et al., 2014). Nous avons vu que les IFN-I et le TNF α avaient des effets synergiques sur l'induction des BH3-only NOXA et BIM. Ce résultat suggère qu'une imprégnation basale de la tumeur en IFN-I permettrait d'amplifier rapidement les effets du TNF α sécrété par les cellules aneuploïdes et représenterait donc un terrain favorable au déclenchement paracrine d'une apoptose lors d'un traitement par du paclitaxel. L'origine de la signature IFN basale est, pour l'heure, non définie. L'analyse transcriptomique ayant été réalisée sur des tumeurs non micro-disséquées, nous avons estimé la contribution du micro-environnement dans les données transcriptomiques par le calcul du score ESTIMATE, évaluant la fraction de l'ensemble des cellules stromales, et immun, spécifique aux cellules du système immunitaire (Jézéquel et al., 2015; Yoshihara et al., 2013). Si aucune différence de fraction stromale n'est visible, on ne peut écarter une différence entre les scores immuns des tumeurs sensibles et résistantes au paclitaxel et, par conséquent, une possible contribution de l'infiltrat immunitaire dans la signature IFN des tumeurs sensibles. Confirmant nos précédents résultats, aucune corrélation entre la sensibilité/résistance au paclitaxel et une signature génique de prolifération ne fut mise en évidence. Il en est de même pour la signature d'instabilité chromosomique contrairement aux travaux de Swanton corrélant une instabilité chromosomique des tumeurs à une résistance aux taxanes (Swanton et al., 2009).

VI. Conclusion

Les cellules cancéreuses présentent une hétérogénéité de réponse à une chimiothérapie antimitotique, la perturbation de la mitose pouvant soit conduire à une mort mitotique soit à un échappement générant alors des cellules aneuploïdes. Auparavant considéré comme un mécanisme de résistance aux agents antimitotiques, nos travaux démontrent que l'échappement à l'arrêt mitotique permet au contraire de propager des signaux pro-apoptotiques à l'ensemble de la population cellulaire, cyclante ou non.

En effet, le paclitaxel, en perturbant les mitoses de cellules proliférantes, engendre la formation de micronoyaux dans les cellules ayant survécu à l'arrêt mitotique. La rupture de l'enveloppe des micronoyaux active le senseur de l'ADN cytosolique cGAS activant à son tour la protéine STING. La production de TNF α et d'IFN-I en résultant augmente le priming apoptotique des cellules avoisinantes via l'induction paracrine de la protéine pro-apoptotique NOXA.

Les cellules aneuploïdes présentent également une augmentation de leur priming apoptotique liée à l'induction de l'expression de NOXA via un mécanisme indépendant de la voie cGAS/STING. Ces inductions de NOXA, en neutralisant l'activité anti-apoptotique de MCL-1, ont pour conséquence de sensibiliser l'ensemble de la population cellulaire à des inhibiteurs de la protéine anti-apoptotique BCL-xL. Les augmentations de priming apoptotique directe et indirecte engendrées par le paclitaxel sont donc paradoxales : plus une cellule aneuploïde vit longtemps plus elle a le temps de propager des signaux de mort. Ainsi, seul un traitement par un inhibiteur de BCL-xL différé par rapport au traitement par paclitaxel permet d'exploiter l'augmentation collective du priming apoptotique dépendante de cGAS/STING en laissant le temps aux cellules aneuploïdes d'exprimer leur phénotype sécrétoire.

En augmentant notre compréhension sur les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des effets anti-tumoraux des antimitotiques, nos travaux permettent d'optimiser les chimiothérapies antimitotiques par l'administration séquentielle de BH3 mimétique ciblant BCL-xL.

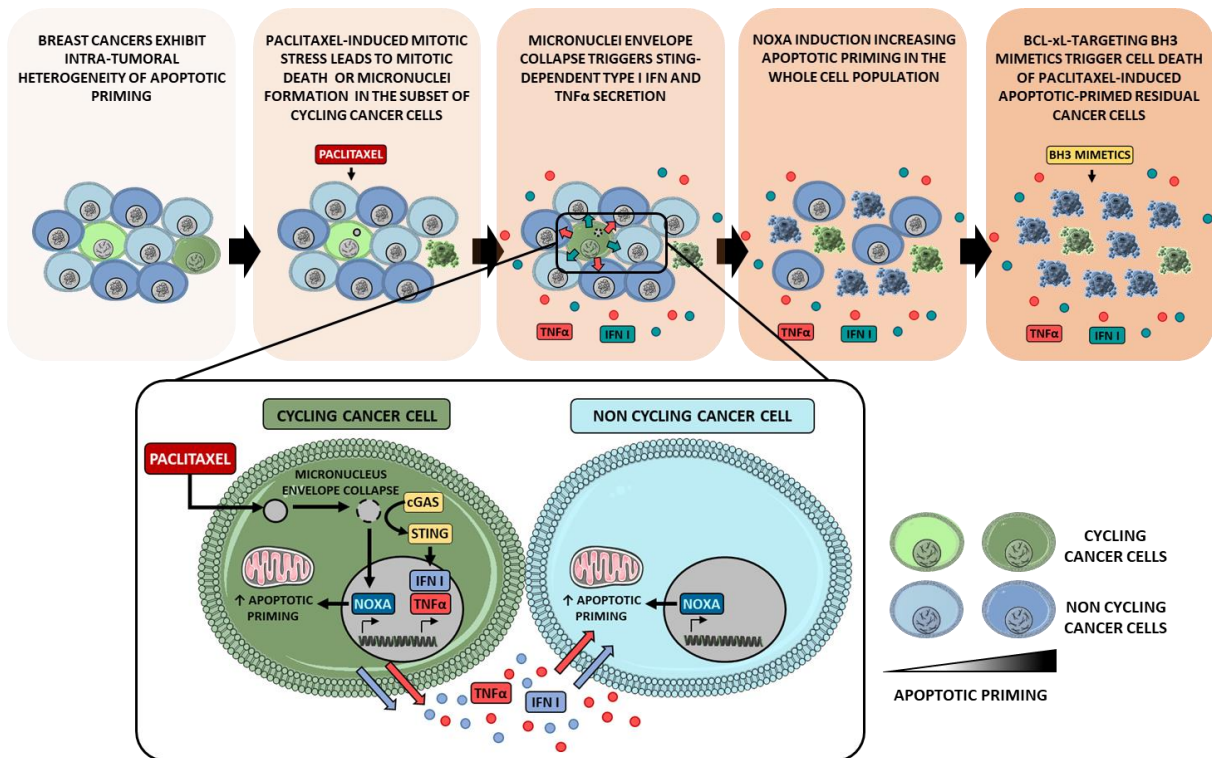


Figure 52 : propagation des signaux de mort par activation de la voie cGAS/STING lors d'un traitement antimitotique.

VII. Matériels et méthodes

1. Lignées cellulaires et réactifs

Les lignées cellulaires proviennent de la société ATCC (American Type Culture Collection) et ont été cultivées à 37°C sous 5 % de CO₂ dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, Saint Aubin, France) supplémenté de 5 % de Sérum de Veau Foetal (SVF) (Eurobio, Courtaboeuf, France), 2 mM de glutamine et 1 % de pénicilline/streptomycine (Gibco). Les principales caractéristiques des lignées cellulaires cancéreuses mammaires utilisées sont résumées en **Table 1**.

Les lignées cellulaires exprimant la protéine LMNB2 fusionnée au fluorochrome mCherry ont été établies par infection avec des rétrovirus contenant un vecteur codant pour la *LMNB2* (*pQCXIB-mCherry-LMNB2*) généreusement offert par le laboratoire de Lewis C. Cantley. La présence d'un gène de résistance à la blasticidine sur le vecteur a permis d'utiliser cet antibiotique à 10 µg/mL pour sélectionner les cellules exprimant la LMNB2 ectopique.

Les lignées cellulaires exprimant la protéine Histone 2B couplée au fluorochrome RFP (*H2B-RFP*) ont été établies par infection avec des lentivirus contenant un vecteur codant pour l'*H2B-RFP* généreusement offert par le laboratoire de Jan van Deursen. Les cellules exprimant modérément la protéine H2B-RFP ont été triées par cytométrie en flux avec le trieur BD-FACS ARIA III.

Pour les lignées cellulaires dont un ou deux gènes ont été invalidés par la technique d'édition du génome CRISPR-Cas9, des séquences guides d'ARN ont été designées via l'outil MIT CRISPR DESIGN TOOL (<http://crispr.mit.edu/>). Ces séquences guides, décrites en **Table 2**, ont été ensuite clonées dans un vecteur plentiCRISPRV2 (codant notamment pour la protéine Cas9 et pour un gène de résistance à la puromycine) (Addgene plasmid # 52961). Après infection avec des lentivirus contenant ce vecteur, les cellules ont été sélectionnées par 1 µg/mL de puromycine et la délétion protéique confirmée par immunoblot.

Pour la préparation des milieux conditionnés, 1.10^6 cellules ont été traitées comme indiqué durant 24h, lavées trois fois avec du PBS et cultivées dans du DMEM sans SVF pendant les 48h suivantes. Les milieux conditionnés ont ensuite été collectés, centrifugés (1500 rpm, 5 min) et supplémentés par 5 % de SVF avant leur incubation sur les cellules receveuses pendant 48h avec les traitements indiqués. Pour les expériences de neutralisation du TNF α , l'anticorps bloquant (clone D1B4, Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA) fut ajouté dans le milieu conditionné (100 ng/mL) 30 min avant son incubation sur les cellules receveuses.

Pour la génération de cellules $\rho 0$, les cellules ont été traitées pendant 4 jours par du bromure d'éthidium (500 ng/mL) dans du DMEM supplémenté par 10 % de SVF, 2 mM de glutamine, 1% de pénicilline/streptomycine et 100 μ g/mL de pyruvate, avant d'être traitées ou non par du paclitaxel. Pour évaluer la déplétion en ADN mitochondrial, des qPCR ont été réalisées sur l'ADN total (40 ng d'ADN dans un volume final de 10 μ L) extrait des cellules en utilisant le kit NucleoSpin Tissue (Macherey Nagel, Hoerdt, France). La quantité relative d'ADN mitochondrial a été mesurée par le ratio entre l'ADN mitochondrial (via deux gènes mitochondriaux *nd1* et *rnr2*) et l'ADN génomique (via le gène *poly*).

Amorces utilisées :

poly : 5'- TCCTGGAACAGTTGTGCTTTC / CCATCTACTCAGGACGGAGTTC -3'

nd1 : 5'- CAAACACTTATTACAACCCAAGAACA / TCATATTATGGCTATGGGTCAGG -3'

rnr2 : 5'- AAACAGCTTTTAACCATTGTAGGC / TTGAGCTTGAACGCTTTCTTTA -3'

Les cocultures ont consisté aux cultures combinées de cellules prétraitées par du paclitaxel durant 24h et de cellules non traitées exprimant la protéine de fusion H2B-RFP dans un ratio de 1 : 1. Après 48h, les cocultures furent traitées comme indiqué pendant les 48h suivantes.

In vitro, les traitements ont été utilisés aux concentrations suivantes : 1 μ M de WEHI-539 (ApexBio, Houston, TX, USA), 10 μ M d'ABT-737 (Selleckchem, Houston, TX, USA), 3,5 nM de paclitaxel, 50 nM d'AZD1152 et 15 μ M de gédunine (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), 10 μ M de Q-VD-Oph (R&D Systems, Abindgon, UK), 2 μ M de monensine (Biolegend, London, UK), 10 ng/mL de TNF α (Biolegend, London, UK), 2000 UI/mL d'IFN α (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France).

2. Analyses biochimiques

Pour les analyses par immunoblot, les protéines de 300 000 cellules ont été obtenues en lysant les cellules par du tampon CHIP (SDS 1%, EDTA 10 nM, Tris-HCl [pH 8,1] 50 nM et cocktail d'inhibiteurs de protéases/phosphatases) suivi par une sonication à 4°C puis ont été dosées en utilisant le kit BC Assay (Uptima). 40 ng de protéines par échantillon ont été dénaturés par chauffage 5 min à 95°C avant d'être séparés par SDS-PAGE puis transférés sur une membrane en nitrocellulose (Amersham Protran 0.45 µm NC). Un blocage des sites de liaisons aspécifiques a ensuite été réalisé par incubation de la membrane dans une solution de TBS-T (Tris Buffered Saline Tween : 25 mM Tris, 150 Mm NaCl, 0.05 % Tween 20, PH 8,0) contenant 1 % de lait. Les membranes ont ensuite été incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires (1 : 1000) suivant : Actine (MAB1501) et BIM (AB17003) de Millipore (Molsheim, France); STAT1 (9176), pTyr701-STAT1 (9167), p65 (8242), pSer536-p65 (3033), STING (13647), TNF α (3707), CASPASE-3 clivée (9662), PUMA (4976), BID (2002) et BAK (3814) de Cell Signalling Technology; BAX (A3533) et BCL-2 (M0887) de Dako (Santa Clara, CA, USA), BCL-xL (ab32370) et NOXA (ab13654) de Abcam (Cambridge, UK); MCL-1 (sc-819) de Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Après plusieurs lavages par du TBS-T, les membranes ont été incubées pendant 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire approprié couplé à la HRP (Horse Radish Peroxydase) (1 : 1000). Après de nouveaux lavages, la révélation a été effectuée via le kit Clarity™ western ECL kit (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) sur un bio-imager ChemiDoc XRS+ system (Bio-Rad).

Pour les ELISA, la quantité d'IFN α dans les milieux conditionés ou dans les surnageants de tranches tumorales a été déterminée selon le protocole du fournisseur (BioLegend, London, UK).

3. Analyses par qPCR

L'ARN total de 300 000 cellules a été isolé en utilisant le kit Nucleospin RNA plus (Macherey Nagel, Hoerd, France) puis dosé au Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). 1000 ng d'ARN ont ensuite été rétrotranscrit en ADN complémentaire en utilisant le kit Maxima First Strand cDNA synthesis Kit (Thermo Scientific, Illkirch, France) avec le programme suivant : 5 min à 25°C, 15 min à 50°C, 5 min à 85°C. La PCR quantitative (qPCR) a été réalisée en utilisant le mix EurobioGreen qPCR Mix Lo-Rox et l'acquisition faite sur une qTOWER (Analytik-jena, Jena, Germany). La réaction a été effectuée dans un volume final de 10 µl contenant 4 ng d'ADN complémentaire et 150 nM d'amorces. Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN complémentaire sont listées en **Table 3**. Les quantités relatives d'ARN messenger ont été estimées par la méthode Pfaffl (Pfaffl, 2001) et normalisées par la quantité relative moyenne de trois gènes de ménage : RPS18, RPLP0 et HPRT1.

4. Analyses par cytométrie en flux

Les taux d'apoptose ont été évalués sur 10 000 cellules par un marquage avec de l'Annexine V-FITC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) ou de l'Annexine-V-APC (BD Pharmingen, le Pont de Claix, France) pour les expériences de coculture selon les recommandations des fournisseurs.

Pour les analyses de cycles cellulaires, les cellules ont été fixées par une solution composée d'éthanol 70% (450 µL), de SVF (50 µL) et de PBS (150 µL) pendant au moins 1h à 4°C. Après un lavage au PBS, une perméabilisation des cellules à la saponine (0,1 % dans du PBS, sur glace pendant 15 min) a été réalisée. Après un lavage au PBS, un marquage intracytoplasmique a été effectué par un anticorps anti-MPM2 (Upstate 16155, 0.25 µL/échantillon) pendant 1h, à 4°C sous agitation. Après deux lavages au PBS, les cellules ont été marquées par de l'iodure de propidium (10 µg/mL) avant d'être analysées par cytométrie en flux (20 000 cellules

analysées pour un cycle cellulaire). Toutes les acquisitions ont été réalisées sur FACS Accuri C6 plus (BD Biosciences).

5. Vidéomicroscopie

Les cellules ont étéensemencées à une confluence de 50 % dans du DMEM dépourvu en rouge phénol et supplémenté par 5 % de SVF, 2 mM de glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine. Pour visualiser le déclenchement d'une apoptose, un substrat de la CASPASE-3/7 fluorogénique, le NucView™ 488, fut ajouté au milieu (5 µM). L'acquisition a été réalisée sur un vidéomicroscope JuLI Stage (NanoEntek) à raison d'une prise de vue par heure pendant 45h. Le suivi d'une dizaine de cellules par condition a été réalisé manuellement.

6. Immunofluorescence et immunohistochimie

Pour le marquage immunocytochimique de cGAS, les cellules ont été cultivées sur lamelle de verre, traitées comme indiqué et fixées par une solution de PBS contenant 4 % de paraformaldéhyde (PFA) pendant 20 min à température ambiante. Après un lavage au PBS, les cellules ont été perméabilisées par une solution contenant 0.5 % de triton X-100 pendant 5 min avant que les sites aspécifiques soient bloqués par une solution de PBS contenant 3 % de BSA pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps anti-cGAS (clone D1D3G, Cell Signalling Technology, 1:200) pendant 1h. Après trois lavages au PBS, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 488 pendant 45 min. Après trois lavages au PBS, le montage des lamelles de verre a été réalisé en utilisant le ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). L'observation des cellules a été réalisée sur des microscopes Zeiss Axioplan II fluorescence et Nikon A1 Rsi. Le comptage a été réalisé manuellement sur 200 cellules.

Pour les marquages IHC sur PDX, des coupes de tissus de 3 mm d'épaisseur ont été déshydratées à 37 °C sur la nuit. Après déparaffinage, elles ont été incubées avec une solution de démasquage à 95°C (CC1, Cell Conditioning Medium-1, pH=8.4, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) en utilisant un BenchMark XT immunostainer (Ventana Medical Systems). Les coupes ont ensuite été marquées à 37°C avec des anticorps monoclonaux anti-ER (clone SP1, Abcam), anti-PR (clone 1E2, Ventana Medical Systems) ou anti-cGAS (clone D1D3G, Cell Signalling Technology). La révélation chromogénique a été réalisée en utilisant le kit de détection Ventana iView DAB IHC detection kit, avec remplacement de l'anticorps secondaire par un anticorps secondaire polyclonal de chèvre anti-lapin (E0433, DAKO), suivi d'une contre-coloration à l'hématoxyline-II. Un contrôle négatif a été réalisé en remplaçant les anticorps primaires avec du sérum de lapin (Negative Control Rabbit Ig, Ventana Medical Systems). Le nombre de micronoyaux cGAS⁺ parmi 500 cellules cancéreuses a été évalué manuellement en utilisant le logiciel image J software (National Institute of Health, Research Service Branch, Bethesda, Maryland, USA).

7. Modèle d'étude *ex vivo*

Des fragments de tumeurs mammaires provenant de patientes consentantes prises en charge à l'Institut de Cancérologie de l'Ouest (René Gauducheau, Nantes, France) entre 2009 et 2017, ont été acheminés au laboratoire immédiatement après leur exérèse chirurgicale. Les fragments ont ensuite été coupés en tranches de 250 µm à l'aide d'un vibratome (Microm International, ThermoFischer Scientific, Illkirch, France) incubées pendant 48h avec 700 nM de paclitaxel (Sigma-Aldrich), 1 µM d'ABT-737 (Selleckchem), 100 ng/mL de TNF α , 50 ng/mL de doxorubicine ou sans traitement. Les tranches tumorales ont ensuite été fixées dans du formol et incluses dans de la paraffine avant de faire l'objet d'analyses IHC pour évaluer l'apoptose des cellules cancéreuses à l'aide d'un anticorps anti-caspase-3 clivée (clone D64E10 Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) et la prolifération des cellules cancéreuses à l'aide d'un anticorps anti-Ki67 (clone 30-9, Roche Diagnostics, Meylan, France), comme précédemment décrit (Séveno et al., 2012). Les données représentées correspondent au pourcentage de cellules tumorales positives dans la condition traitée moins le pourcentage de

cellules tumorales positives dans la condition non traitée. Le protocole fut approuvé par un comité d'éthique (2012-A00682-41).

8. Expériences *In vivo*

Les modèles de PDX ont été générés via des xénogreffes orthotopiques de fragments de tumeurs mammaires, fraîchement prélevées sur des patientes prises en charge à l'Institut de Cancérologie de l'Ouest, dans le fat pad de la glande mammaire de souris femelles prépubescentes NOD-*scid* IL2Rgamma^{null} (NSG) supplémentées en β -estradiol via l'eau de boisson et via une pastille implantée en sous-cutanée comme décrit précédemment (DeRose et al., 2013). Après croissance et exérèse de la tumeur, des fragments de PDX ont été xénogreffés sur d'autres souris et ainsi de suite garantissant le maintien et l'amplification du modèle. La majorité des expériences sur PDX a été réalisée au cours d'un quatrième passage sur souris. Les PDX#248 et #249 ont été établis avec des tumeurs ER⁺/PR⁺/HER2 non amplifié et P53 mutée provenant de patientes non traitées. Le PDX#306 a été établi avec une tumeur ER⁻/PR⁻/HER2 non amplifié et P53 mutée provenant d'une patiente ayant reçu un traitement néoadjuvant. L'expression des récepteurs ER et PR ainsi que les mutations de P53 des tumeurs d'origine sont maintenues dans les PDX.

Dans les expériences de xénogreffes orthotopiques de cellules des lignées MDA-MB-231 Ctl, STING^{-/-} ou TNF^{-/-}, 60 μ l d'un mix (1:1) PBS-low enrichment Matrigel (BD Biosciences) contenant 4.10^6 cellules ont été injectés dans le fat pad de la glande mammaire de souris femelle prépubescente NSG. Une fois les tumeurs devenues palpables, une mesure de leur volume au pied à coulisse fut réalisée deux fois par semaine. Quand le volume tumoral atteignait 80-150 mm³, les souris étaient traitées comme indiqué. Tous les traitements ont été administrés par injection intrapéritonéale aux concentrations suivantes : 10 mg/kg de paclitaxel (Sigma-Aldrich), 100 mg/kg d'ABT-263 (Selleckchem). Après traitement, les volumes tumoraux ont été mesurés quotidiennement, calculés par la formule $\frac{4}{3}\pi((\sqrt{dxD})/2)^3$ et normalisés par le volume tumoral mesuré juste avant de commencer le traitement. Les souris ont été euthanasiées humainement lorsque les volumes tumoraux atteignaient le point limite.

Toutes les expériences sur animaux ont été approuvées par un comité d'éthique (APAFIS#9634-201704191725600 et APAFIS#5114-2016042011155376).

9. Analyses transcriptomiques

Les analyses d'expression génique des tumeurs mammaires humaines naïves de traitement ont été réalisées en utilisant des kits Affymetrix® Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix®, Santa Clara, CA, USA) selon les recommandations du fournisseur. Ce kit permet de mesurer 54 000 transcrits représentant 20 000 gènes humains comme précédemment décrit (Jézéquel et al., 2015). Toutes les analyses ont été soumises à un contrôle qualité.

Les analyses d'expression génique des PDX ont été réalisées par Digital Gene Expression RNAseq (DGE seq) selon Kilens *et al* (Kilens et al., 2018). Les sets de genes différentiellement exprimés ont ensuite été analysés en utilisant l'outil EnrichR :

(<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>) (Kuleshov et al., 2016).

10. Calcul des scores des signatures d'expression génique

12 signatures d'expression génique (GES) ont été sélectionnées pour évaluer l'activité de différentes voies de signalisation : 5 concernent des réponses immunitaires ou inflammatoires (IL-8, MHC-1, MHC-2, STAT1 et type I IFN), 2 concernent le métabolisme (glycolysis et iron [iron regulatory gene signature: IRGS]), et 5 concernent des voies de signalisation souvent dérégulées dans les cellules cancéreuses (chromosomal instability [CIN], mitochondrial oxidative phosphorylation [MITO/OXPHOS], prolifération, reactive stroma et wound response). Les scores des GES ont été calculés pour chaque patiente via l'expression de différents sets de gènes impliqués dans les voies de signalisation évaluées.

	GES name	N° genes	N° probes	Statistics	Reference
Immune response	IL-8	-	4	AE	S1
	MHC-1	-	17	AE	S1
	MHC-2	-	14	AE	S1
	STAT1	-	14	AE	S1
	Type I IFN	-	14	AE	S1
Metabolims	Glycolysis	6	-	AE	S2
	IRGS	-	19	WAE	S3
Critical biological pathways in cancer	CIN	25	-	AE	S4
	MITO/OXPHOS	38	-	AE	S5
	Proliferation	-	47	AE	S1
	Reactive stroma	-	47	AE	S1
	Wound response	459	-	WAE	S6

GES: gene-expression signature; AE: average expression; IRGS: iron regulatory gene signature; WAE: weighted average expression; CIN: chromosomal instability; MITO/OXPHOS: mitochondrial oxidative phosphorylation

Références:

S1. Karn, T. *et al.* Homogeneous datasets of triple negative breast cancers enable the identification of novel prognostic and predictive signatures. *PLoS One* **6**, e28403 (2011).

S2. Hu, Z. *et al.* A compact VEGF signature associated with distant metastases and poor outcomes. *BMC Med.* **7**, 9 (2009).

S3. Miller, L.D. *et al.* An iron regulatory gene signature predicts outcome in breast cancer. *Cancer Res.* **71**, 6728-6737 (2011).

S4. Carter, S.L., Eklund, A.C., Kohane, I.S., Harris, L.N. & Szallasi, Z. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat. Genet.* **9**, 1043-1048 (2006).

S5. Whitaker-Menezes, D. *et al.* Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells in situ: visualizing the therapeutic effects of metformin in tumor tissue. *Cell Cycle* **23**, 4047-4064 (2011).

S6. Chang, H.Y. *et al.* Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol.* **2**, E7 (2004).

Les scores stromal et immun ont été calculés à partir des analyses transcriptomiques réalisées sur puce Affymetrix en utilisant le package R Estimate :

(<http://bioinformatics.mdanderson.org/estimate/rpackage.html>) (Yoshihara et al., 2013)

11. Analyses statistiques

Le test *t* de Student ou le test de Pearson ont été utilisés pour les analyses statistiques sur le logiciel GraphPad Prism 5.0 Software. Sauf indication contraire, toutes les expériences ont été réalisées au moins trois fois. Les barres d'erreurs représentent le paramètre SEM (Standard Errors of Mean). Les symboles correspondent à une p-value inférieure à *0.05, **0.01 and *** 0.001. NS : Non Significatif.

12. Tables

Table 1 : caractéristiques des lignées cellulaires cancéreuses mammaires utilisées

Lignée cellulaire	Sous-type	P53	Origine	Autres
MDA-MB-231	Triple négatif	Mutée	Effusion pleurale	RIPK3 déficiente
MDA-MB-468	Triple négatif	Mutée	Effusion pleurale	RIPK3 et PTEN déficientes
T47D	Luminal	Mutée	Effusion pleurale	-
MCF7	Luminal	Sauvage	Effusion pleurale	RIPK3 et CASPASE-3 déficientes

Table 2 : séquences guides utilisées

Human <i>BAX</i>	AGTAGAAAAGGGCGACAACC
Human <i>BAK</i>	GCCATGCTGGTAGACGTGTA
Human <i>PMAIP1</i>	TCGAGTGTGCTACTCAACTC
Human <i>BID</i>	CACCGTCAACAACGGTTCCAGCCTC

Human <i>BCL2L11</i>	CACCGAGTTCTGAGTGTGACCGAGA
Human <i>BCL2L1</i>	GCAGACAGCCCCGCGGTGAA
Human <i>MCL1</i>	CGCGGTGACGTCCGGGACCT
Human <i>STING</i>	GCAGGCACTCAGCAGAACCA
Human <i>TNF</i>	TGAAAGCATGATCCGGGACG
Human <i>IFNAR1</i>	GCGGCTGCGGACAACACCCA

Table 3 : amorces utilisées

<i>RPS18</i>	5'-ATCCCTGAAAAGTTCCAGCA / CCCTCTTGGTGAGGTCAATG-3'
<i>RPLP0</i>	5'-AACCCAGCTCTGGAGAACT / CCCCTGGAGATTTTAGTGGT-3'
<i>HPRT1</i>	5'-ATGCTGAGGATTTGGAAAGG / GATGTAATCCAGCAGGTCAGC-3'
<i>PMAIP1</i>	5'-CTCTGTAGCTGAGTGGGCG / CGGAAGTTCAGTTTGTCTCCA-3'
<i>BBC3</i>	5'-ACCTCAACGCACAGTACGA / GCACCTAATTGGGCTCCATC-3'
<i>BID</i>	5'-GAAGCGGGTAGTCGACCG / GGAACCGTTGTTGACCTCAC-3'
<i>BCL2L11</i>	5'-GCCTTCAACCACTATCTCAG / TAAGCGTTAACTCGTCTCC-3'
<i>BCL2L1</i>	5'-TTCAGTGACCTGACATCCA / TCCACAAAAGTATCCCAGCC-3'
<i>MCL1</i>	5'-TCGGTACCTTCGGGAGCAGGC / CCCAGTTTGTACGCCGTCGCT-3'
<i>BCL2</i>	5'-TCTTCAGAGACAGCCAGGAG / CCTTCTTTGAGTTCGGTGGG-3'
<i>TNF</i>	5'-CTGCACTTTGGAGTGATCGG / CTCGGGGTTCGAGAAGATGA-3'
<i>IFNβ</i>	5'-ATGACCAACAAGTGTCTCCTCC / GTCATGGAAAGAGCTGTAGTG-3'

VIII. Bibliographie

- Aaronson, R.P., and Blobel, G. (1974). On the attachment of the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* *62*, 746–754.
- Abdallah, P., Luciano, P., Runge, K.W., Lisby, M., Géli, V., Gilson, E., and Teixeira, M.T. (2009). A two step model for senescence triggered by a single critically short telomere. *Nat. Cell Biol.* *11*, 988–993.
- Acosta, J.C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J.P., Athineos, D., Kang, T.-W., Lasitschka, F., Andrulis, M., et al. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.* *15*, 978–990.
- Ahn, J., Gutman, D., Saijo, S., and Barber, G.N. (2012). STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 19386–19391.
- Ahn, J., Xia, T., Konno, H., Konno, K., Ruiz, P., and Barber, G.N. (2014). Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. *Nat. Commun.* *5*, 5166.
- Alexandre, J., Hu, Y., Lu, W., Pelicano, H., and Huang, P. (2007). Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer Res.* *67*, 3512–3517.
- Amit, I., Citri, A., Shay, T., Lu, Y., Katz, M., Zhang, F., Tarcic, G., Siwak, D., Lahad, J., Jacob-Hirsch, J., et al. (2007). A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat. Genet.* *39*, 503–512.
- Anderson, D.J., and Hetzer, M.W. (2008). Reshaping of the endoplasmic reticulum limits the rate for nuclear envelope formation. *J. Cell Biol.* *182*, 911–924.
- Armstrong, J.L., Flockhart, R., Veal, G.J., Lovat, P.E., and Redfern, C.P.F. (2010). Regulation of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by ATF4 in neuroectodermal tumor cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 6091–6100.
- Assenov, Y., Brocks, D., and Gerhäuser, C. (2018). Intratumor heterogeneity in epigenetic patterns. *Semin. Cancer Biol.* *51*, 12–21.
- Baguley, B.C., Marshall, E.S., Whittaker, J.R., Dotchin, M.C., Nixon, J., McCrystal, M.R., Finlay, G.J., Matthews, J.H., Holdaway, K.M., and van Zijl, P. (1995). Resistance mechanisms determining the in vitro sensitivity to paclitaxel of tumour cells cultured from patients with ovarian cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990 31A*, 230–237.
- Bah, N., Maillet, L., Ryan, J., Dubreil, S., Gautier, F., Letai, A., Juin, P., and Barillé-Nion, S. (2014). Bcl-xL controls a switch between cell death modes during mitotic arrest. *Cell Death Dis.* *5*, e1291.
- Baker, D.E.C., Harrison, N.J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H.D., Shaw, P.J., Heath, P.R., Holden, H., and Andrews, P.W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat. Biotechnol.* *25*, 207–215.
- Bakhom, S.F., and Cantley, L.C. (2018). The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment. *Cell* *174*, 1347–1360.
- Bakhom, S.F., Ngo, B., Laughney, A.M., Cavallo, J.-A., Murphy, C.J., Ly, P., Shah, P., Sriram, R.K., Watkins, T.B.K., Taunk, N.K., et al. (2018). Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* *553*, 467–472.
- Balko, J.M., Giltane, J.M., Wang, K., Schwarz, L.J., Young, C.D., Cook, R.S., Owens, P., Sanders, M.E., Kuba, M.G., Sánchez, V., et al. (2014). Molecular Profiling of the Residual Disease of Triple-Negative Breast Cancers after Neoadjuvant Chemotherapy Identifies Actionable Therapeutic Targets. *Cancer Discov.* *4*, 232–245.
- Barillé-Nion, S., Bah, N., Véquaud, E., and Juin, P. (2012). Regulation of cancer cell survival by BCL2 family members upon prolonged mitotic arrest: opportunities for anticancer therapy. *Anticancer Res.* *32*, 4225–4233.
- Barr, M.L., and Bertram, E.G. (1949). A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* *163*, 676.
- Barreca, A., Martinengo, C., Annaratone, L., Righi, L., Chiappella, A., Ladetto, M., Demurtas, A., Chiusa, L., Stacchini, A., Crosetto, N., et al. (2014). Inter- and intratumoral heterogeneity of BCL2 correlates with IgH expression and

- prognosis in follicular lymphoma. *Blood Cancer J.* 4, e249.
- Bates, D.J.P., Danilov, A.V., Lowrey, C.H., and Eastman, A. (2013). Vinblastine rapidly induces NOXA and acutely sensitizes primary chronic lymphocytic leukemia cells to ABT-737. *Mol. Cancer Ther.* 12, 1504–1514.
- Bekier, M.E., Fischbach, R., Lee, J., and Taylor, W.R. (2009). Length of mitotic arrest induced by microtubule-stabilizing drugs determines cell death after mitotic exit. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1646–1654.
- Ben-David, U., Arad, G., Weissbein, U., Mandefro, B., Maimon, A., Golan-Lev, T., Narwani, K., Clark, A.T., Andrews, P.W., Benvenisty, N., et al. (2014). Aneuploidy induces profound changes in gene expression, proliferation and tumorigenicity of human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 5, 4825.
- Bennett, A., Sloss, O., Topham, C., Nelson, L., Tighe, A., and Taylor, S.S. (2016). Inhibition of Bcl-xL sensitizes cells to mitotic blockers, but not mitotic drivers. *Open Biol.* 6.
- Bhola, P.D., Mar, B.G., Lindsley, R.C., Ryan, J.A., Hogdal, L.J., Vo, T.T., DeAngelo, D.J., Galinsky, I., Ebert, B.L., and Letai, A. (2016). Functionally identifiable apoptosis-insensitive subpopulations determine chemoresistance in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Invest.* 126, 3827–3836.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., et al. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385, 729–733.
- Brault, M., Olsen, T.M., Martinez, J., Stetson, D.B., and Oberst, A. (2018). Intracellular Nucleic Acid Sensing Triggers Necroptosis through Synergistic Type I IFN and TNF Signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 200, 2748–2756.
- Brinkmann, K., Zigrino, P., Witt, A., Schell, M., Ackermann, L., Broxtermann, P., Schüll, S., Andree, M., Coutelle, O., Yazdanpanah, B., et al. (2013). Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 potentiates cancer chemosensitivity by stabilizing NOXA. *Cell Rep.* 3, 881–891.
- Brito, D.A., and Rieder, C.L. (2006). Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr. Biol. CB* 16, 1194–1200.
- Broz, P., and Dixit, V.M. (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 407–420.
- Bu, Y., Li, X., He, Y., Huang, C., Shen, Y., Cao, Y., Huang, D., Cai, C., Wang, Y., Wang, Z., et al. (2016). A phosphomimetic mutant of RelA/p65 at Ser536 induces apoptosis and senescence: An implication for tumor-suppressive role of Ser536 phosphorylation. *Int. J. Cancer* 138, 1186–1198.
- Cahill, D.P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G.J., Willson, J.K.V., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392, 300–303.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307.
- Castedo, M., Coquelle, A., Vivet, S., Vitale, I., Kauffmann, A., Dessen, P., Pequignot, M.O., Casares, N., Valent, A., Mouhamad, S., et al. (2006). Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *EMBO J.* 25, 2584–2595.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A., and Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9, 351–365.
- Chen, C., Edelman, L.C., and Gélinas, C. (2000). The Rel/NF- κ B Family Directly Activates Expression of the Apoptosis Inhibitor Bcl-xL. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2687–2695.
- Chen, J., Jin, S., Abraham, V., Huang, X., Liu, B., Mitten, M.J., Nimmer, P., Lin, X., Smith, M., Shen, Y., et al. (2011). The Bcl-2/Bcl-XL/Bcl-w Inhibitor, Navitoclax, Enhances the Activity of Chemotherapeutic Agents In Vitro and In Vivo. *Mol. Cancer Ther.* 10, 2340–2349.
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* 17, 393–403.
- Chen, Q., Boire, A., Jin, X., Valiente, M., Er, E.E., Lopez-Soto, A., Jacob, L., Patwa, R., Shah, H., Xu, K., et al. (2016a). Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature* 533, 493–498.
- Chen, Q., Sun, L., and Chen, Z.J. (2016b). Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat. Immunol.* 17, 1142–1149.
- Chen, Y.-A., Shen, Y.-L., Hsia, H.-Y., Tiang, Y.-P., Sung, T.-L., and Chen, L.-Y. (2017). Extrachromosomal telomere repeat DNA is linked to ALT development via cGAS-STING

- DNA sensing pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 1124–1131.
- Corazzari, M., Gagliardi, M., Fimia, G.M., and Piacentini, M. (2017). Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Front. Oncol.* **7**, 78.
- Cui, L.F., Guo, X.J., Wei, J., Liu, F.F., Fan, Y., Lang, R.G., Gu, F., Zhang, X.M., and Fu, L. (2008). Overexpression of TNF-alpha and TNFR2 in invasive micropapillary carcinoma of the breast: clinicopathological correlations. *Histopathology* **53**, 381–388.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 49–63.
- Dal Col, J., Mastorci, K., Faè, D.A., Muraro, E., Martorelli, D., Inghirami, G., and Dolcetti, R. (2012). Retinoic acid/alpha-interferon combination inhibits growth and promotes apoptosis in mantle cell lymphoma through Akt-dependent modulation of critical targets. *Cancer Res.* **72**, 1825–1835.
- Dar, A.A., Belkhir, A., Ecsedy, J., Zaika, A., and El-Rifai, W. (2008). Aurora kinase A inhibition leads to p73-dependent apoptosis in p53-deficient cancer cells. *Cancer Res.* **68**, 8998–9004.
- Davids, M.S., Deng, J., Wiestner, A., Lannutti, B.J., Wang, L., Wu, C.J., Wilson, W.H., Brown, J.R., and Letai, A. (2012). Decreased mitochondrial apoptotic priming underlies stroma-mediated treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **120**, 3501–3509.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* **417**, 949–954.
- Demaria, M., O’Leary, M.N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., Koenig, K., Le, C., Mitin, N., Deal, A.M., et al. (2017). Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discov.* **7**, 165–176.
- Deng, J., Shimamura, T., Perera, S., Carlson, N.E., Cai, D., Shapiro, G.I., Wong, K.-K., and Letai, A. (2007). Proapoptotic BH3-Only BCL-2 Family Protein BIM Connects Death Signaling from Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition to the Mitochondrion. *Cancer Res.* **67**, 11867–11875.
- DeRose, Y.S., Gligorich, K.M., Wang, G., Georgelas, A., Bowman, P., Courdy, S.J., Welm, A.L., and Welm, B.E. (2013). Patient-derived Models of Human Breast Cancer: Protocols for In vitro and In vivo Applications in Tumor Biology and Translational Medicine. *Curr. Protoc. Pharmacol.* Editor. Board SJ Enna Ed.--Chief AI **0** **14**, Unit14.23.
- Dioum, M.D., Seck, M., Silvestre, V., Planchat, A., Loquet, D., Lohard, S., Barille-Nion, S., Remaud, G.S., Robins, R.J., and Tea, I. (2016). A Ring-D-Seco-Tetranortriterpenoid from Seeds of *Carapa procera* Active against Breast Cancer Cell Lines. *Planta Med.* **82**, 967–972.
- Dobrzycka, B., Terlikowski, S.J., Garbowicz, M., Niklińska, W., Bernaczyk, P.S., Nikliński, J., Kinalski, M., and Chyczewski, L. (2009). Tumor necrosis factor-alpha and its receptors in epithelial ovarian cancer. *Folia Histochem. Cytobiol.* **47**, 609–613.
- Donnelly, N., and Storchová, Z. (2015). Aneuploidy and proteotoxic stress in cancer. *Mol. Cell. Oncol.* **2**, 1–11.
- Doyle, T., Goujon, C., and Malim, M.H. (2015). HIV-1 and interferons: who’s interfering with whom? *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 403–413.
- Dürrbaum, M., Kuznetsova, A.Y., Passerini, V., Stingle, S., Stoehr, G., and Storchová, Z. (2014). Unique features of the transcriptional response to model aneuploidy in human cells. *BMC Genomics* **15**, 139.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* **145**, 104–116.
- Egle, A., Harris, A.W., Bouillet, P., and Cory, S. (2004). Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 6164–6169.
- Eitz Ferrer, P., Potthoff, S., Kirschnek, S., Gasteiger, G., Kastenmüller, W., Ludwig, H., Paschen, S.A., Villunger, A., Sutter, G., Drexler, I., et al. (2011). Induction of Noxa-mediated apoptosis by modified vaccinia virus Ankara depends on viral recognition by cytosolic helicases, leading to IRF-3/IFN- β -dependent induction of pro-apoptotic Noxa. *PLoS Pathog.* **7**, e1002083.
- Farlie, P.G., Dringen, R., Rees, S.M., Kannourakis, G., and Bernard, O. (1995). bcl-2 transgene expression can protect neurons against developmental and induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 4397–4401.
- Faustman, D., and Davis, M. (2010). TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 482–493.
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic

- dysfunction and cell death. *Mutat. Res.* 600, 58–66.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2, 1084–1104.
- Fernández, Y., Verhaegen, M., Miller, T.P., Rush, J.L., Steiner, P., Opiari, A.W., Lowe, S.W., and Soengas, M.S. (2005). Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res.* 65, 6294–6304.
- Fischer, K.R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., et al. (2015). EMT is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 527, 472–476.
- Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.-M., and Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 491–496.
- Frank, T., Tuppi, M., Hugle, M., Dötsch, V., Wijk, S.J.L. van, and Fulda, S. (2019). Cell cycle arrest in mitosis promotes interferon-induced necroptosis. *Cell Death Differ.* 1.
- Freund, A., Laberge, R.-M., Demaria, M., and Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol. Biol. Cell* 23, 2066–2075.
- Fritsche, P., Seidler, B., Schüler, S., Schnieke, A., Göttlicher, M., Schmid, R.M., Saur, D., and Schneider, G. (2009). HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA. *Gut* 58, 1399–1409.
- Fu, T.-M., Li, Y., Lu, A., Li, Z., Vajjhala, P.R., Cruz, A.C., Srivastava, D.B., DiMaio, F., Penczek, P.A., Siegel, R.M., et al. (2016). Cryo-EM Structure of Caspase-8 Tandem DED Filament Reveals Assembly and Regulation Mechanisms of the Death-Inducing Signaling Complex. *Mol. Cell* 64, 236–250.
- Fuertes Marraco, S.A., Scott, C.L., Bouillet, P., Ives, A., Masina, S., Vremec, D., Jansen, E.S., O'Reilly, L.A., Schneider, P., Fasel, N., et al. (2011). Type I interferon drives dendritic cell apoptosis via multiple BH3-only proteins following activation by PolyI:C in vivo. *PLoS One* 6, e20189.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541.
- Gao, D., Li, T., Li, X.-D., Chen, X., Li, Q.-Z., Wight-Carter, M., and Chen, Z.J. (2015). Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E5699–5705.
- Garrison, S.P., Jeffers, J.R., Yang, C., Nilsson, J.A., Hall, M.A., Rehg, J.E., Yue, W., Yu, J., Zhang, L., Onciu, M., et al. (2008). Selection against PUMA gene expression in Myc-driven B-cell lymphomagenesis. *Mol. Cell Biol.* 28, 5391–5402.
- Gascoigne, K.E., and Taylor, S.S. (2008). Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell* 14, 111–122.
- Gascoigne, K.E., and Taylor, S.S. (2009). How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J. Cell Sci.* 122, 2579–2585.
- Gentili, M., Kowal, J., Tkach, M., Satoh, T., Lahaye, X., Conrad, C., Boyron, M., Lombard, B., Durand, S., Kroemer, G., et al. (2015). Transmission of innate immune signaling by packaging of cGAMP in viral particles. *Science* 349, 1232–1236.
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., and Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* 31, 13–20.
- Gillet, J.-P., Varma, S., and Gottesman, M.M. (2013). The clinical relevance of cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 452–458.
- Gilmore, A.P., Metcalfe, A.D., Romer, L.H., and Streuli, C.H. (2000). Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J. Cell Biol.* 149, 431–446.
- Glück, S., Guey, B., Gulen, M.F., Wolter, K., Kang, T.-W., Schmacke, N.A., Bridgeman, A., Rehwinkel, J., Zender, L., and Ablasser, A. (2017). Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat. Cell Biol.* 19, 1061–1070.
- Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I., and Green, D.R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol.* 2, 156–162.
- Gong, J., Zhang, J.-P., Li, B., Zeng, C., You, K., Chen, M.-X., Yuan, Y., and Zhuang, S.-M. (2013). MicroRNA-125b promotes apoptosis by regulating the expression of Mcl-1, Bcl-w and IL-6R. *Oncogene* 32, 3071–3079.

- Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 353–363.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Löhdén, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., et al. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* *83*, 793–802.
- Grossmann, M., O'Reilly, L.A., Gugasyan, R., Strasser, A., Adams, J.M., and Gerondakis, S. (2000). The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression. *EMBO J.* *19*, 6351–6360.
- Grumont, R.J., Rourke, I.J., and Gerondakis, S. (1999). Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev.* *13*, 400–411.
- Gulen, M.F., Koch, U., Haag, S.M., Schuler, F., Apetoh, L., Villunger, A., Radtke, F., and Ablasser, A. (2017). Signalling strength determines proapoptotic functions of STING. *Nat. Commun.* *8*, 427.
- Gupta, S., Giricz, Z., Naton, A., Donnelly, N., Deegan, S., Szegezdi, E., and Samali, A. (2012). NOXA contributes to the sensitivity of PERK-deficient cells to ER stress. *FEBS Lett.* *586*, 4023–4030.
- Halevy, T., Biancotti, J.-C., Yanuka, O., Golan-Lev, T., and Benvenisty, N. (2016). Molecular Characterization of Down Syndrome Embryonic Stem Cells Reveals a Role for RUNX1 in Neural Differentiation. *Stem Cell Rep.* *7*, 777–786.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Harding, S.M., Benci, J.L., Irianto, J., Discher, D.E., Minn, A.J., and Greenberg, R.A. (2017). Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature* *548*, 466–470.
- Harley, M.E., Allan, L.A., Sanderson, H.S., and Clarke, P.R. (2010). Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *EMBO J.* *29*, 2407–2420.
- Haschka, M., Karbon, G., Fava, L.L., and Villunger, A. (2018). Perturbing mitosis for anti-cancer therapy: is cell death the only answer? *EMBO Rep.* *19*, e45440.
- Haschka, M.D., Soratroi, C., Kirschnek, S., Häcker, G., Hilbe, R., Geley, S., Villunger, A., and Fava, L.L. (2015). The NOXA-MCL1-BIM axis defines lifespan on extended mitotic arrest. *Nat. Commun.* *6*, 6891.
- Hatch, E.M., Fischer, A.H., Deerinck, T.J., and Hetzer, M.W. (2013). Catastrophic Nuclear Envelope Collapse in Cancer Cell Micronuclei. *Cell* *154*, 47–60.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* *25*, 585–621.
- Henson, J.D., Cao, Y., Huschtscha, L.I., Chang, A.C., Au, A.Y.M., Pickett, H.A., and Reddel, R.R. (2009). DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nat. Biotechnol.* *27*, 1181–1185.
- Hermine, T., Jones, N.J., and Parry, J.M. (1997). Comparative induction of micronuclei in repair-deficient and -proficient Chinese hamster cell lines following clastogen or aneugen exposures. *Mutat. Res.* *392*, 151–163.
- Hintzsche, H., Hemmann, U., Poth, A., Utesch, D., Lott, J., and Stopper, H. (2017). Review: Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutat. Res.-Rev. Mutat. Res.* *771*, 85–98.
- Hornung, V., Hartmann, R., Ablasser, A., and Hopfner, K.-P. (2014). OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 521–528.
- Hotz, B., Arndt, M., Dullat, S., Bhargava, S., Buhr, H.-J., and Hotz, H.G. (2007). Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 4769–4776.
- Huang, H.-C., Shi, J., Orth, J.D., and Mitchison, T.J. (2009). Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly. *Cancer Cell* *16*, 347–358.
- Huang, Y., Hou, H., Yi, Q., Zhang, Y., Chen, D., Jiang, E., Xia, Y., Fenech, M., and Shi, Q. (2011). The fate of micronucleated cells post X-irradiation detected by live cell imaging. *DNA Repair* *10*, 629–638.
- Hughes, M.A., Powley, I.R., Jukes-Jones, R., Horn, S., Feoktistova, M., Fairall, L., Schwabe, J.W.R., Leverkus, M., Cain, K., and MacFarlane, M. (2016). Cooperative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate. *Mol. Cell* *61*, 834–849.

- Hwang, L.H., Lau, L.F., Smith, D.L., Mistrot, C.A., Hardwick, K.G., Hwang, E.S., Amon, A., and Murray, A.W. (1998). Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science* 279, 1041–1044.
- Ichim, G., and Tait, S.W.G. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat. Rev. Cancer* 16, 539–548.
- Ichim, G., Lopez, J., Ahmed, S.U., Muthalagu, N., Giampazolias, E., Delgado, M.E., Haller, M., Riley, J.S., Mason, S.M., Athineos, D., et al. (2015). Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Mol. Cell* 57, 860–872.
- Inoue, S., Riley, J., Gant, T.W., Dyer, M.J.S., and Cohen, G.M. (2007). Apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors in leukemic cells is mediated by Bim and Noxa. *Leukemia* 21, 1773–1782.
- Inta, I., Paxian, S., Maegele, I., Zhang, W., Pizzi, M., Spano, P., Sarnico, I., Muhammad, S., Herrmann, O., Inta, D., et al. (2006). Bim and Noxa are candidates to mediate the deleterious effect of the NF-kappa B subunit RelA in cerebral ischemia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 12896–12903.
- Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R.S., Zhai, B., Wan, L., Gutierrez, A., Lau, A.W., et al. (2011). SCFFbw7 Regulates Cellular Apoptosis By Targeting Mcl-1 for Ubiquitination and Destruction. *Nature* 471, 104–109.
- Irianto, J., Xia, Y., Pfeifer, C.R., Athirasala, A., Ji, J., Alvey, C., Tewari, M., Bennett, R.R., Harding, S.M., Liu, A.J., et al. (2017). DNA Damage Follows Repair Factor Depletion and Portends Genome Variation in Cancer Cells after Pore Migration. *Curr. Biol. CB* 27, 210–223.
- Isaacs Alick, Lindenmann J., and Andrewes Christopher Howard (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B - Biol. Sci.* 147, 258–267.
- Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674–678.
- Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461, 788–792.
- Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., Tuyn, J. van, Nelson, D.M., Rai, T.S., Shah, P.P., Hewitt, G., Korolchuk, V.I., Passos, J.F., et al. (2013). Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J Cell Biol* 202, 129–143.
- Iwanaga, Y., Chi, Y.-H., Miyazato, A., Sheleg, S., Haller, K., Peloponese, J.-M., Li, Y., Ward, J.M., Benezra, R., and Jeang, K.-T. (2007). Heterozygous Deletion of Mitotic Arrest-Deficient Protein 1 (MAD1) Increases the Incidence of Tumors in Mice. *Cancer Res.* 67, 160–166.
- Jézéquel, P., Loussouarn, D., Guérin-Charbonnel, C., Champion, L., Vanier, A., Gouraud, W., Lasla, H., Guelle, C., Valo, I., Verrière, V., et al. (2015). Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res. BCR* 17, 43.
- Johnson, R.H., Hu, P., Fan, C., and Anders, C.K. (2015). Gene expression in “young adult type” breast cancer: a retrospective analysis. *Oncotarget* 6, 13688–13702.
- Jost, P.J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M.D., Nachbur, U., Huang, D.C.S., Bouillet, P., Thomas, H.E., Borner, C., Silke, J., et al. (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* 460, 1035–1039.
- Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., and Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 13, 455–465.
- Kaufmann, S.H., and Earnshaw, W.C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell Res.* 256, 42–49.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384.
- Kawane, K., Fukuyama, H., Yoshida, H., Nagase, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Okada, K., Iida, T., and Nagata, S. (2003). Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nat. Immunol.* 4, 138–144.
- Ke, F.F.S., Vanyai, H.K., Cowan, A.D., Delbridge, A.R.D., Whitehead, L., Grabow, S., Czabotar, P.E., Voss, A.K., and Strasser, A. (2018). Embryogenesis and Adult Life in the Absence of Intrinsic Apoptosis Effectors BAX, BAK, and BOK. *Cell* 173, 1217–1230.e17.
- Keitel, U., Scheel, A., Thomale, J., Halpape, R., Kaulfuß, S., Scheel, C., and Döbelstein, M. (2014). Bcl-xL mediates therapeutic resistance of a mesenchymal breast cancer cell subpopulation. *Oncotarget* 5, 11778–11791.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Khongkow, P., Gomes, A.R., Gong, C., Man, E.P.S., Tsang, J.W.-H., Zhao, F., Monteiro, L.J., Coombes, R.C., Medema, R.H., Khoo, U.S., et

- al. (2016). Paclitaxel targets FOXM1 to regulate KIF20A in mitotic catastrophe and breast cancer paclitaxel resistance. *Oncogene* 35, 990–1002.
- Kilens, S., Meistermann, D., Moreno, D., Chariou, C., Gaignerie, A., Reignier, A., Lelièvre, Y., Casanova, M., Vallot, C., Nedellec, S., et al. (2018). Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 9, 360.
- Kim, H.-E., Du, F., Fang, M., and Wang, X. (2005). Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17545–17550.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., and Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011–2015.
- Kisurina-Evgenieva, O.P., Sutiagina, O.I., and Onishchenko, G.E. (2016). Biogenesis of Micronuclei. *Biochem. Biokhimiia* 81, 453–464.
- Kitai, Y., Kawasaki, T., Sueyoshi, T., Kobiyama, K., Ishii, K.J., Zou, J., Akira, S., Matsuda, T., and Kawai, T. (2017). DNA-Containing Exosomes Derived from Cancer Cells Treated with Topotecan Activate a STING-Dependent Pathway and Reinforce Antitumor Immunity. *J. Immunol.* Baltim. Md 1950 198, 1649–1659.
- Knowlton, J.J., Dermody, T.S., and Holm, G.H. (2012). Apoptosis induced by mammalian reovirus is beta interferon (IFN) independent and enhanced by IFN regulatory factor 3- and NF- κ B-dependent expression of Noxa. *J. Virol.* 86, 1650–1660.
- Komlodi-Pasztor, E., Sackett, D., Wilkerson, J., and Fojo, T. (2011). Mitosis is not a key target of microtubule agents in patient tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8, 244–250.
- Komlodi-Pasztor, E., Sackett, D.L., and Fojo, A.T. (2012). Inhibitors targeting mitosis: tales of how great drugs against a promising target were brought down by a flawed rationale. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 51–63.
- Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A.L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G.L., Gong, J.-N., Moujalled, D.M., et al. (2016). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* 538, 477–482.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev.* 24, 2463–2479.
- Kuleshov, M.V., Jones, M.R., Rouillard, A.D., Fernandez, N.F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S.L., Jagodnik, K.M., Lachmann, A., et al. (2016). Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 44, W90-97.
- Lane, D. p. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature* 15.
- Lanni, J.S., Lowe, S.W., Licitra, E.J., Liu, J.O., and Jacks, T. (1997). p53-independent apoptosis induced by paclitaxel through an indirect mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9679–9683.
- Legrier, M.-E., Bièche, I., Gaston, J., Beurdeley, A., Yvonnet, V., Déas, O., Thuleau, A., Château-Joubert, S., Servely, J.-L., Vacher, S., et al. (2016). Activation of IFN/STAT1 signalling predicts response to chemotherapy in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br. J. Cancer* 114, 177–187.
- Lemaitre, J.-M., Géraud, G., and Méchali, M. (1998). Dynamics of the Genome during Early *Xenopus laevis* Development: Karyomeres As Independent Units of Replication. *J. Cell Biol.* 142, 1159–1166.
- Lemos, H., Mohamed, E., Huang, L., Ou, R., Pacholczyk, G., Arbab, A.S., Munn, D., and Mellor, A.L. (2016). STING Promotes the Growth of Tumors Characterized by Low Antigenicity via IDO Activation. *Cancer Res.* 76, 2076–2081.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 183–192.
- Leverson, J.D., Phillips, D.C., Mitten, M.J., Boghaert, E.R., Diaz, D., Tahir, S.K., Belmont, L.D., Nimmer, P., Xiao, Y., Ma, X.M., et al. (2015). Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Sci. Transl. Med.* 7, 279ra40.
- Levine, M.S., Bakker, B., Boeckx, B., Moyett, J., Lu, J., Vitre, B., Spierings, D.C., Lansdorp, P.M., Cleveland, D.W., Lambrechts, D., et al. (2017). Centrosome Amplification Is Sufficient to Promote Spontaneous Tumorigenesis in Mammals. *Dev. Cell* 40, 313-322.e5.
- Li, R., and Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66, 519–531.
- Liu, X., Wu, H., Loring, J., Hormuzdi, S., Disteche, C.M., Bornstein, P., and Jaenisch, R. (1997). Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line

- transmission. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 209, 85–91.
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol. Cell* 44, 517–531.
- Lockstone, H.E., Harris, L.W., Swatton, J.E., Wayland, M.T., Holland, A.J., and Bahn, S. (2007). Gene expression profiling in the adult Down syndrome brain. *Genomics* 90, 647–660.
- Lopez, J., Bessou, M., Riley, J.S., Giampazolias, E., Todt, F., Rochegüe, T., Oberst, A., Green, D.R., Edlich, F., Ichim, G., et al. (2016). Mito-priming as a method to engineer Bcl-2 addiction. *Nat. Commun.* 7, 10538.
- Louault, K., Bonneaud, T.L., Séveno, C., Gomez-Bougie, P., Nguyen, F., Gautier, F., Bourgeois, N., Lousouarn, D., Kerdraon, O., Barillé-Nion, S., et al. (2019). Interactions between cancer-associated fibroblasts and tumor cells promote MCL-1 dependency in estrogen receptor-positive breast cancers. *Oncogene*.
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847.
- Lu, L., Ladinsky, M.S., and Kirchhausen, T. (2011). Formation of the postmitotic nuclear envelope from extended ER cisternae precedes nuclear pore assembly. *J. Cell Biol.* 194, 425–440.
- Ly, P., Teitz, L.S., Kim, D.H., Shoshani, O., Skaletsky, H., Fachinetti, D., Page, D.C., and Cleveland, D.W. (2017). Selective Y centromere inactivation triggers chromosome shattering in micronuclei and repair by canonical NHEJ. *Nat. Cell Biol.* 19, 68–75.
- Lyon, M.F. (1961). Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372.
- Mackenzie, K.J., Carroll, P., Martin, C.-A., Murina, O., Fluteau, A., Simpson, D.J., Olova, N., Sutcliffe, H., Rainger, J.K., Leitch, A., et al. (2017). cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature* 548, 461–465.
- Mann, C.C. de O., and Kranzusch, P.J. (2017). cGAS Conducts Micronuclei DNA Surveillance. *Trends Cell Biol.* 27, 697–698.
- Mao, R., Wang, X., Spitznagel, E.L., Frelin, L.P., Ting, J.C., Ding, H., Kim, J., Ruczinski, I., Downey, T.J., and Pevsner, J. (2005). Primary and secondary transcriptional effects in the developing human Down syndrome brain and heart. *Genome Biol.* 6, R107.
- Márquez-Jurado, S., Díaz-Colunga, J., das Neves, R.P., Martínez-Lorente, A., Almazán, F., Guantes, R., and Iborra, F.J. (2018). Mitochondrial levels determine variability in cell death by modulating apoptotic gene expression. *Nat. Commun.* 9.
- Marusyk, A., Tabassum, D.P., Janiszewska, M., Place, A.E., Trinh, A., Rozhok, A.I., Pyne, S., Guerriero, J.L., Shu, S., Ekram, M., et al. (2016). Spatial Proximity to Fibroblasts Impacts Molecular Features and Therapeutic Sensitivity of Breast Cancer Cells Influencing Clinical Outcomes. *Cancer Res.* 76, 6495–6506.
- McArthur, K., Whitehead, L.W., Heddleston, J.M., Li, L., Padman, B.S., Oorschot, V., Geoghegan, N.D., Chappaz, S., Davidson, S., San Chin, H., et al. (2018). BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis. *Science* 359.
- Mei, Y., Xie, C., Xie, W., Tian, X., Li, M., and Wu, M. (2007). Noxa/Mcl-1 balance regulates susceptibility of cells to camptothecin-induced apoptosis. *Neoplasia N. Y. N* 9, 871–881.
- Mercille, S., and Massie, B. (1994). Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1140–1154.
- Mestre-Escorihuela, C., Rubio-Moscardo, F., Richter, J.A., Siebert, R., Climent, J., Fresquet, V., Beltran, E., Agirre, X., Marugan, I., Marín, M., et al. (2007). Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* 109, 271–280.
- Michel, L.S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P.K., Murty, V.V., and Benezra, R. (2001). MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* 409, 355–359.
- Mitchell, K.O., Ricci, M.S., Miyashita, T., Dicker, D.T., Jin, Z., Reed, J.C., and El-Deiry, W.S. (2000). Bax Is a Transcriptional Target and Mediator of c-Myc-induced Apoptosis. *Cancer Res.* 60, 6318–6325.
- Mitchison, T.J. (2012). The proliferation rate paradox in antimetabolic chemotherapy. *Mol. Biol. Cell* 23, 1–6.
- Montero, J., Sarosiek, K.A., DeAngelo, J.D., Maertens, O., Ryan, J., Ercan, D., Piao, H., Horowitz, N.S., Berkowitz, R.S., Matulonis, U., et al. (2015). Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. *Cell* 160, 977–989.

- Moore, F., Santin, I., Nogueira, T.C., Gurzov, E.N., Marselli, L., Marchetti, P., and Eizirik, D.L. (2012). The transcription factor C/EBP delta has anti-apoptotic and anti-inflammatory roles in pancreatic beta cells. *PLoS One* 7, e31062.
- Murphy, D.J., Junttila, M.R., Pouyet, L., Karnezis, A., Shchors, K., Bui, D.A., Brown-Swigart, L., Johnson, L., and Evan, G.I. (2008). Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo. *Cancer Cell* 14, 447–457.
- Nadanaka, S., Yoshida, H., Kano, F., Murata, M., and Mori, K. (2004). Activation of mammalian unfolded protein response is compatible with the quality control system operating in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 15, 2537–2548.
- Ni Chonghaile, T., Sarosiek, K.A., Vo, T.-T., Ryan, J.A., Tammareddi, A., Moore, V.D.G., Deng, J., Anderson, K.C., Richardson, P., Tai, Y.-T., et al. (2011). Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science* 334, 1129–1133.
- Nicholson, J.M., and Cimini, D. (2011). How mitotic errors contribute to karyotypic diversity in cancer. *Adv. Cancer Res.* 112, 43–75.
- Nikiforov, M.A., Riblett, M., Tang, W.-H., Gratchouck, V., Zhuang, D., Fernandez, Y., Verhaegen, M., Varambally, S., Chinnaiyan, A.M., Jakubowiak, A.J., et al. (2007). Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19488–19493.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053–1058.
- Ohashi, A., Ohori, M., Iwai, K., Nakayama, Y., Nambu, T., Morishita, D., Kawamoto, T., Miyamoto, M., Hirayama, T., Okaniwa, M., et al. (2015). Aneuploidy generates proteotoxic stress and DNA damage concurrently with p53-mediated post-mitotic apoptosis in SAC-impaired cells. *Nat. Commun.* 6, 7668.
- Oren, M. (1985). The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim. Biophys. Acta* 823, 67–78.
- Orth, J.D., Kohler, R.H., Foijer, F., Sorger, P.K., Weissleder, R., and Mitchison, T.J. (2011). Analysis of mitosis and antimetabolic drug responses in tumors by in vivo microscopy and single-cell pharmacodynamics. *Cancer Res.* 71, 4608–4616.
- Otto, T., and Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 17, 93–115.
- Panduri, V., Weitzman, S.A., Chandel, N.S., and Kamp, D.W. (2004). Mitochondrial-derived free radicals mediate asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 286, L1220–L1227.
- Park, S.H., Kang, K., Giannopoulou, E., Qiao, Y., Kang, K., Kim, G., Park-Min, K.-H., and Ivashkiv, L.B. (2017). Type I interferons and the cytokine TNF cooperatively reprogram the macrophage epigenome to promote inflammatory activation. *Nat. Immunol.* 18, 1104–1116.
- Patwardhan, C.A., Fauq, A., Peterson, L.B., Miller, C., Blagg, B.S.J., and Chadli, A. (2013). Gedunin inactivates the Co-chaperone p23 Protein Causing Cancer Cell Death by Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 288, 7313–7325.
- Pécot, J., Maillet, L., Pen, J.L., Vuillier, C., Trécesson, S. de C., Fétiveau, A., Sarosiek, K.A., Bock, F.J., Braun, F., Letai, A., et al. (2016). Tight Sequestration of BH3 Proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes Contributes to Apoptotic Resistance. *Cell Rep.* 17, 3347–3358.
- Penny, G.D., Kay, G.F., Sheardown, S.A., Rastan, S., and Brockdorff, N. (1996). Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 379, 131–137.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Punt, J.A., Osborne, B.A., Takahama, Y., Sharrow, S.O., and Singer, A. (1994). Negative selection of CD4+CD8+ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *J. Exp. Med.* 179, 709–713.
- Qi, Z., Yin, L., Xu, Y., and Wang, F. (2018). Pegylated liposomal-paclitaxel induces ovarian cancer cell apoptosis via TNF-induced ERK/AKT signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 17, 7497–7504.
- Rahman, M.M., and McFadden, G. (2006). Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens. *PLOS Pathog.* 2, e4.
- Rehm, M., Düssmann, H., and Prehn, J.H.M. (2003). Real-time single cell analysis of Smac/DIABLO release during apoptosis. *J. Cell Biol.* 162, 1031–1043.
- Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Bailey, J.M., McCallister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide, R.H., et al.

- (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148, 349–361.
- Richter-Larrea, J.A., Robles, E.F., Fresquet, V., Beltran, E., Rullan, A.J., Agirre, X., Calasanz, M.J., Panizo, C., Richter, J.A., Hernandez, J.M., et al. (2010). Reversion of epigenetically mediated BIM silencing overcomes chemoresistance in Burkitt lymphoma. *Blood* 116, 2531–2542.
- Rieder, C.L., and Maiato, H. (2004). Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev. Cell* 7, 637–651.
- Riley, J.S., Quarato, G., Cloix, C., Lopez, J., O’Prey, J., Pearson, M., Chapman, J., Sesaki, H., Carlin, L.M., Passos, J.F., et al. (2018). Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis. *EMBO J.* 37.
- Rivas, M.A., Carnevale, R.P., Proietti, C.J., Rosembit, C., Beguelin, W., Salatino, M., Charreau, E.H., Frahm, I., Sapia, S., Brouckaert, P., et al. (2008). TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways. *Exp. Cell Res.* 314, 509–529.
- Rodero, M.P., Tesser, A., Bartok, E., Rice, G.I., Mina, E.D., Depp, M., Beitz, B., Bondet, V., Cagnard, N., Duffy, D., et al. (2017). Type I interferon-mediated autoinflammation due to DNase II deficiency. *Nat. Commun.* 8, 2176.
- Rongvaux, A., Jackson, R., Harman, C.C.D., Li, T., West, A.P., de Zoete, M.R., Wu, Y., Yordy, B., Lakhani, S.A., Kuan, C.-Y., et al. (2014). Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell* 159, 1563–1577.
- Rosebeck, S., Sudini, K., Chen, T., and Leaman, D.W. (2011). Involvement of Noxa in mediating cellular ER stress responses to lytic virus infection. *Virology* 417, 293–303.
- Ryan, S.D., Britigan, E.M.C., Zasadil, L.M., Witte, K., Audhya, A., Roopra, A., and Weaver, B.A. (2012). Up-regulation of the mitotic checkpoint component Mad1 causes chromosomal instability and resistance to microtubule poisons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2205-2214.
- Saha, M.N., Jiang, H., Yang, Y., Reece, D., and Chang, H. (2013). PRIMA-1Met/APR-246 displays high antitumor activity in multiple myeloma by induction of p73 and Noxa. *Mol. Cancer Ther.* 12, 2331–2341.
- Saitoh, T., Fujita, N., Hayashi, T., Takahara, K., Satoh, T., Lee, H., Matsunaga, K., Kageyama, S., Omori, H., Noda, T., et al. (2009). Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20842–20846.
- Samwer, M., Schneider, M.W.G., Hoefler, R., Schmalhorst, P.S., Jude, J.G., Zuber, J., and Gerlich, D.W. (2017). DNA Cross-Bridging Shapes a Single Nucleus from a Set of Mitotic Chromosomes. *Cell* 170, 956-972.e23.
- Sarosiek, K.A., Fraser, C., Muthalagu, N., Bhola, P.D., Chang, W., McBrayer, S.K., Cantlon, A., Fisch, S., Golomb-Mello, G., Ryan, J.A., et al. (2017). Developmental Regulation of Mitochondrial Apoptosis by c-Myc Governs Age- and Tissue-Specific Sensitivity to Cancer Therapeutics. *Cancer Cell* 31, 142–156.
- Sasi, S.P., Bae, S., Song, J., Perepletchikov, A., Schneider, D., Carrozza, J., Yan, X., Kishore, R., Enderling, H., and Goukassian, D.A. (2014). Therapeutic non-toxic doses of TNF induce significant regression in TNFR2-p75 knockdown Lewis lung carcinoma tumor implants. *PLoS One* 9, e92373.
- Schirmer, E.C., and Gerace, L. (2002). Organellar proteomics: the prizes and pitfalls of opening the nuclear envelope. *Genome Biol.* 3, REVIEWS1008.
- Schweichel, J.U., and Merker, H.J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253–266.
- Séveno, C., Loussouarn, D., Bréchet, S., Campone, M., Juin, P., and Barillé-Nion, S. (2012). γ -Secretase inhibition promotes cell death, Noxa upregulation, and sensitization to BH3 mimetic ABT-737 in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. BCR* 14, R96.
- Shah, O.J., Lin, X., Li, L., Huang, X., Li, J., Anderson, M.G., Tang, H., Rodriguez, L.E., Warder, S.E., McLoughlin, S., et al. (2010). Bcl-XL represents a druggable molecular vulnerability during aurora B inhibitor-mediated polyploidization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12634–12639.
- Sheltzer, J.M. (2013). A transcriptional and metabolic signature of primary aneuploidy is present in chromosomally unstable cancer cells and informs clinical prognosis. *Cancer Res.* 73, 6401–6412.
- Shi, J., Zhou, Y., Huang, H.-C., and Mitchison, T.J. (2011). Navitoclax (ABT-263) Accelerates Apoptosis during Drug-Induced Mitotic Arrest by Antagonizing Bcl-xL. *Cancer Res.* 71, 4518–4526.
- Shi, W.-Y., Cao, C., and Liu, L. (2016). Interferon α Induces the Apoptosis of Cervical Cancer HeLa Cells by Activating both the Intrinsic

- Mitochondrial Pathway and Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **17**.
- Shibue, T., Takeda, K., Oda, E., Tanaka, H., Murasawa, H., Takaoka, A., Morishita, Y., Akira, S., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2003). Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev.* **17**, 2233–2238.
- Shimizu, S., Takehara, T., Hikita, H., Kodama, T., Miyagi, T., Hosui, A., Tatsumi, T., Ishida, H., Noda, T., Nagano, H., et al. (2010). The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **52**, 698–704.
- Silk, A.D., Zasadil, L.M., Holland, A.J., Vitre, B., Cleveland, D.W., and Weaver, B.A. (2013). Chromosome missegregation rate predicts whether aneuploidy will promote or suppress tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E4134–E4141.
- Simonetti, G., Bruno, S., Padella, A., Tenti, E., and Martinelli, G. (2019). Aneuploidy: Cancer strength or vulnerability? *Int. J. Cancer* **144**, 8–25.
- Singh, R., Letai, A., and Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 175.
- Sistigu, A., Yamazaki, T., Vacchelli, E., Chaba, K., Enot, D.P., Adam, J., Vitale, I., Goubar, A., Baracco, E.E., Remédios, C., et al. (2014). Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat. Med.* **20**, 1301–1309.
- Sliter, D.A., Martinez, J., Hao, L., Chen, X., Sun, N., Fischer, T.D., Burman, J.L., Li, Y., Zhang, Z., Narendra, D.P., et al. (2018). Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature* **561**, 258–262.
- Soderquist, R.S., Crawford, L., Liu, E., Lu, M., Agarwal, A., Anderson, G.R., Lin, K.H., Winter, P.S., Cakir, M., and Wood, K.C. (2018). Systematic mapping of BCL-2 gene dependencies in cancer reveals molecular determinants of BH3 mimetic sensitivity. *Nat. Commun.* **9**, 3513.
- Soto, A.M., and Sonnenschein, C. (2011). The tissue organization field theory of cancer: A testable replacement for the somatic mutation theory. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **33**, 332–340.
- Sprowl, J.A., Reed, K., Armstrong, S.R., Lanner, C., Guo, B., Kalatskaya, I., Stein, L., Hembruff, S.L., Tam, A., and Parissenti, A.M. (2012). Alterations in tumor necrosis factor signaling pathways are associated with cytotoxicity and resistance to taxanes: a study in isogenic resistant tumor cells. *Breast Cancer Res. BCR* **14**, R2.
- Stephens, P.J., Greenman, C.D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G.R., Mudie, L.J., Pleasance, E.D., Lau, K.W., Beare, D., Stebbings, L.A., et al. (2011). Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell* **144**, 27–40.
- Stingele, S., Stoehr, G., Peplowska, K., Cox, J., Mann, M., and Storchova, Z. (2012). Global analysis of genome, transcriptome and proteome reveals the response to aneuploidy in human cells. *Mol. Syst. Biol.* **8**, 608.
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V., and Hershko, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell* **6**, 185–197.
- Sudakin, V., Chan, G.K.T., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.* **154**, 925–936.
- Sudo, T., Nitta, M., Saya, H., and Ueno, N.T. (2004). Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Res.* **64**, 2502–2508.
- Sun, Y., and Leaman, D.W. (2005). Involvement of Noxa in cellular apoptotic responses to interferon, double-stranded RNA, and virus infection. *J. Biol. Chem.* **280**, 15561–15568.
- Suzuki, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**, 645–654.
- Swanton, C., Nicke, B., Schuett, M., Eklund, A.C., Ng, C., Li, Q., Hardcastle, T., Lee, A., Roy, R., East, P., et al. (2009). Chromosomal instability determines taxane response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8671–8676.
- Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T., and Dyke, T.V. (1994). p53-Dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* **78**, 703–711.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 621–632.
- Tait, S.W.G., Parsons, M.J., Llambi, F., Bouchier-Hayes, L., Connell, S., Muñoz-Pinedo, C., and Green, D.R. (2010). Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Dev. Cell* **18**, 802–813.

- Tait, S.W.G., Ichim, G., and Green, D.R. (2014). Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci* *127*, 2135–2144.
- Tan, N., Malek, M., Zha, J., Yue, P., Kassees, R., Berry, L., Fairbrother, W.J., Sampath, D., and Belmont, L.D. (2011). Navitoclax enhances the efficacy of taxanes in non-small cell lung cancer models. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 1394–1404.
- Tanaka, Y., and Chen, Z.J. (2012). STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci. Signal.* *5*, ra20.
- Terradas, M., Martín, M., Tusell, L., and Genescà, A. (2009). DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective-damage response. *DNA Repair* *8*, 1225–1234.
- Topham, C., Tighe, A., Ly, P., Bennett, A., Sloss, O., Nelson, L., Ridgway, R.A., Huels, D., Littler, S., Schandl, C., et al. (2015). MYC Is a Major Determinant of Mitotic Cell Fate. *Cancer Cell* *28*, 129–140.
- Vanamee, É.S., and Faustman, D.L. (2017). TNFR2: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. *Trends Mol. Med.* *23*, 1037–1046.
- Vassalli, P. (1992). The Pathophysiology of Tumor Necrosis Factors. *Annu. Rev. Immunol.* *10*, 411–452.
- Véquaud, E., Séveno, C., Loussouarn, D., Engelhart, L., Campone, M., Juin, P., and Barillé-Nion, S. (2015). YM155 potently triggers cell death in breast cancer cells through an autophagy-NF- κ B network. *Oncotarget* *6*, 13476–13486.
- Verfaillie, T., van Vliet, A., Garg, A.D., Dewaele, M., Rubio, N., Gupta, S., de Witte, P., Samali, A., and Agostinis, P. (2013). Pro-apoptotic signaling induced by photo-oxidative ER stress is amplified by Noxa, not Bim. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *438*, 500–506.
- Vlahovic, G., Karantza, V., Wang, D., Cosgrove, D., Rudersdorf, N., Yang, J., Xiong, H., Busman, T., and Mabry, M. (2014). A phase I safety and pharmacokinetic study of ABT-263 in combination with carboplatin/paclitaxel in the treatment of patients with solid tumors. *Invest. New Drugs* *32*, 976–984.
- Vogler, M., Hamali, H.A., Sun, X.-M., Bampton, E.T.W., Dinsdale, D., Snowden, R.T., Dyer, M.J.S., Goodall, A.H., and Cohen, G.M. (2011). BCL2/BCL-X(L) inhibition induces apoptosis, disrupts cellular calcium homeostasis, and prevents platelet activation. *Blood* *117*, 7145–7154.
- Vuillier, C., Lohard, S., Fétiveau, A., Allègre, J., Kayaci, C., King, L.E., Braun, F., Barillé-Nion, S., Gautier, F., Dubrez, L., et al. (2018). E2F1 interacts with BCL-xL and regulates its subcellular localization dynamics to trigger cell death. *EMBO Rep.* *19*, 234–243.
- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., and Boldin, M.P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 331–367.
- Walsh, J.H., Karnes, W.E., Cuttitta, F., and Walker, A. (1991). Autocrine growth factors and solid tumor malignancy. *West. J. Med.* *155*, 152–163.
- Wang, Q., Li, L., and Ye, Y. (2008). Inhibition of p97-dependent protein degradation by Eeyarestatin I. *J. Biol. Chem.* *283*, 7445–7454.
- Wang, R., Davidoff, A.M., and Pfeffer, L.M. (2016). Bortezomib sensitizes human glioblastoma cells to induction of apoptosis by type I interferons through NOXA expression and Mcl-1 cleavage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *478*, 128–134.
- Wang, Z., Katsaros, D., Shen, Y., Fu, Y., Canuto, E.M., Benedetto, C., Lu, L., Chu, W.-M., Risch, H.A., and Yu, H. (2015). Biological and Clinical Significance of MAD2L1 and BUB1, Genes Frequently Appearing in Expression Signatures for Breast Cancer Prognosis. *PLoS One* *10*, e0136246.
- Weaver, B.A.A., and Cleveland, D.W. (2005). Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell* *8*, 7–12.
- Weaver, B.A.A., and Cleveland, D.W. (2006). Does aneuploidy cause cancer? *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 658–667.
- Weaver, B.A.A., Silk, A.D., Montagna, C., Verdier-Pinard, P., and Cleveland, D.W. (2007). Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell* *11*, 25–36.
- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* *14*, 2060–2071.
- West, A.P., Khoury-Hanold, W., Staron, M., Tal, M.C., Pineda, C.M., Lang, S.M., Bestwick, M., Duguay, B.A., Raimundo, N., MacDuff, D.A., et al. (2015). Mitochondrial DNA Stress Primes the Antiviral Innate Immune Response. *Nature* *520*, 553–557.

- White, M.J., McArthur, K., Metcalf, D., Lane, R.M., Cambier, J.C., Herold, M.J., van Delft, M.F., Bedoui, S., Lessene, G., Ritchie, M.E., et al. (2014). Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. *Cell* 159, 1549–1562.
- Wiederschain, D., Kawai, H., Shilatifard, A., and Yuan, Z.-M. (2005). Multiple mixed lineage leukemia (MLL) fusion proteins suppress p53-mediated response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 280, 24315–24321.
- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 19, 1294–1305.
- Wright, L.L., Cunningham, T.J., and Smolen, A.J. (1983). Developmental neuron death in the rat superior cervical sympathetic ganglion: cell counts and ultrastructure. *J. Neurocytol.* 12, 727–738.
- Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 339, 826–830.
- Xargay-Torrent, S., López-Guerra, M., Saborit-Villarroya, I., Rosich, L., Campo, E., Roué, G., and Colomer, D. (2011). Vorinostat-induced apoptosis in mantle cell lymphoma is mediated by acetylation of proapoptotic BH3-only gene promoters. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 3956–3968.
- Xia, T., Konno, H., Ahn, J., and Barber, G.N. (2016a). Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis. *Cell Rep.* 14, 282–297.
- Xia, T., Konno, H., and Barber, G.N. (2016b). Recurrent Loss of STING Signaling in Melanoma Correlates with Susceptibility to Viral Oncolysis. *Cancer Res.* 76, 6747–6759.
- Yamada, H.Y., and Gorbsky, G.J. (2006). Spindle checkpoint function and cellular sensitivity to antimitotic drugs. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2963–2969.
- Yang, F., Zhao, Z., and Zhao, N. (2017a). Clinical implications of tumor necrosis factor receptor 2 in breast cancer. *Oncol. Lett.* 14, 2393–2398.
- Yang, H., Wang, H., Ren, J., Chen, Q., and Chen, Z.J. (2017b). cGAS is essential for cellular senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E4612–E4620.
- Yates, L.R., Gerstung, M., Knappskog, S., Desmedt, C., Gundem, G., Loo, P.V., Aas, T., Alexandrov, L.B., Larsimont, D., Davies, H., et al. (2015). Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. *Nat. Med.* 21, 751–759.
- Yoneyama, M., Onomoto, K., Jogi, M., Akaboshi, T., and Fujita, T. (2015). Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 32, 48–53.
- Yonish-Rouach, E., Resnftzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345.
- Yoshida, H., Okabe, Y., Kawane, K., Fukuyama, H., and Nagata, S. (2005). Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. *Nat. Immunol.* 6, 49–56.
- Yoshihara, K., Shahmoradgoli, M., Martínez, E., Vegesna, R., Kim, H., Torres-Garcia, W., Treviño, V., Shen, H., Laird, P.W., Levine, D.A., et al. (2013). Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data. *Nat. Commun.* 4, 2612.
- Yuan, B., Xu, Y., Woo, J.-H., Wang, Y., Bae, Y.K., Yoon, D.-S., Wersto, R.P., Tully, E., Wilsbach, K., and Gabrielson, E. (2006). Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 405–410.
- Zakeri, Z., Quaglino, D., and Ahuja, H.S. (1994). Apoptotic cell death in the mouse limb and its suppression in the hammertoe mutant. *Dev. Biol.* 165, 294–297.
- Zall, H., Weber, A., Besch, R., Zantl, N., and Häcker, G. (2010). Chemotherapeutic drugs sensitize human renal cell carcinoma cells to ABT-737 by a mechanism involving the Noxa-dependent inactivation of Mcl-1 or A1. *Mol. Cancer* 9, 164.
- Zasadil, L.M., Andersen, K.A., Yeum, D., Rocque, G.B., Wilke, L.G., Tevaarwerk, A.J., Raines, R.T., Burkard, M.E., and Weaver, B.A. (2014). Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. *Sci. Transl. Med.* 6, 229ra43.
- Zasadil, L.M., Britigan, E.M.C., Ryan, S.D., Kaur, C., Guckenberger, D.J., Beebe, D.J., Moser, A.R., and Weaver, B.A. (2016). High rates of chromosome missegregation suppress tumor progression but do not inhibit tumor initiation. *Mol. Biol. Cell* 27, 1981–1989.
- Zervantonakis, I.K., Iavarone, C., Chen, H.-Y., Selfors, L.M., Palakurthi, S., Liu, J.F., Drapkin, R., Matulonis, U., Levenson, J.D., Sampath, D., et al. (2017). Systems

- analysis of apoptotic priming in ovarian cancer identifies vulnerabilities and predictors of drug response. *Nat. Commun.* **8**, 365.
- Zhang, C.-Z., Spektor, A., Cornils, H., Francis, J.M., Jackson, E.K., Liu, S., Meyerson, M., and Pellman, D. (2015). Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature* **522**, 179–184.
- Zhang, X., Shi, H., Wu, J., Zhang, X., Sun, L., Chen, C., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Mol. Cell* **51**, 226–235.
- Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.-C., LeBleu, V.S., and Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* **527**, 525–530.
- Zhu, L., Lu, Z., and Zhao, H. (2015). Antitumor mechanisms when pRb and p53 are genetically inactivated. *Oncogene* **34**, 4547–4557.
- Zhu, Y., Zhou, Y., and Shi, J. (2014). Post-slippage multinucleation renders cytotoxic variation in anti-mitotic drugs that target the microtubules or mitotic spindle. *Cell Cycle Georget. Tex* **13**, 1756–1764.
- Zierhut, C., and Funabiki, H. (2017). The cytoplasmic DNA sensor cGAS promotes mitotic cell death. *BioRxiv* 168070.
- Zullo, J.M., Demarco, I.A., Piqué-Regi, R., Gaffney, D.J., Epstein, C.B., Spooner, C.J., Luperchio, T.R., Bernstein, B.E., Pritchard, J.K., Reddy, K.L., et al. (2012). DNA sequence-dependent compartmentalization and silencing of chromatin at the nuclear lamina. *Cell* **149**, 1474–1487.

IX. Annexes

Durant ma thèse, j'ai également eu l'occasion de travailler sur d'autres projets contribuant ainsi à la publication de deux d'entre eux :

Dioum MD, Seck M, Silvestre V, Planchat A, Loquet D, **Lohard S**, Barille-Nion S, Remaud GS, Robins RJ, Tea I. (2016). A Ring-D-Seco-Tetranortriterpenoid from Seeds of *Carapa procera* Active against Breast Cancer Cell Lines. *Planta Med*, 82(11-12):967-72.

Vuillier C, **Lohard S**, Fétiveau A, Allègre J, Kayaci C, King LE, Braun F, Barillé-Nion S, Gautier F, Dubrez L, Gilmore AP, Juin PP, Maillet L. (2018). E2F1 interacts with BCL-xL and regulates its subcellular localization dynamics to trigger cell death. *EMBO Rep*. 19(2):234-243.

Dans les travaux de Dioum et al., mon travail a consisté à évaluer les effets anti-tumoraux de molécules extraites des graines de l'arbre *Carapa Procera* sur des lignées de cellules cancéreuses mammaires humaines. J'ai pour cela effectué des tests de clonogénicité et mesuré les IC₅₀ (Concentrations Inhibitrices médianes) de ces molécules.

Dans les travaux de Vuillier et al., j'ai mis au point un modèle d'étude qui a permis de démontrer que le facteur de transcription E2F1 peut induire une MOMP indépendamment de son activité transcriptionnelle. Ce modèle d'étude correspond à la lignée MDA-MB-231 exprimant de façon stable une protéine OMI couplée au fluorochrome mCherry. Après survenue d'une MOMP, la protéine OMI-mCherry située dans l'IMS est relarguée dans le cytosol ou sa rapide dégradation entraîne la perte de la fluorescence de la cellule. La quantification de la MOMP peut ainsi être réalisée par microscopie ou cytométrie en flux. J'ai de plus participé aux travaux demandés lors de la révision de l'article dans le journal *EMBO report*.

Titre : propagation d'un signal pro-apoptotique paracrine via la voie cGAS/STING lors des chimiothérapies antiméitotiques

Mots clés : Cancers du sein, Apoptose, Antiméitotiques, STING, Famille BCL-2

Résumé : une action fascinante mais non caractérisée de la chimiothérapie antiméitotique consiste à induire une apoptose mitochondriale collective, bien que n'impactant que la sous-population cellulaire proliférante. Nous montrons ici que les réponses apoptotiques aiguës au paclitaxel de cultures organotypiques de tumeurs mammaires humaines et de xénogreffes dérivées de patientes s'associent à des signatures d'expression génique marquant une exposition au TNF α et aux IFN de type I. Ces cytokines sont sécrétées par les cellules cancéreuses présentant des micronoyaux induits par le traitement antiméitotique et détectés par le senseur de l'ADN cytosolique cGAS et conservant une intégrité mitochondriale malgré la pression apoptotique intrinsèque au traitement antiméitotique. Ces cytokines déclenchent dans les cellules tumorales voisines l'expression de NOXA, inhibiteur de MCL-1, responsable d'un effet pro-apoptotique paracrine révélé par une sensibilisation au BH3 mimétiques ciblant BCL-xL. Cet effet dépendant de la voie cGAS/STING est nécessaire pour la réponse au paclitaxel *in vivo*, qui est elle-même amplifiée par l'administration séquentielle, mais non synchrone, de BH3 mimétiques ciblant BCL-xL.

Title: proapoptotic signal spreading through cGAS/STING signaling pathway upon antimetotic-based chemotherapies

Keywords: Breast cancers, Apoptosis, Antimetotic, STING, BCL-2 family

Abstract: a fascinating but uncharacterized action of anti-mitotic chemotherapy is to collectively prime cancer cells to apoptotic mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), while impacting only on cycling cell subsets. Here, we show that acute apoptotic responses to paclitaxel of organotypic cultures of primary human breast tumors and of patient-derived xenografts associate with gene expression signatures marking exposure to type I IFN and TNF α . These cytokines are secreted by micronuclei-positive cGAS/STING-active cancer cells maintaining mitochondrial integrity despite intrinsic apoptotic pressure during anti-mitotic treatment. In turn, they trigger pro-apoptotic NOXA expression in neighboring cells. STING-dependent apoptotic effects are required for paclitaxel response *in vivo*, and they are amplified by sequential, but not synchronous, administration of BH3 mimetics.