UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DES SCIENCES MEDICALES

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

Année 2011 N°

Impact des voies pRb/E2F1 et p53 dans la réponse à l'ABT-737 dans les cellules cancéreuses

Thèse de doctorat

Discipline : Biologie, médecine et santé

Spécialité : Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement par

Joséphine BERTIN

Le 04 novembre 2011, devant le jury ci-dessous

Président	Pr Bernard Mignotte, Professeur, LGBC - UVSQ, Versailles
Rapporteurs	Pr Bernard Mignotte, Professeur, LGBC - UVSQ, Versailles
	Dr Pierre Roux, Directeur de Recherche, CRBM – UMR5237, Montpellier
Examinateurs	Dr Laurent Poulain, Cadre de Recherche, EA 1772, Caen
	Dr Frédéric Blanchard, Chargé de Recherche, U957, Nantes
Directeurs de thèse	Dr Frédérique Braun, MCU, CRCNA – U892, Nantes
	Dr Philippe Juin, Directeur de Recherche, CRCNA – U892, Nantes

Table des matières

Table des matières 2

Liste des figures..... 6

Introduction 9

A – La tumorigénèse.....10

1- Généralités.....10

2- La progression tumorale.....10

2-1 La prolifération accrue des cellules cancéreuses.....12

2-2 Mécanismes suppresseurs de tumeur 14

B – L'apoptose.....18

1- Généralité 18

2- Le déroulement de l'apoptose chez les mammifères.....19

2-1 La voie extrinsèque.....19

2-2 La voie intrinsèque.....21

3- Les caspases 22

4- La famille Bcl-2.....24

4-1 Structure des protéines de la famille Bcl-2.....24

4-2 Activation des protéines pro-apoptotiques : exemple de Bax 27

4-3 La régulation des interactions protéine-protéine : l'importance des BH3-seul 29

4-4 Les BH3 mimétiques.....30

5- Les rôles atypiques de Bcl-2 et Bcl-xL.....34

5-1 Bcl-2/Bcl-xL dans l'autophagie.....34

5-2 Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 dans la régulation du cycle cellulaire 34

5-3 Bcl-2 dans la réparation de l'ADN 35

5-4 Les protéines de la famille Bcl-2 et p53 37

C – La voie pRb/E2F1.....38

1- Les facteurs de transcription E2F et leur régulateur pRb.....38

1-1 Les facteurs de transcription E2F 38
1-2 La protéine pRb 40
1-3 Fonction majeure des protéines pRb et E2F : régulation du cycle cellulaire.....42
2- La voie pRb/E2F1 dans les mécanismes suppresseurs de tumeur.....43
2-1 La sénescence 43
2-2 L'autophagie 44
2-3 L'apoptose 44
2-3-1 Les voies apoptotiques déclenchées par E2F1 44
2-3-2 La liaison spécifique pRb/E2F1 46
2-3-3 Le clivage de pRb par les caspases 49
2-3-4 La dualité de pRb dans l'apoptose 53
3- La régulation des protéines pRb et E2F1 55
3-1 La phosphorylation 55
3-2 L'acétylation et la méthylation 57
3-3 Régulation de pRb et E2F1 par Mdm2 59
D – La protéine p53 60
1- La famille de p53 60
1-1 Structure de p53 60
1-2 Les homologues de p53 : p73 et p63 64
2- Les activités biologiques de p53 66
2-1 p53 nucléaire 66
2-2 p53 cytoplasmique 68
3- La régulation de p53 70
3-1 La phosphorylation 71
3-2 L'acétylation 72
3-3 L'ubiquitination 74
4- Les mutants de p53 75
4-1 Les mutants de p53 75
4-2 Les molécules pharmacologiques ciblant p53 78

E – Les objectifs de la thèse 81

Résultats 83

A – L'induction de Noxa dépendante des caspases, mais aussi d'E2F1, favorise le déclenchement de la mort cellulaire par l'ABT-737 84

1- Article : "A caspase and E2F-1 dependent feed forward mechanism of Noxa induction favors activation of cell death by the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737" 85

2- E2F1 peut se complexer avec Bcl-xL mais pas avec Bcl-2 ou Mcl-1 dans les cellules U251.....113

B – p53, de manière non transcriptionnelle, favorise la mort cellulaire induite par l'ABT-737 dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ 115

1- p53, contrairement à E2F1, est un acteur majeur de l'apoptose induite par l'ABT-737, dans les cellules exprimant un p53 sauvage.....116

1-1 p53 est impliqué dans la mort induite par l'ABT-737 mais pas E2F1 dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ 116

1-2 La surexpression de p53 endogène dans les cellules HCT116 suffit à sensibiliser ces cellules à l'ABT-737.....117

1-3 La surexpression de p53 ectopique dans les cellules HCT116 p53$^{-/-}$ suffit à sensibiliser ces cellules à l'ABT-737 119

2- L'activité transcriptionnelle de p53 n'est pas requise dans les processus apoptotiques induits par l'ABT-737.....120

2-1 Bax et Puma ne sont pas induits sous ABT-737 dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ 120

2-2 L'activité transcriptionnelle de p53 n'est pas induite sous ABT-737 dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ 121

Discussion.....123

Partie I : Induction de Noxa dépendante de pRb et E2F1 sous ABT-737 126

Partie II : p53, acteur majeur de la mort cellulaire induite par l'ABT-737. 134

Conclusion générale 137

Bibliographie 138

Annexes 153

Annexe 1 : Matériels et Méthodes.....154

Annexe 2 : « Serum-Nutrient Starvation Induces Cell Death Mediated by Bax and Puma That Is Counteracted by p21 and Unmasked by Bcl-x(L) Inhibition » 160

Liste des figures

Figure 1 : Les caractéristiques biologiques du cancer 12
Figure 2 : Les kinases cycline-dépendante contrôle le cycle.....14
Figure 3 : Les Hayflick facteurs 16
Figure 4 : L'autophagie chez les mammifères 17
Figure 5 : Modèle moléculaire de l'activation de l'apoptose chez *C. Elegans* 20
Figure 6 : La voie extrinsèque de l'apoptose 21
Figure 7 : la voie intrinsèque de l'apoptose.....23
Figure 8 : la famille des caspases et leur clivage.....24
Figure 9 : Représentation des protéines de la famille Bcl-2 et leurs domaines BH 26
Figure 10 : Structure 3D des protéines Bcl-xL et Bax 27
Figure 11 : Représentation de l'activation de Bax.....29
Figure 12 : L'apoptose induite par les protéines Bcl-2 ou par les BH3 mimétiques.....32
Figure 13 : Structure chimique de différents composés inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.....34
Figure 14 : Voies de réparation de l'ADN activées selon le type de modification de l'ADN ...37
Figure 15 : les facteurs de transcription de la famille E2F.....40
Figure 16 : Structure de la protéine pRb.....43
Figure 17 : E2F1 régule le niveau de p53 et son activité 46
Figure 18 : interactions de pRb avec E2F1 au niveau du site spécifique et du site général ..48
Figure 19 : Model de régulation de l'interaction de pRb et E2F par la phosphorylation.....49
Figure 20 : Différentes formes tronquées de pRb avec les sites de clivage des caspases....51
Figure 21 : Déclenchement séquentiel de l'apoptose 52
Figure 22 : Model de clivage en deux étapes de la protéine pRb lors de l'apoptose induite par l'étoposide 53
Figure 23 : Modèle de la régulation par le complexe pRb/E2F1 des gènes impliqués dans l'apoptose ou dans la prolifération en réponse aux dommages à l'ADN.....56
Figure 24 : Localisation des sites de phosphorylation de pRb étudiés par mutagénèse.....57
Figure 25 : La phosphorylation de pRb dans la transition G1-S.....58
Figure 26 : Les domaines structuraux de p53.....62
Figure 27 : p53 humain.....64
Figure 28 : p73 et p63 humain.....66
Figure 29 : p53 contribue à de nombreux processus normaux et pathologiques par son activité transcriptionnelle 68
Figure 30 : Complémentarité des fonctions nucléaires et cytoplasmiques de p53 71

Figure 31 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de p53 ainsi que ses modifications post-traductionnels....72
Figure 32 : les combinaisons des modifications post-traductionnelles de p53 et ses interactions protéine-protéine contrôle le devenir de la cellule....74
Figure 33 : Répartition des mutations somatiques de TP53 en accord avec la base de données IARC TP53....77
Figure 34 : Formation d'agrégats par les protéines p53 mutées....78
Figure 35 : Structure des petites molécules développées pour activer ou réactiver p53....81
Figure 36 (Figure 1 de l'article) : ABT-737 induced a caspase and Bax dependent cell death in U251....105
Figure 37 (figure 2 de l'article) : The BH3-only Noxa is involved in cell death in response to ABT-737....104
Figure 38 (figure 3 de l'article) : E2F-1 and pRb is involved in the induction of cell death and of Noxa level....107
Figure 39 (figure 4 de l'article) : pRb is cleaved under ABT-737 and this cleavage is Bcl-2, Bcl-xL and Bax dependant....108
Figure 40 (figure 5 de l'article) : pRb cleavage and Noxa induction are caspase dependant....109
Figure 41 (figure 6 de l'article) : pRb and E2F-1 interact together and bind to Noxa and p73 promoter....110
Figure 42 (figure 7 de l'article) : Nutlin-3 sensitizes MDA-MB-231 cells to ABT-737 and this combination up-regulates Noxa....111
Figure 41 (figure S1 de l'article) : E2F1 induction sensitizes HCT116 p53-/- to ABT-737....112
Figure 41 (figure S2 de l'article) : The BH3-only Noxa, but not Puma, is involved in cell death in response to ABT-737....113
Figure 43 : Interaction des proteines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et E2F1....115
Figure 44 : La mort induite par l'ABT-737 dans les cellules HCT116 $p21^{-/-}$ est dépendante de Bax et de Puma....116
Figure 45 : p53, contrairement à E2F1, est impliqué dans la mort induite par l'ABT-737 dans les HCT116 $p21^{-/-}$....118
Figure 46 : La diminution de p21 dans les cellules HCT116 ne sensibilise pas celles-ci à l'ABT-737....119
Figure 47 : La surexpression de p53 dans les cellules HCT116 sensibilise celles-ci à l'ABT-737....120
Figure 48 : La surexpression de p53 dans les cellules HCT116 $p53^{-/-}$ sensibilise celles-ci à l'ABT-737....121

Figure 49 : L'activité transcriptionnelle de p53 n'est pas impliquée dans la mort cellulaire induite par l'ABT-737 123
Figure 50 : Interaction des deux voies de signalisation p53 et pRb/E2F1 en amont et en aval des deux facteurs de transcription 126
Figure 51 : Boucle d'activation tardive, amplificatrice de la réponse à l'ABT-737, impliquant les caspases, pRb/E2F1 et Noxa 134

Introduction

A – La tumorigénèse

1- Généralités

Le cancer, contrairement aux idées reçues, n'est pas une maladie moderne. Les plus anciennes descriptions proviennent de papyrus et décrivent des tumeurs trouvées sur des momies : un papyrus, datant de 3000 à 2000 ans av. J.-C., décrit des tumeurs et des ulcères du sein traités par cautérisation. Plus tard, on retrouvera cette maladie décrite dans des écrits datant de la Grèce, la Rome et la Perse antique ainsi que dans des textes médiévaux. Hyppocrate, médecin grec très célèbre, décrivit des lésions de type cancéreux qui touchaient la peau, le sein, l'estomac, le col de l'utérus et le rectum et en établit une classification. Plus tard, John of Arderne, chirurgien anglais durant la Guerre de Cent Ans décrivit les symptômes du carcinome du rectum avec ses hémorragies et obstructions, mais il ne put jamais en guérir un seul. En revanche, il est vrai que l'augmentation significative de l'espérance de vie lors de ce dernier siècle, a contribué à faire du cancer une maladie commune dans le monde. Auparavant, la population mourrait avant d'atteindre un âge où les cancers sont les plus fréquents. En effet, on estime qu'entre 35 et 65 ans, le cancer est la maladie mortelle la plus fréquente.

Le cancer est une maladie en augmentation. Cette augmentation s'est accélérée ces dernières années avec un doublement mondial du nombre de malades entre 1970 et 2000. Depuis 2004, le cancer a pris la place des maladies cardio-vasculaires au premier rang des causes de mortalité prématurée. Il touche un homme sur deux et une femme sur trois dans le monde.

Une recherche active permettant une meilleure compréhension des mécanismes contribuant au développement des cancers, a permis de mettre en place des dépistages précoces, des diagnostics plus fins et des traitements thérapeutiques ciblés. Ceci a permis de diminuer de 25%, en France, le risque de mourir d'un cancer. Aujourd'hui, un des axes majeurs de la recherche contre le cancer, est de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués dans cette maladie, permettant l'apparition par la suite de nouvelles classes de médicaments, de nouveaux tests diagnostiques et une meilleure classification des cancers.

2- La progression tumorale

Le cancer est une maladie complexe avec une variabilité importante d'un cancer à l'autre. On peut néanmoins dégager certaines caractéristiques communes typiques dans le développement d'un cancer. En 2000, D.Hanahan et al. ont proposé six grandes

caractéristiques biologiques du cancer (figure 1), permettant à une tumeur de se développer et par la suite d'envahir les autres tissus en formant des métastases. Ces six altérations essentielles dans le développement d'un cancer comprennent : le maintien des signaux de prolifération, l'acquisition de pouvoir se répliquer indéfiniment, l'évitement des signaux inhibiteurs de croissance, la résistance à la mort cellulaire, l'induction de l'angiogenèse et l'activation de l'invasion et la formation de métastase. Récemment, D.Hanahan et al. ont réactualisé ces données en prenant en compte les avancées de ces dix dernières années. De cette étude, deux caractéristiques cruciales pour l'acquisition de ces altérations ont été décrites : l'instabilité génomique qui génère un grand nombre de mutations dans les tumeurs et l'inflammation dirigée par les cellules du système immunitaire qui promeut la progression tumorale. De plus, deux altérations essentielles dans les cancers ont été ajoutées au six déjà décrites : la reprogrammation du métabolisme énergétique de la cellule et la résistance des cellules cancéreuses à l'attaque et à leur élimination par les cellules immunitaires. Enfin, la tumeur n'est pas uniquement constituée de cellules cancéreuses, elle englobe aussi des cellules saines constituant le microenvironnement de la tumeur qui participent d'une certaine mesure à l'acquisition des altérations essentielles au développement de celle-ci (Hanahan and Weinberg, 2011).

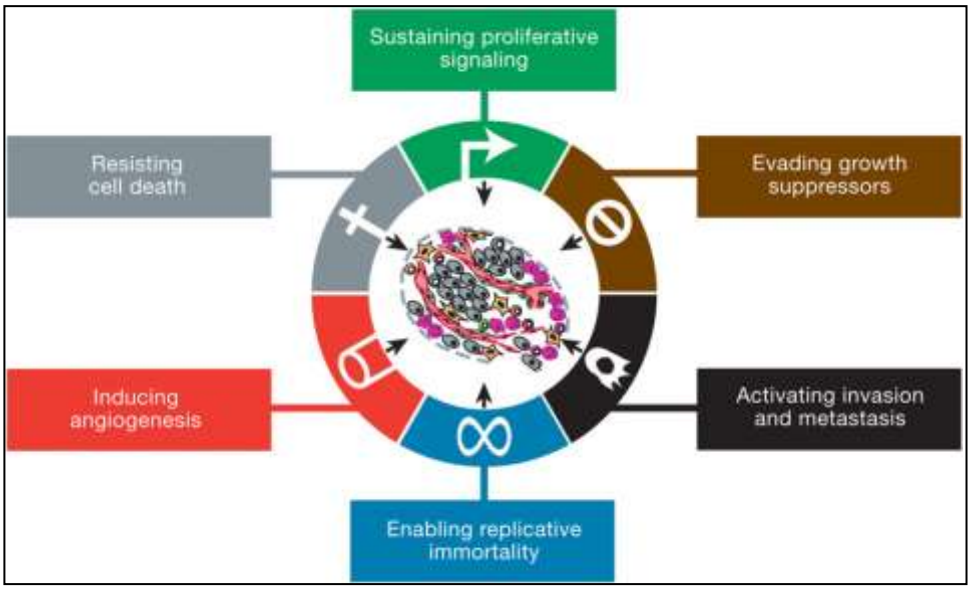


Figure 1 : Les caractéristiques biologiques du cancer. Le schéma illustre les 6 altérations biologiques s'opérant lors du développement d'un cancer (Hanahan and Weinberg, 2000).

L'échappement aux signaux inhibiteurs de croissance et la résistance à la mort cellulaire sont deux phénomènes étroitement liés de par leur régulation. Ces deux altérations provoquent une prolifération dérégulée et confèrent aux cellules cancéreuses une résistance accrue aux traitements anticancéreux. De nombreuses protéines sont impliquées à la fois dans la régulation de la prolifération et de la mort comme p53 et pRb, deux protéines suppresseurs de tumeur. Ces types de protéines vont avoir pour rôle de diriger le devenir de la cellule soit vers la prolifération et donc la poursuite dans le cycle cellulaire, soit déclencher des processus de mort si l'avenir de la cellule est compromis. Lors de la tumorigénèse, les voies de signalisation régulant ces phénomènes biologiques sont compromises. Dans la cellule cancéreuse, les voies de signalisation permettant la prolifération vont être suractivées alors que les voies de signalisation permettant la mort vont être inhibées.

2-1 La prolifération accrue des cellules cancéreuses

La plupart des cellules d'un organisme adulte sont quiescentes, elles ne se divisent pas (phase G0). Le passage des cellules de la phase quiescente à la phase proliférative nécessite une entrée dans le cycle cellulaire déclenchée par des signaux mitogéniques externes ou internes. Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases. Durant deux de ces phases, s'exécutent les événements essentiels de la division cellulaire : la synthèse d'une copie du matériel génétique (phase S pour synthèse) et la division de la cellule et de ses composants en deux cellules filles identiques (phase M pour mitose). Entre ces deux phases se trouvent les deux phases G1 et G2 (G pour « gap ») préparant respectivement les cellules aux phases S et M (figure 2). Un des mécanismes majeurs lors de la carcinogenèse est une prolifération accrue des cellules tumorales, due à une accumulation de mutations conduisant à des signaux mitogéniques constitutifs et une absence de réponses aux signaux anti-mitogéniques. Au niveau moléculaire, ces défauts du cycle cellulaire provoquant une prolifération non contrôlée sont dus, directement ou indirectement, à une dérégulation des kinases dépendantes des cyclines (Cdk). Ces sérine/thréonine kinases jouent un rôle essentiel dans le déclenchement et le contrôle des différentes phases du cycle. Il existe trois Cdk interphasiques, Cdk2, Cdk4 et Cdk6 et une Cdk mitotique Cdk1 qui régulent directement le cycle cellulaire. Ces Cdk sont actives lorsqu'elles sont complexées avec leurs sous unités régulatrices, les cyclines. Elles sont régulées par quatre types de cycline, les cyclines de type A, B, D et E (figure 2). Ces cyclines ont une durée de vie courte et sont synthétisées et dégradées à des temps spécifiques au cours du cycle, ce qui permet une activité des Cdk finement régulée dans le temps (Malumbres and Barbacid, 2009).

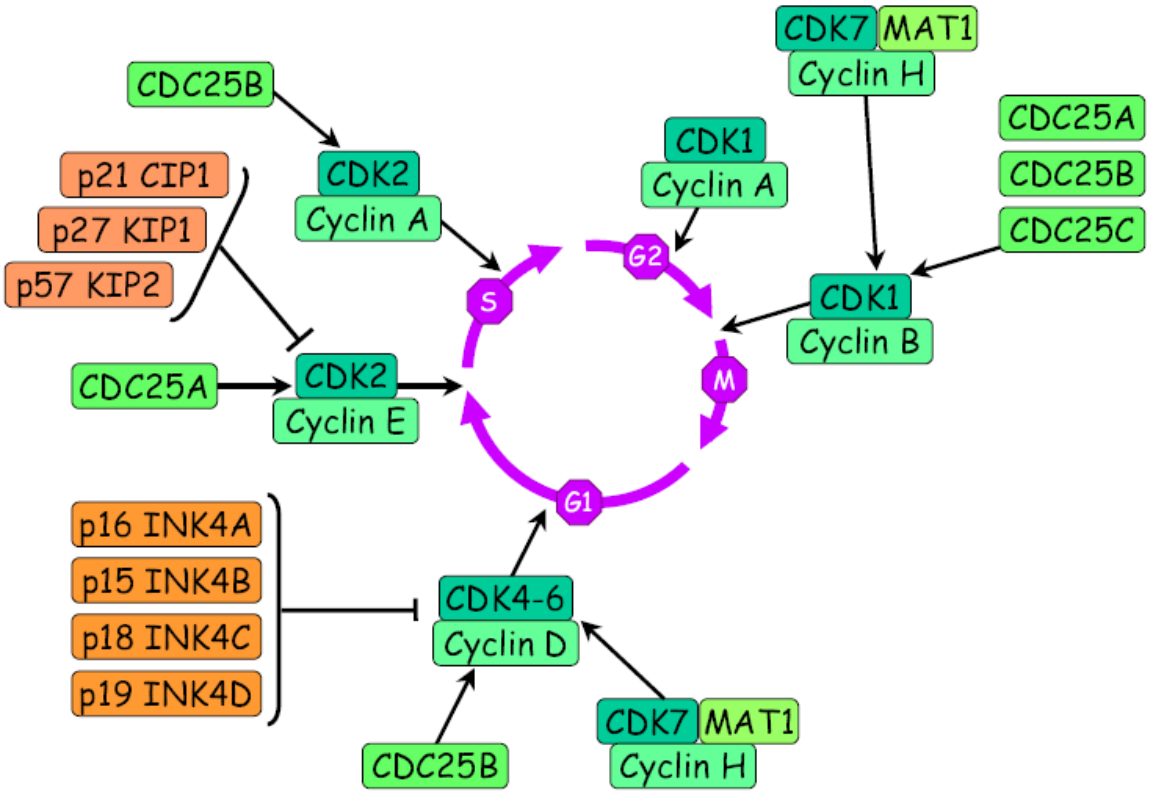


Figure 2 : Les kinases cycline-dépendante contrôlent le cycle. Les kinases dépendantes des cyclines (CDK) associées aux cyclines contrôlent les différentes étapes du cycle. Elles sont elles-mêmes régulées par phosphorylation par le complexe CDK7/MAT1/cycline H et par déphosphorylation par les CDC25 A, B et C. Les CDK peuvent aussi être régulées par des inhibiteurs protéiques des familles INK4 et Cip/Kip (Meijer, 2003)

L'activité des complexes cycline/Cdk est contrôlée via leur phosphorylation par le complexe CDK7/cycline H/Mat 1, via leur déphosphorylation par les CDC25 et via leur association avec des inhibiteurs protéiques, les CKI (cyclin-dependant kinase inhibitor), regroupant les familles INK4 et Cip/Kip (Sherr and Roberts, 1999). La famille des INK4 (inhibitor of Cdk4) qui comprend $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$ et $p19^{INK4d}$ interagit spécifiquement avec les Cdk4 et 6 et empêche ainsi leur liaison à la cycline D. La famille Cip/Kip qui comprend $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$ et $p57^{KIP2}$, se fixe sur les complexes Cdk/cyclines et les inactive. $p21^{CIP1}$ est l'un des principaux médiateurs du cycle cellulaire en réponse au stress. Si $p21^{CIP1}$ n'est généralement pas muté, son expression est altérée du fait de mutations portant sur p53, facteur de transcription important pour $p21^{CIP1}$. La mutation du gène suppresseur de tumeur TP53 est la mutation la plus courante, elle est présente dans environ 50% des cancers. Dans les cellules saines, la protéine p53 est activée lorsque l'ADN est endommagé et permet, via p21, un arrêt du cycle, voir même le déclenchement de la mort lorsque les dommages sont trop importants.

Les régulateurs du cycle cellulaire sont fréquemment mutés dans les tumeurs provoquant une prolifération accrue et non contrôlée. Ces modifications résultent souvent d'une altération chromosomique ou d'une inactivation épigénétique provoquant majoritairement une surexpression des cyclines et des Cdk et une perte de l'activité des CKI. Une perte des cibles des CDK peut aussi provoquer une dérégulation de la transition G1-S (Malumbres and Barbacid, 2001). C'est le cas de la protéine pRb, cible des Cdk, qui n'est plus exprimée dans certains cancers comme les rétinoblastomes et ne peut donc plus réguler négativement la transition G1-S. L'ensemble de ces altérations provoque une activation des voies moléculaires impliquées dans le cycle et une déficience dans les points de contrôle de la transition G1-S et/ou G2-M dans les cancers ce qui favorise la prolifération.

2-2 Mécanismes suppresseurs de tumeur

Différents mécanismes suppresseurs de tumeur constituent une barrière naturelle au développement d'un cancer ou sont, au contraire, un atout. Le mécanisme le mieux étudié est l'apoptose, mais la sénescence et en partie l'autophagie, sont aussi des mécanismes de défense souvent dérégulés dans les cancers. Cette perte de la capacité à induire l'apoptose, la sénescence et même l'autophagie contribue à la résistance des cellules cancéreuses aux traitements. Au contraire, la nécrose et en partie l'autophagie pourraient être un atout dans le développement du cancer (Grivennikov *et al.*, 2010; White and DiPaola, 2009).

L'apoptose est une mort cellulaire induite en réponse à de nombreux stress physiologiques déclenchés lors de la tumorigénèse ou par les traitements anticancéreux. L'apoptose est notamment provoquée par une élévation des signaux oncogéniques, les dommages à l'ADN ou l'hyperprolifération, trois facteurs essentiels dans le développement d'un cancer. Le déclenchement de l'apoptose dans les cellules tumorales est majoritairement inhibé, dû aux nombreuses mutations perturbant sa régulation. Ceci permet à la tumeur de se développer et de résister aux traitements. L'apoptose sera traitée de manière plus approfondie dans le chapitre suivant.

Un deuxième mécanisme contribuant à inhiber la tumorigénèse est la sénescence. La sénescence a été décrite pour la première fois en 1961 par Hayflick et Moorhead comme un phénomène irréversible d'arrêt de la multiplication d'une cellule. Aujourd'hui, la sénescence est décrite comme jouant un rôle dans le vieillissement de l'organisme et dans la résistance à la tumorigénèse. En effet, il a depuis longtemps été montré que la surexpression de protéines oncogènes telles que RAS ou MYC participait au déclenchement de la tumorigénèse. De récentes recherches ont permis de mettre en évidence que lorsque des protéines oncogènes sont ainsi surexprimées, la cellule peut déclencher des voies de

signalisation amenant à la sénescence de la cellule et donc à sa mort, développant ainsi un mécanisme de résistance à cette tumorigénèse (Collado and Serrano, 2010). Ceci traduit un mécanisme de défense intracellulaire permettant d'éliminer les cellules exprimant un niveau excessif de signaux mitogéniques.

Il existe trois grands facteurs impliqués dans le déclenchement de la sénescence : le raccourcissement des télomères, l'accumulation de dommages à l'ADN et la dérépression d'INK4a/ARF (gènes codant pour $p14^{ARF}$ et $p16^{INK4a}$) (figure 3). Dans les cancers, on observe un maintien des télomères, dû principalement à la surexpression de la télomérase. En effet hTERT (human telomerase reverse transcriptase), enzyme qui restaure et étend l'ADN télomérique, est exprimée à un niveau élevé dans 90% des tumeurs humaines alors que les cellules saines expriment cette enzyme à un niveau très faible (Stewart and Weinberg, 2006). De plus dans les cancers, on observe une dérégulation des voies $p14^{ARF}$ /p53 et $p16^{INK4a}$ /pRb. Dans les cellules saines, $p16^{INK4a}$ inhibe les CDK4 et CDK6 qui ne peuvent plus phosphoryler pRb provoquant un arrêt du cycle en G1-S, une des premières étapes de la sénescence. En parallèle, $p14^{ARF}$ permet une stabilisation de p53 en inhibant sont ubiquitination par MDM2, provoquant une activation de p21 et un arrêt en G1-S (Collado *et al.*, 2007). En inhibant, les voies $p14^{ARF}$ /p53 et $p16^{INK4a}$ /pRb, l'arrêt en G1-S est inhibé, ce qui empêche le déclenchement de la sénescence et supprime un frein au développement tumoral.

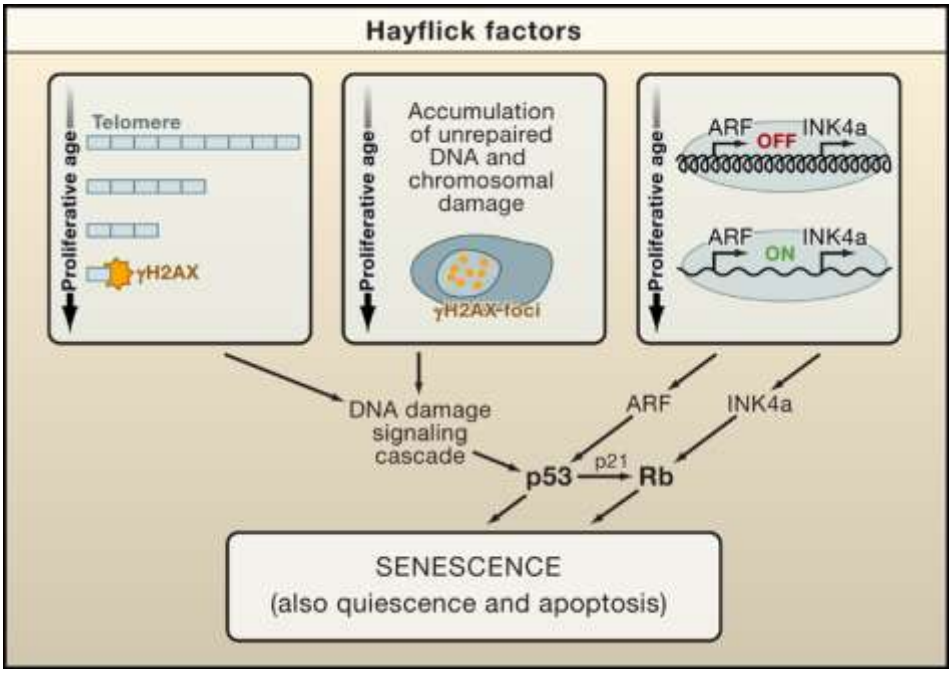


Figure 3 : Les Hayflick facteurs : résumé des trois grands facteurs déclenchant la sénescence (le raccourcissement des télomères, l'accumulation de dommages à l'ADN et la dérépression d'INK4a/ARF) avec leurs effecteurs principaux p53 et pRb (Collado *et al.*, 2007)

L'autophagie a un rôle plus complexe et moins tranché que la sénescence ou l'apoptose dans le développement d'un cancer, car elle peut à la fois promouvoir la survie de la cellule tumorale ou sa mort. L'autophagie est une réponse de la cellule face à un environnement carencé en nutriment. Dans ces conditions, la cellule va pouvoir séquestrer, dans des vésicules appelées autophagosomes, des protéines et des organelles présents dans le cytoplasme. Ces vésicules vont ensuite fusionner avec des lysosomes où leur contenu sera dégradé (figure 4). Ceci permet à la cellule d'obtenir une nouvelle source d'énergie quand les sources externes de nutriments sont dégradées. Les cellules vont ainsi pouvoir, si besoin, basculer dans un état de dormance réversible, leur permettant une tolérance aux traitements et une réémergence possible de la tumeur dans des temps tardifs (White and DiPaola, 2009). De manière paradoxale, les gènes impliqués dans l'autophagie et notamment Atg6 (Beclin-1) sont des suppresseurs de tumeur. Ainsi l'autophagie pourrait participer à inhiber la progression tumorale. Pour comprendre ce phénomène, l'équipe d'Eileen White a étudié une protéine p62 impliquée dans l'autophagie, souvent surexprimée dans les cancers. Ils ont alors montré le rôle de cette protéine dans la tumorigénèse. Dans les cellules saines, lors de stress métabolique, p62 est surexprimé, se lie avec des protéines polyubiquitinées et forme des agrégats. p62 peut diriger ces agrégats ainsi formés vers les autophagosomes en liant Atg8, favorisant alors leur dégradation. Le stress oxydatif est alors atténué et le génome protégé. Dans la cellule tumorale, déficiente en autophagie, sous stress métabolique, p62 va toujours être surexprimé et formé des agrégats. En revanche, ces agrégats ne seront plus dégradés dans les autophagosomes, favorisant alors le stress oxydatif et l'instabilité chromosomique contribuant à la progression tumorale (Mathew *et al.*, 2009).

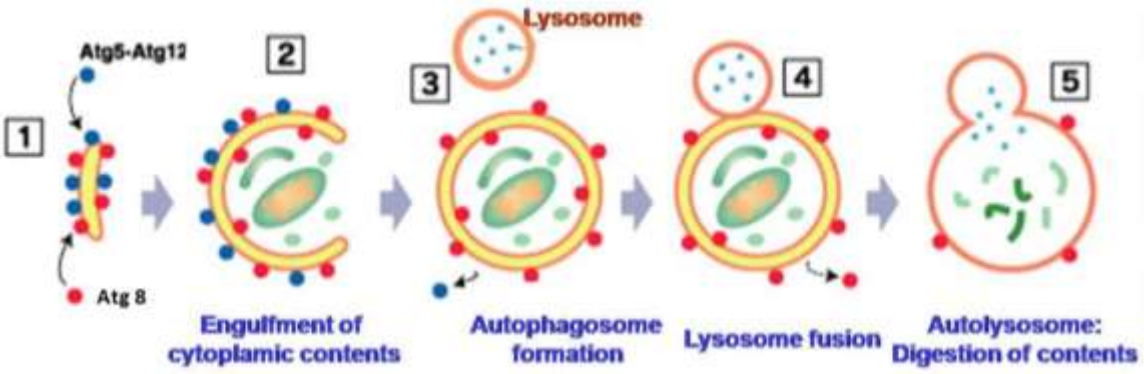


Figure 4 : L'autophagie chez les mammifères. Formation d'une vacuole à l'aide des protéines Atg5, Atg12 et Atg8 (1) qui s'allonge et séquestre le contenu cytoplasmique, protéines et organelles (2), pour former une vésicule appelée autophagosome (3). L'autophagosome va ensuite fusionner avec un lysosome (4) et les enzymes présents dans le lysosome vont pouvoir dégrader le contenu de l'autophagosome (5).

Alors que l'apoptose est un mécanisme clair de résistance à la tumorigénèse, la nécrose est un type de mort cellulaire qui pourrait, au contraire, dans une certaine mesure, participer à cette tumorigénèse. La nécrose a souvent été vue comme résultant d'un incident cellulaire, un événement cellulaire non régulé où la cellule nécrotique gonfle et explose, libérant son contenu dans son environnement proche. Cependant, plusieurs résultats de recherche suggèrent que la nécrose, tout comme l'apoptose, serait déclenchée et régulée par un certain nombre de gènes. On appelle désormais ce phénomène nécroptose (Galluzzi and Kroemer, 2008). La mort cellulaire nécrotique est plus un avantage pour la tumeur qu'un frein. En effet, la cellule nécrotique va induire une réaction inflammatoire et les cellules pro-inflammatoires du système immunitaire vont participer au développement de l'angiogenèse, de la prolifération cellulaire et de l'invasion en sécrétant des cytokines, des chemokines, des facteurs de croissance, des prostaglandines... De plus, les cellules nécrotiques sécrètent des facteurs mitogéniques comme l'IL-1α, qui stimulent la prolifération cellulaire des cellules voisines (Grivennikov *et al.*, 2010). La tumeur, en tolérant un certain degré de mort cellulaire nécrotique, gagnerait un avantage significatif pour son développement (Hanahan and Weinberg, 2011).

B – L'apoptose

1- Généralité

Les premières observations de l'apoptose datent du milieu du XIXe siècle, il y a plus de 150 ans. En 1842, Vogt est le premier à observer une mort cellulaire physiologique tandis que Flemming en 1885 est le premier à décrire la fragmentation du noyau observée pendant l'apoptose qu'il appellera Chromatolyse. Il faudra cependant attendre 1965 pour que le terme de « mort cellulaire programmée » apparaisse, lors des études de Lockshin et Williams qui observent que certaines cellules sont destinées à mourir, pendant le développement chez l'insecte et que cette mort est dépendante de la transcription de certains gènes et a besoin d'énergie (Lockshin and Williams, 1965). En 1972, Kerr, Wyllie et Curie introduisent le terme d'apoptose pour désigner une mort cellulaire programmée correspondant à des caractéristiques morphologiques précises (Kerr *et al.*, 1972).

Morphologiquement l'apoptose se distingue par un détachement des cellules voisines, une lobulation de l'enveloppe nucléaire et une condensation de la chromatine et du cytoplasme suivi d'une fragmentation du noyau et de la cellule ce qui conduit à la formation de corps apoptotiques. Lors de l'apoptose, la membrane garde son intégrité, mais elle expose vers l'extérieur la phosphatidylsérine, normalement tournée vers l'intérieur ce qui permet la reconnaissance et la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages. Lors de l'apoptose, le contenu de la cellule n'est pas libéré dans son environnement ce qui évite toute réaction inflammatoire.

A la fin des années 1970, l'étude du nématode *Caenorhabditis Elegans* a permis à Robert Horvitz de mettre en évidence les premiers gènes contrôlant la mort cellulaire. Chez le nématode, au cours de son développement, 131 des 1090 cellules somatiques meurent de manière systématique. Cette initiation de l'apoptose est permise par l'augmentation de la transcription d'egl-1 (pro-apoptotique). EGL-1 va pouvoir ensuite se complexer à la protéine anti-apoptotique CED-9 et l'inhiber. CED-4 (pro-apoptotique) libéré de CED-9, va pouvoir se complexer avec CED-3 (pro-apoptotique), une cystéine protéase et l'activer. CED-3 va ensuite cliver de multiples substrats et déclencher la mort cellulaire (figure 5) (Metzstein *et al.*, 1998). L'étude de l'apoptose chez les mammifères a permis d'identifier de multiples homologues des protéines CED de chez *C. Elegans* et un mécanisme d'activation comparable bien que plus complexe. BCL-2 (B cell lymphoma 2), gène découvert en 1985 lors de l'étude de la translocation des chromosomes 14 et 18 dans le lymphome folliculaire humain à cellule B, fut le premier régulateur de la mort cellulaire identifié chez les

mammifères (Tsujimoto *et al.*, 1985; Vaux *et al.*, 1988). Il sera par la suite identifié comme homologue de ced-9 (Hengartner and Horvitz, 1994).

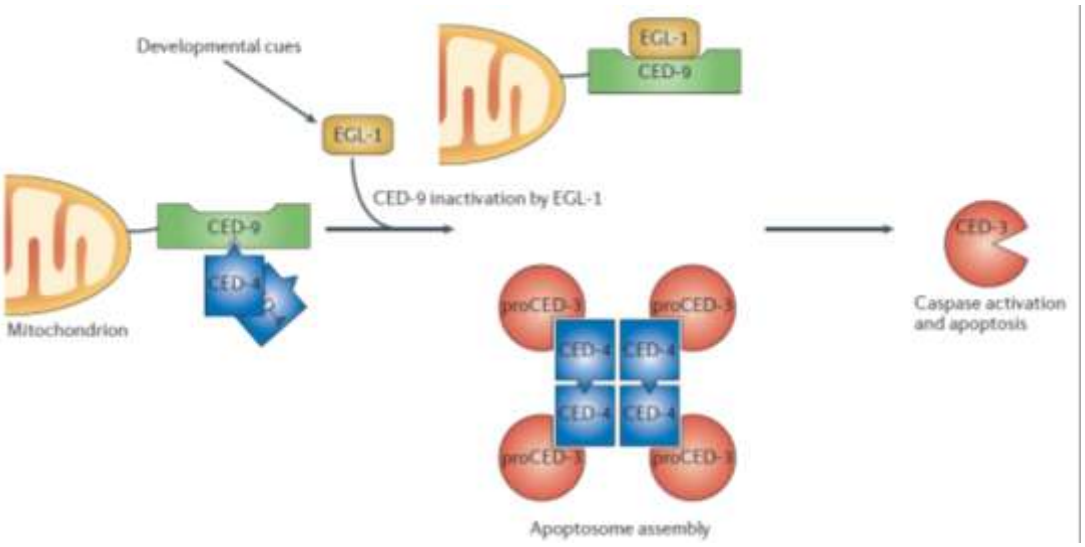


Figure 5 : Modèle moléculaire de l'activation de l'apoptose chez *C. Elegans.* Dans les cellules vivantes, la protéine de survie CED-9 séquestre la protéine pro-apoptotique CED-4. Suite à un stimulus de mort, la protéine pro-apoptotique EGL-1 s'accumule et s'associe à la même poche hydrophobe de CED-9 que CED-4, libérant ainsi cette dernière, qui à son tour va former avec CED-3 l'apoptosome conduisant à l'auto-activation de CED-3 et l'apoptose des cellules (Lettre and Hengartner, 2006)*.*

2- Le déroulement de l'apoptose chez les mammifères

L'apoptose est une mort physiologique qui intervient dans de nombreux processus biologiques, notamment, durant le développement embryonnaire, le remodelage des tissus ou la régulation immunitaire. Deux voies principales peuvent conduire à la mort cellulaire par apoptose : la voie extrinsèque déclenchée par des signaux externes et la voie intrinsèque déclenchée par des signaux internes.

2-1 La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est déclenchée par la fixation d'un ligand sur un récepteur de mort présent à la surface de la cellule. Ces récepteurs de mort appartiennent à la super famille des TNF (Tumor Necrosis Factor) qui regroupe TNFR-1, Fas/Apo/CD95, DR3/Apo3, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2, DR6 et EDAR (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). La liaison du ligand sur le récepteur entraine son oligomérisation. Au niveau intracellulaire, les domaines de mort DD (Death Domain) présents sur les récepteurs recrutent une protéine adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain) (figure 6). La protéine FADD contient deux domaines, un domaine DD interagissant avec les récepteurs et un domaine DED (Death Effector

Domain) qui interagit avec le domaine DED de la pro-caspase 8. L'ensemble forme un complexe appelé le complexe DISC (Death Inducing Signalling Complexe). La formation du complexe permet l'auto-clivage de la caspase 8 et son activation. La caspase 8 active, par la suite, les caspases effectrices, dont la caspase 3, et induit la mort (Thorburn, 2004). En parallèle, la caspase 8 peut cliver la protéine BH3-seul Bid qui sera alors activée. tBid actif est ensuite transloqué à la mitochondrie pour activer la seconde voie, la voie intrinsèque décrite plus loin. Cette connexion des deux voies permet une amplification du signal de mort induit par les récepteurs.

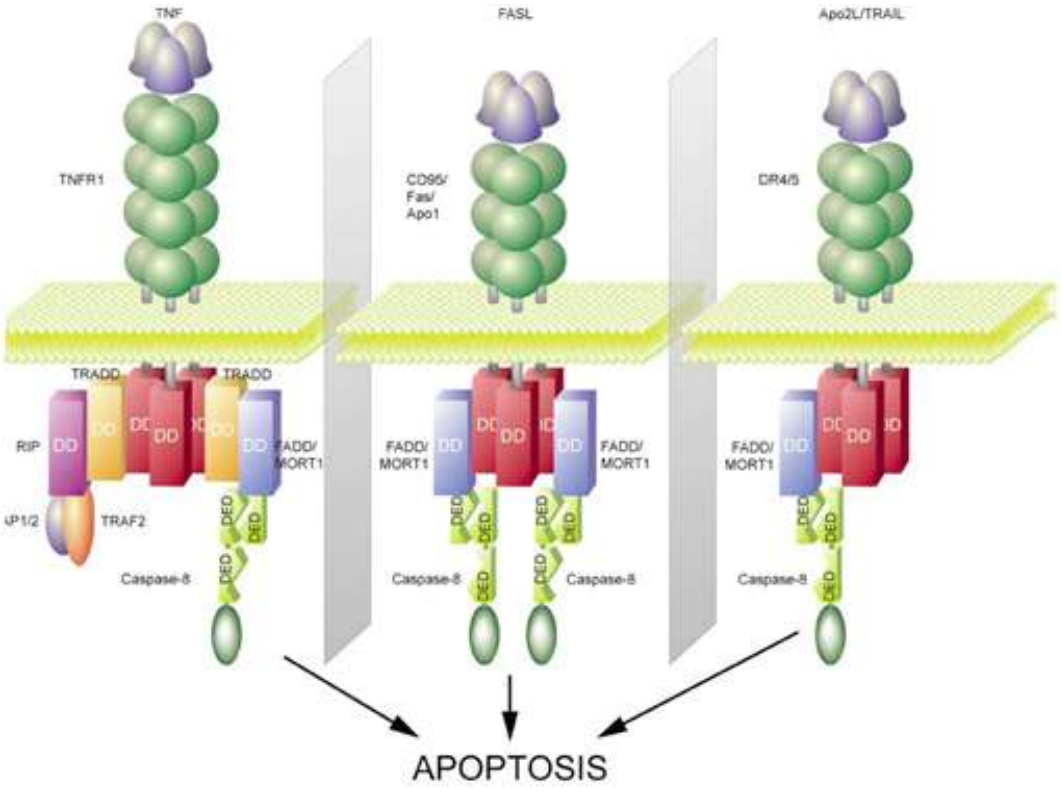


Figure 6 : La voie extrinsèque de l'apoptose. La liaison de ligands extracellulaires à leur récepteur membranaire induit l'oligomérisation des récepteurs et le recrutement, dans la partie cytosolique, de la pro-caspase 8, via des protéines adaptatrices comme TRADD et/ou FADD, pour former le complexe DISC. Ce complexe permet l'auto-activation de la caspase 8 qui va à son tour activer les caspases exécutrices et induire l'apoptose (Danial and Korsmeyer, 2004)

2-2 La voie intrinsèque

La voie intrinsèque appelée aussi la voie mitochondriale est activée par un certain nombre de stimuli comme une infection virale, des dommages à l'ADN ou encore une déprivation en facteur de croissance. La voie intrinsèque peut aussi être activée par la voie extrinsèque via tBid. Cette voie est strictement contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2 divisée en trois groupes : les protéines anti-apoptotiques, les protéines pro-apoptotiques dont les protéines à domaines BH (Bcl-2 Homology) multiples et les protéines BH3-seul (figure 7 et 10). Les stimuli activateurs de l'apoptose vont activer les protéines BH3-seul de la famille Bcl-2 qui vont à la fois inhiber les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et activer les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Cette cascade d'interaction protéine-protéine va conduire à la formation de pores dans la membrane externe de la mitochondrie et la libération dans le cytosol de molécules apoptogéniques dont le cytochrome C. Le cytochrome C, ainsi libéré, provoque un changement de conformation d'Apaf-1 en se fixant à son extrémité C-terminale et conduit à son oligomérisation ATP-dépendante. Le complexe ainsi formé permet le recrutement de la pro-caspase 9 conduisant à la formation de l'apoptosome. Au sein de l'apoptosome, la pro-caspase 9 va être activée en caspase 9 et va à son tour activer les caspases effectrices comme les caspases 3, 6 ou 7 et conduire à la mort cellulaire (Scorrano and Korsmeyer, 2003) (Youle and Strasser, 2008).

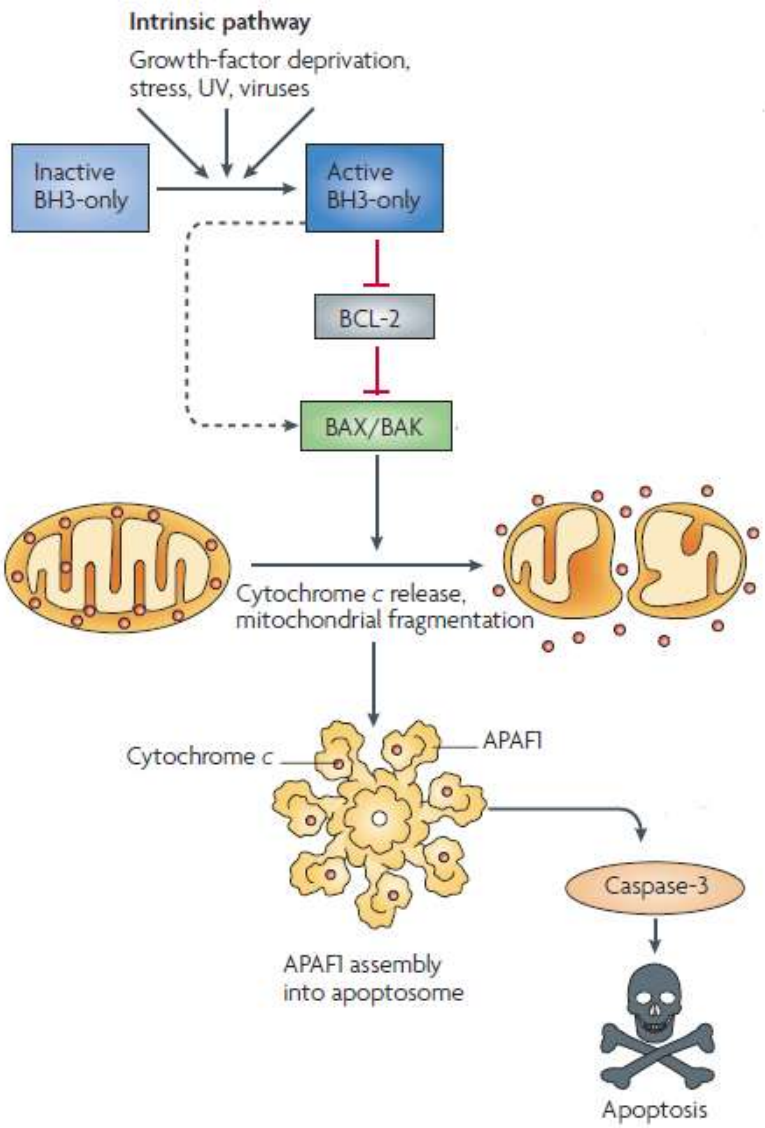


Figure 7 : la voie intrinsèque de l'apoptose. Différents stimuli vont être captés par les protéines BH3-seul qui vont inhiber les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et activer les protéines pro-apoptotiques comme Bax qui va former des pores dans la membrane externe mitochondriale. Cette perméabilisation de la membrane permet la libération du cytochrome C qui, associé avec Apaf-1 et la pro-caspase-9, va former l'apoptosome. Au sein de l'apoptosome, la caspase 9 s'auto-active par protéolyse et active ensuite les caspases exécutrices déclenchant ainsi l'apoptose (Youle and Strasser, 2008).

3- Les caspases

Les caspases (aspartic-acid-specific cystein proteases) sont un groupe de protéases à cystéine qui jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'apoptose, de nécrose et d'inflammation. Leur rôle dans l'exécution d'un signal de mort a été mis en évidence lors de l'identification et clonage du gène pro-apoptotique *ced-3* de C.Elegans dont le premier homologue mammifère ayant été identifié est le gène ICE (interleukin-1 beta converting enzyme), plus tard renommé caspase 1 (Yuan *et al.*, 1993). Onze caspases ont été

identifiées chez l'homme : les caspases 1-10 et la caspase 14 (figure 8). Il existe deux grands types de classement des caspases selon leurs fonctions ou selon leurs substrats. Dans les deux cas, les groupes ainsi constitués sont très similaires traduisant une forte corrélation structure-fonction. La plus courante est la classification selon leurs fonctions.

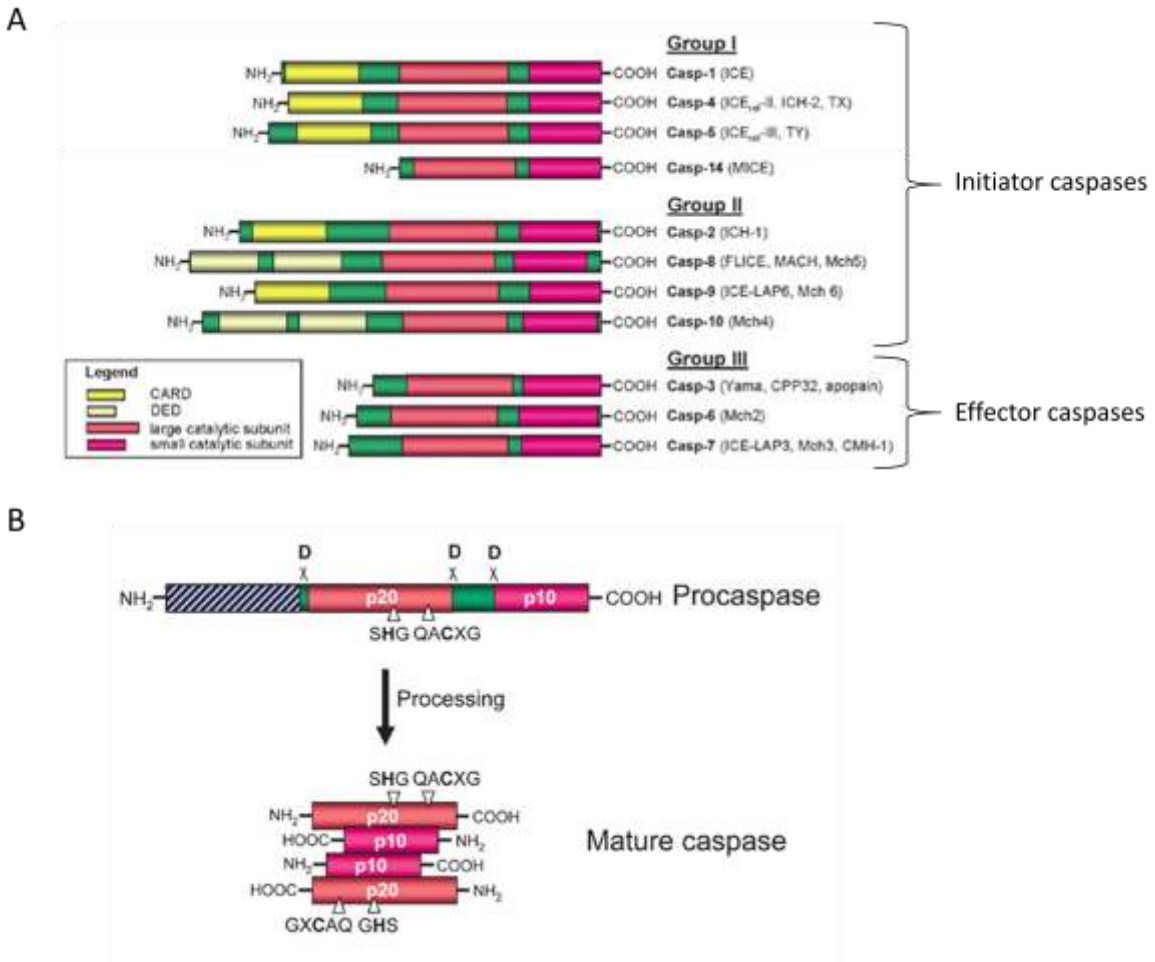


Figure 8 : la famille des caspases et leur clivage. (A) Les caspases sont divisées en trois groupes majeurs : le groupe I représentant les caspases inflammatoires, le groupe II représentant les caspases initiatrices de l'apoptose et le groupe III représentant les caspases effectrices de l'apoptose. Les domaines CARD (Caspase Activation Recruitment Domain), DED (Death Effector Domain) et les petites (p10) et grandes (p20) sous unités catalytiques sont indiqués. (B) Le clivage des pro-caspases juste après une asparagine permet la formation de caspases matures constituées d'un hétérotétramère et le relargage du pro-domaine. Les résidus impliqués dans la formation de la caspase mature sont indiqués.

On distingue les caspases initiatrices qui font le lien entre les voies de signalisation en amont et les effecteurs de la mort. Ces caspases possèdent un long pro-domaine contenant soit un domaine de recrutement et d'activation des caspases (CARD), soit un domaine effecteur de mort (DED). Ces caspases initiatrices sont divisées en caspases initiatrices de la mort et impliquées dans l'inflammation (groupe I) et en caspases seulement initiatrices de la mort (groupe II). Le troisième groupe est constitué des caspases effectrices 3,6 et 7 qui sont activées par les caspases initiatrices et qui vont cliver de multiples substrats impliqués dans la mort cellulaire. Ces caspases sont caractérisées par un pro-domaine court (Degterev *et al.*, 2003).

L'ensemble des caspases sont synthétisées sous forme de pro-caspases inactives ou zymogènes contenant un pro-domaine suivi de deux sous unités, une petite p10 et une grande p20. Elles sont activées par clivage, libérant successivement la petite sous-unité puis la grande sous-unité (figure 8). L'enzyme active correspond à un hétérotétramère comportant deux hétérodimères p20/p10. Les caspases matures possèdent deux sites catalytiques composés d'un résidu cystéine (Cys 285) et d'une séquence de type QACxG. Grâce à ces sites, les caspases vont identifier leurs substrats et les cliver en C-terminal d'un résidu aspartate de manière irréversible.

Les caspases ont un important nombre de cibles que l'on peut cependant classer en six grandes catégories : les protéines impliquées directement dans la régulation de l'apoptose comme Bcl-2 ou Bcl-xL, les protéines kinases ou autres régulateurs de la transduction du signal apoptotique comme Akt, les protéines structurales cytosoliques ou nucléaires telles que l'actine ou la β-caténine, les facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN dont PARP ou ATM, les régulateurs du cycle tels que pRb ou p21 et enfin des facteurs impliqués dans certaines maladies comme la protéine huntingtine (Degterev *et al.*, 2003).

4- La famille Bcl-2

4-1 Structure des protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 participent à la décision du devenir de la cellule : soit la cellule continue de vivre, soit la mort est déclenchée par la voie mitochondriale. Les interactions entre les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, contrôlent le déclenchement de la mort et modulent la sensitivité des cellules à celle-ci. Les protéines de la famille Bcl-2 sont divisées en trois groupes. Le premier groupe inhibe l'apoptose et se compose de Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, Bcl-A1 (aussi appelé Bcl-2A1) et Bcl-B (aussi appelé Bcl-2L10). Dans les cellules cancéreuses, ces protéines anti-apoptotiques sont

surexprimées conférant une résistance accrue à l'apoptose. De forts niveaux d'expression de Bcl-2 ont d'abord été observés dans les lymphomes folliculaires puis dans de nombreux autres cancers souvent corrélés avec un taux de survie faible (Fesik, 2005). De la même manière, Mcl-1 est surexprimé dans des cancers lymphoïdes ou hématopoïetiques (Warr and Shore, 2008). La surexpression de ces protéines anti-apoptotiques confère une résistance aux traitements des cellules cancéreuses. La surexpression de Bcl-xL dans 60 lignées tumorales testées, corrèle fortement avec la résistance des cellules à 122 agents anticancéreux testés (Amundson *et al.*, 2000). Le deuxième groupe favorise l'apoptose et se compose de Bax, Bak et Bok. Enfin, le troisième groupe appelé « BH3-seul » se compose de Bik (aussi appelé Blk ou Nbk), Hrk (aussi appelé DP-5), Bim (aussi appelé Bod), Bad, Bid, Puma (aussi appelé BBC3), Noxa et Bmf. Ce dernier groupe peut se fixer sur les protéines anti- ou pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et les réguler pour promouvoir l'apoptose (figure 9) (Youle and Strasser, 2008). De plus, il existe des protéines qui possèdent un domaine BH3, mais qui n'ont pas de fonction apoptotique comme c'est le cas pour la protéine autophagique Beclin-1 (cf 5-1).

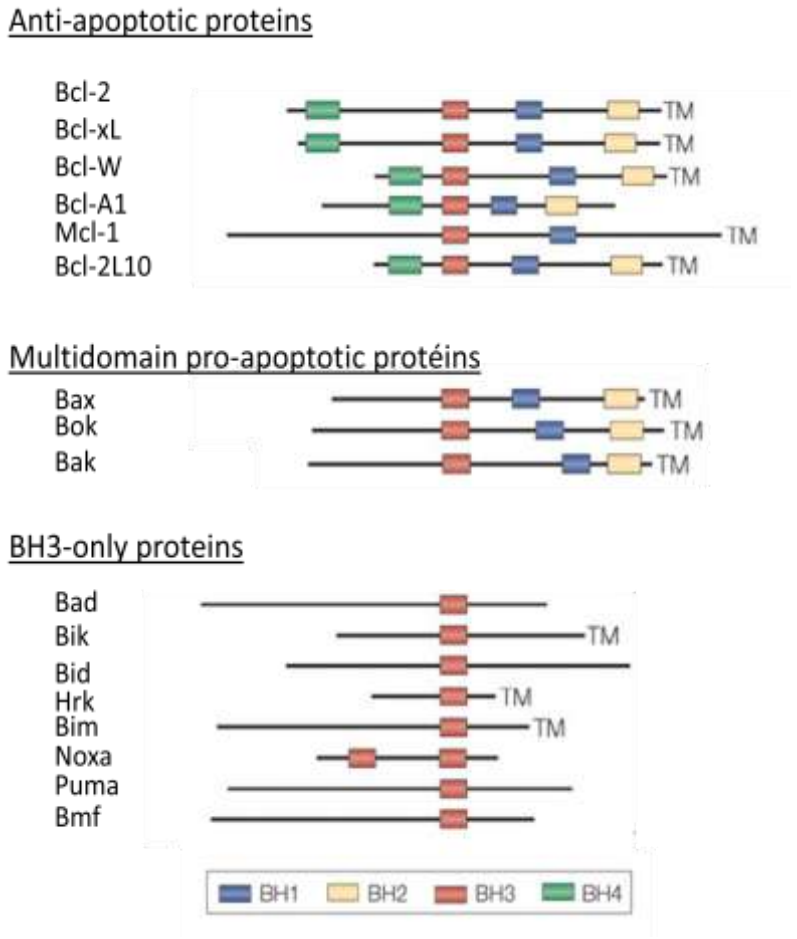


Figure 9 : Représentation des protéines de la famille Bcl-2 et leurs domaines BH (liste non exhaustive).

La structure des protéines à multi-domaines BH (Bcl-2 Homology domain) de la famille Bcl-2 (groupe 1 et 2), malgré des effets opposés, reste très similaire (figure 10). Les protéines anti-apoptotiques possèdent les quatre domaines BH (sauf Mcl-1) alors que les protéines pro-apoptotiques possèdent seulement trois domaines BH. La plupart de ces protéines possèdent un domaine transmembranaire qui permet leur localisation à la membrane mitochondriale. Les domaines BH1, BH2 et BH3 sont regroupés pour former une poche hydrophobe à la surface de la protéine. Cette poche hydrophobe correspond au site d'interaction avec les autres protéines de la famille Bcl-2. Ce site d'interaction a, par conséquent, un rôle primordial dans l'hétéro- ou l'homo-dimérisation ainsi que dans l'activation de ces protéines. La structure de Bcl-xL complexé avec le domaine BH3 de Bak, Bad ou Bim, a montré que le domaine BH3 de ces protéines adopte une structure en hélice α amphiphile qui s'insère dans la poche hydrophobe de Bcl-xL en réalisant des liaisons à la fois hydrophobes et électrostatiques. Les résidus situés dans la partie N-terminale de ces domaines BH3 interagissent avec ceux situés dans le domaine BH1 de Bcl-xL tandis que les résidus situés dans la partie C-terminale de ces domaines BH3 entrent en contact avec ceux des domaines BH2 et BH3 de Bcl-xL (Sattler *et al.*, 1997; Petros *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003). Le domaine BH4 est présent uniquement chez les protéines pro-apoptotiques et il n'intervient pas dans la formation de la poche hydrophobe. Ce domaine BH4 régule les interactions au niveau de la poche hydrophobe et participe aux interactions avec les protéines autres que les protéines appartenant à la famille Bcl-2. Le troisième groupe, les BH3-seul n'ont qu'un seul domaine d'homologie, le domaine BH3. Ce motif leur permet leur fixation sur les autres protéines de la famille Bcl-2 (Petros *et al.*, 2004).

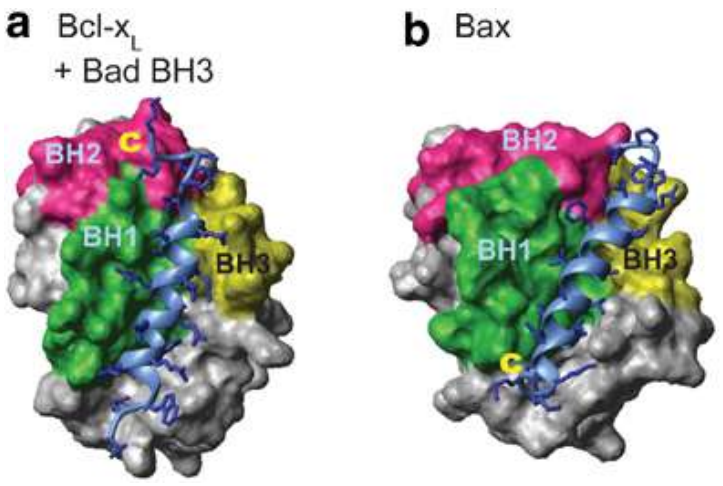


Figure 10 : Structure 3D des protéines Bcl-xL et Bax. A) Bcl-xL interagissant avec Bad (bleu) au niveau de la poche hydrophobe constituée des domaines BH1 (vert), BH2 (rose) et BH3 (jaune). B) Bax avec son extrémité C-terminale (bleu) glissée dans sa poche hydrophobe (Cory *et al.*, 2003).

4-2 Activation des protéines pro-apoptotiques : exemple de Bax

Lors de l'apoptose, la protéine Bax passe d'une forme stable native, présente dans le cytosol (appelée CLIC pour « Cytosolic Locked In Conformation) à une forme totalement activée insérée dans la membrane mitochondriale (appelée CLAC pour « Cytochrome c Liberation Associated Conformation) permettant la formation de pore et la libération du cytochrome C. Pour passer de la forme CLIC inactive à la forme CLAC active, Bax va subir une succession de changement de conformation. Sous la forme CLIC, la séquence signale de localisation à la mitochondrie en N-terminal de Bax est cachée par les séquences N- et C-ART (Apoptosis Regulation Target). La séquence ART peut interagir avec des protéines inhibitrices favorisant la forme CLIC (figure 11-1). Ensuite les BH3-seul comme tBid peuvent perturber le lien intramoléculaire entre les résidus de Bax D33 et K64 ce qui exposera la séquence signale de localisation à la mitochondrie (figure 11-2). Bax va alors pouvoir interagir avec une protéine réceptrice comme TOM22, localisée dans la membrane externe de la mitochondrie (figure 11-3). La poche hydrophobe formée par les domaines BH1, 2, 3 n'est, à ce stade, pas accessible, occupée par l'hélice Hα9 de Bax. Une rotation de l'hélice Hα9 autour du résidu P168 permet une libération de la poche hydrophobe et une exposition des hélices α5 et α6 et du domaine BH3 (figure 11-4). Les hélices α5 et α6 vont alors pouvoir s'insérer dans la membrane mitochondriale (figure 11-5) et Bax va ensuite s'homo-oligomériser et former un canal dans cette membrane (figure 11-6) arrivant ainsi à sa forme CLAC active (Lalier *et al.*, 2007).

L'activation de Bax est contrôlée à la fois par les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et par les BH3-seul. Encore aujourd'hui, le mécanisme permettant à ces protéines de réguler l'activation de Bax, n'est pas encore complètement maîtrisé. Cependant, il a été démontré que certaines protéines BH3-seul appelées activatrices pouvaient directement activer Bax par interaction protéine-protéine. C'est le cas de Bid, Bim et Puma (Letai, 2009; Gallenne *et al.*, 2009). Au contraire, les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL vont inhiber l'activation de Bax en liant les BH3-seul activateurs comme Bid ou Bim, ou en inhibant l'oligomérisation de Bax et la formation de pores dans la mitochondrie en liant Bax actif. Enfin, les BH3-seul tels que Bad qui n'ont pas la capacité d'activer directement Bax, vont pouvoir toutefois entrer en compétition pour lier les molécules anti-apoptotiques et libérer ainsi Bax actif (figure 12). Ces mécanismes d'activation de Bax ne sont pas encore totalement compris et il a été démontré récemment par Gautier et al. que Bcl-xL pouvait, au-delà de simplement séquestrer Bax, déplacer l'équilibre en faveur de sa conformation active, révélant ainsi une relation plus complexe entre les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Gautier *et al.*, 2011). Ainsi, l'interaction Bax/Bcl-xL favoriserait et maintiendrait Bax sous une forme active rendant ainsi l'activité de Bcl-xL

indispensable pour la survie de la cellule. Le modèle avancé à partir de ces données serait que Bcl-xL permettrait un changement de conformation de Bax facilitant l'exposition de son domaine BH3. Alternativement, Bcl-xL pourrait interagir avec Bax actif préférentiellement ce qui favoriserait la viabilité de la cellule, mais aussi l'existence de Bax actif. La question reste ouverte quant aux autres protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 : Bcl-xL est-elle la seule molécule capable d'une telle régulation ou partage-t-elle cette fonction avec les autres protéines de la famille Bcl-2 ?

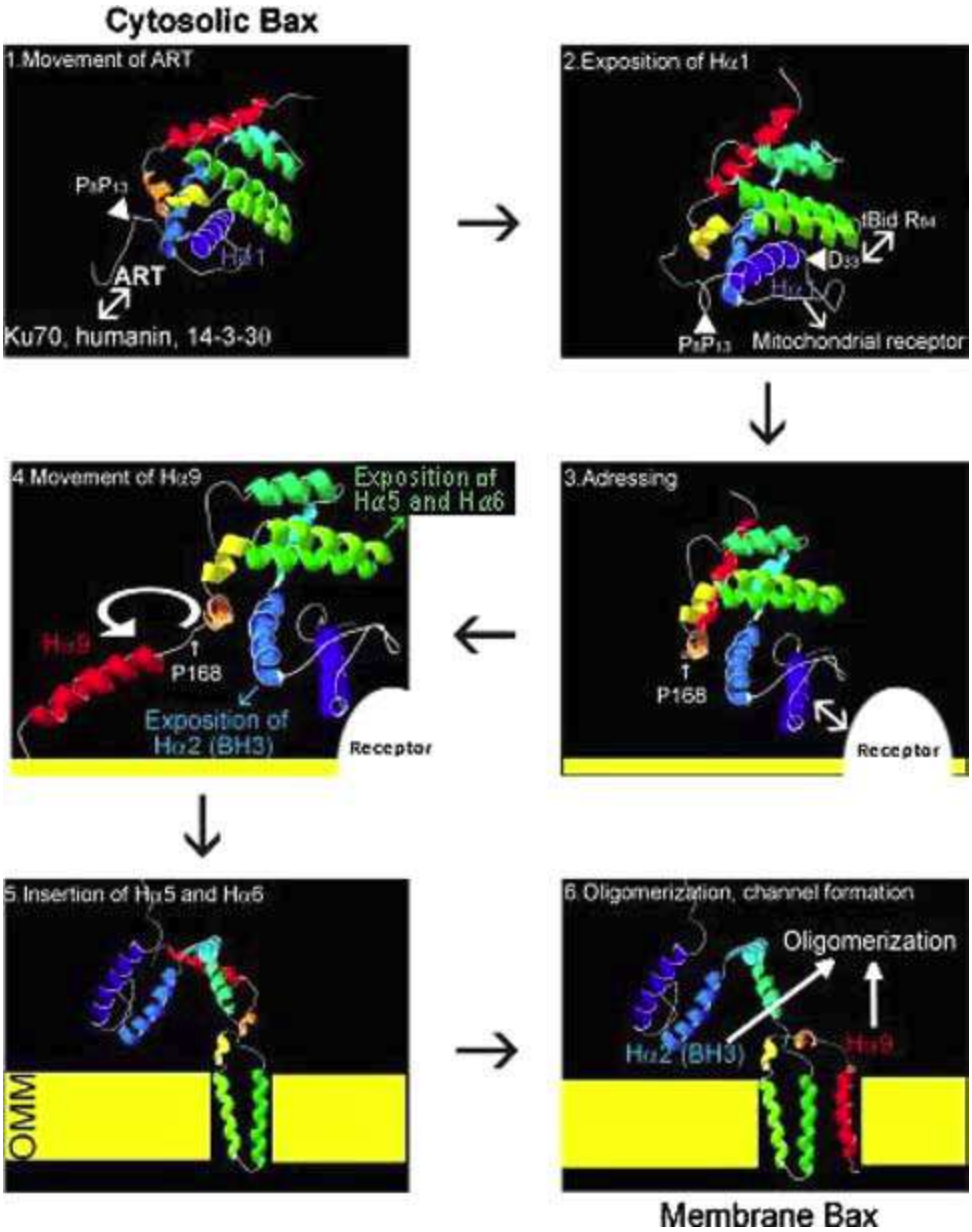


Figure 11 : Représentation de l'activation de Bax. Schéma décrit dans le paragraphe B-4-2 (Lalier *et al.*, 2007)**.**

4-3 La régulation des interactions protéine-protéine : l'importance des BH3-seul

Les protéines BH3-seul sont des intégrateurs des différents stimuli, essentiels de la voie intrinsèque de l'apoptose (seul Bid participe à la voie extrinsèque). Les BH3-seul peuvent être divisés en deux classes. Il y a d'une part les BH3-seul activateurs qui vont pouvoir inhiber les protéines anti-apoptotiques et directement activer Bax ou Bak. C'est le cas de Bim, Bid et Puma. D'autre part, il y a les BH3-seul sensibilisateurs qui vont seulement se lier aux protéines anti-apoptotiques et les inhiber. C'est le cas de Bad, Bmf, Bik, Hrk et Noxa. Les BH3-seul activateurs peuvent se lier aux cinq protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Bcl-A1 et Mcl-1. Au contraire, les BH3-seul sensibilisateurs Bad et Bmf se lient seulement à Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-W, Bik et Hrk à Bcl-xL et Bcl-W et Bcl-A1 et Noxa à Mcl-1 et Bcl-A1 (Chen *et al.*, 2005). Les BH3-seul vont pouvoir réguler à la fois les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et on peut voir apparaître une forme de régulation hiérarchisée de l'apoptose par la famille Bcl-2. Lorsque des stimuli pro-apoptotiques apparaissent les BH3 sensibilisateurs inhiberaient les protéines anti-apoptotiques, ce qui libérerait les BH3 activateurs qui pourraient activer Bax ou Bak (figure 12a) (Kim *et al.*, 2006).

Alors que le rôle de Bid et Bim en tant qu'activateur a été rapidement démontré, Puma fut d'abord considéré comme un BH3 sensibilisateur avant que l'on découvre sa capacité à activer Bax directement (Certo *et al.*, 2006; Willis *et al.*, 2007). Démontré tout d'abord en 2004 (Cartron *et al.*, 2004), son rôle de BH3 activateur a été renforcé en 2009 par Gallenne et al ainsi que Kim et al (Gallenne *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009). La mise sous silence de Puma est suffisante pour diminuer fortement l'apoptose dépendante de Bax. Puma est un élément essentiel dans la réponse apoptotique p53 dépendante (Villunger *et al.*, 2003). Cibles transcriptionnelles directes de p53, Puma ainsi que Bax sont induits en réponse aux dommages à l'ADN. Cependant, Puma est également un acteur majeur de la réponse apoptotique p53 indépendante en partie grâce à son activation transcriptionnelle par la voie pRb/E2F1. En effet, Puma peut être activé directement par E2F1 et induire l'apoptose. Ainsi, une inhibition de Puma dans des cellules d'ostéosarcome, induit une résistance de ces cellules à la mort induite par E2F1 (Hershko and Ginsberg, 2004). Puma peut aussi être activé indirectement par E2F1 via p73, lui-même cible d'E2F1. Puma pourrait alors provoquer le changement de conformation de Bax et sa relocalisation à la membrane mitochondriale (Melino *et al.*, 2004).

Noxa est un des rares BH3-seul sensibilisateurs à pouvoir inhiber Mcl-1. La régulation de son expression peut se faire par de nombreux facteurs de transcription dont entre autres, p53, p73 et E2F1 (Flinterman *et al.*, 2005; Oda *et al.*, 2000; Hershko and

Ginsberg, 2004). Noxa semble restreint au niveau de son potentiel inhibiteur, car il ne pourrait lier que Mcl-1 et Bcl-A1. Malgré tout, cette spécificité de liaison des BH3-seul pour les BH3 à domaines multiples a été déterminée *in vitro*. Deux récentes études, *in vivo*, ont démontré une liaison possible de Noxa avec Bcl-xL qui conduirait à la mort cellulaire (Lopez *et al.*, 2010; Hagenbuchner *et al.*, 2010). Dans l'une de ces études, il est montré que lors de dommages à l'ADN, l'augmentation de Noxa permettrait l'apparition de Noxa non liés à Mcl-1 qui pourraient alors lier Bcl-xL, l'inhiber et permettre ainsi l'induction de la mort. Noxa reste malgré tout un régulateur majeur de Mcl-1 qui peut se complexer avec celui-ci et permettre sa dégradation par le protéasome. En effet, contrairement à Bim et Puma qui stabiliserait Mcl-1, Noxa possèderait une séquence d'adressage au protéasome au niveau C-terminal de son domaine BH3 lui permettant ainsi d'emmener Mcl-1 jusqu'au protéasome où celui-ci serait dégradé (Czabotar *et al.*, 2007). Cette dernière étude introduit un nouvel aspect dans les fonctions des BH3-seul. Le rôle des BH3-seul ne se limiterait pas simplement à une inhibition des protéines anti-apoptotiques ou une activation de Bax et Bak. Les BH3-seul pourraient agir sur les autres protéines de la famille Bcl-2 de façon plus complexe en ayant notamment une action sur leur stabilité.

4-4 Les BH3 mimétiques

À partir de ces études, les protéines de la famille Bcl-2 sont apparues comme des cibles intéressantes dans le développement de drogues anticancéreuses, le but étant de permettre de sensibiliser de nouveau les cellules cancéreuses à la mort cellulaire. La stratégie la plus prometteuse est d'inhiber les fonctions des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. De petites molécules ont été ainsi développées selon le modèle des BH3-seul, se fixant dans la poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques et inhibant leur fonction : les BH3 mimétiques (figure 12). Ces BH3 mimétiques varient selon leur spécificité et leur efficacité (Chonghaile and Letai, 2008). On peut citer comme exemple de BH3 mimétiques, HA14-1, gossypol, apogossypol, S1 ou encore l'ABT-737.

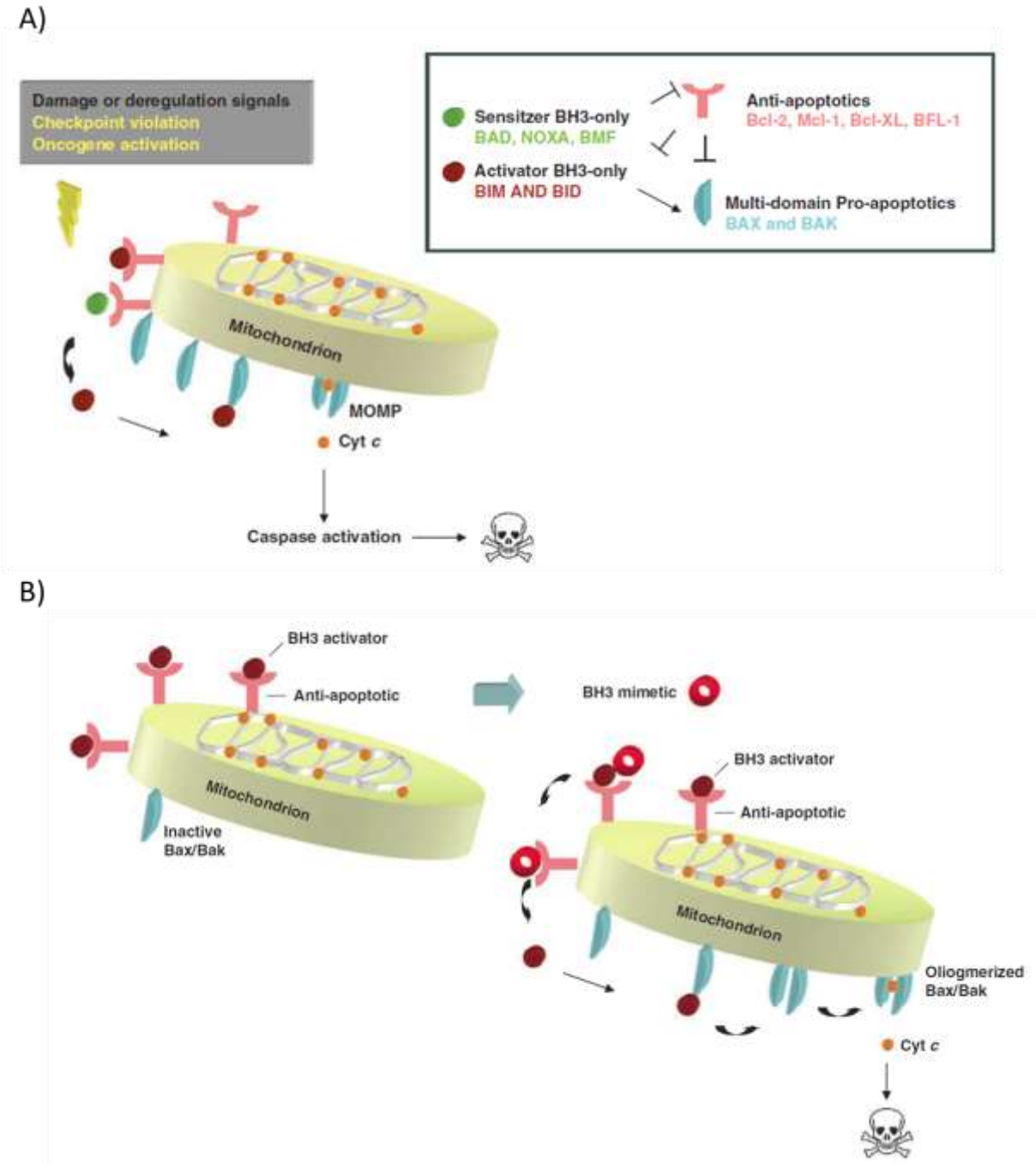


Figure 12 : L'apoptose induite par les protéines Bcl-2 ou par les BH3 mimétiques. A) Lorsque des stimuli pro-apoptotiques apparaissent, les BH3 sensibilisateurs inhibent les protéines anti-apoptotiques, ce qui libère les BH3 activateurs qui peuvent activer Bax ou Bak. B) Les BH3 mimétiques induisent l'apoptose en se fixant sur la poche hydrophobe des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, déplaçant ainsi les BH3-seul activateurs qui vont pouvoir activer Bax et Bak et déclencher l'apoptose (Chonghaile and Letai, 2008).

Parmi ces molécules, une des plus efficaces est l'ABT-737 développée par les laboratoires Abbott (figure 13). L'ABT-737 a été synthétisé à partir de l'étude de l'interaction de Bcl-xL avec la protéine Bad et se fixe sélectivement sur les protéines Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-W. Son affinité est de l'ordre du nanomolaire. En revanche, comme Bad, l'ABT-737 se fixe

avec une très faible affinité sur MCL-1 et BFL-1 avec une constante de dissociation de l'ordre du micromolaire (Oltersdorf *et al.*, 2005). L'ABT-737 a été modifié au niveau de trois sites pour permettre une administration orale. La nouvelle formule ainsi synthétisée, appelée l'ABT-263 (figure 13), est désormais en essai clinique en phase I ou II dans différents types de cancers sous le nom de Navitoclax[1]. Les autres BH3 mimétiques sont beaucoup moins spécifiques. On peut cependant noter que ceux-ci, contrairement à l'ABT-737 pourraient engendrer un stress au niveau du réticulum endoplasmique ce qui aurait pour conséquence une activation de la transcription de Noxa et par extension une inhibition de Mcl-1. Une combinaison de ces BH3 mimétiques avec l'ABT-737 permettrait de cibler à la fois Bcl-xL, Bcl-2 et Mcl-1 et ainsi augmenter l'efficacité apoptotique, Mcl-1 étant connu pour être un frein majeur à l'efficacité de l'ABT-737 (Albershardt *et al.*, 2011).

Les BH3 mimétiques sont souvent utilisés en combinaison avec d'autres traitements anticancéreux classiques. De nombreux exemples existent dans la littérature où les BH3 mimétiques sont combinés avec différents traitements conventionnels pour traiter différents cancers. Les BH3 mimétiques ont un effet synergique dans le traitement des gliomes en combinaison avec l'étoposide, des cancers du sein en combinaison avec le paclitaxel, ou encore dans les myélomes multiples en combinaison avec le dexamethasone (Tagscherer *et al.*, 2008; Kutuk and Letai, 2008; Trudel *et al.*, 2007). Les BH3 mimétiques permettraient d'inhiber la résistance des cellules à la mort due à Bcl-2/Bcl-xL et serviraient de chimiosensibilisateur. Les agents anticancéreux conventionnels pourraient dans ces conditions induire l'apoptose. Malgré tout, les BH3 mimétiques peuvent avoir des effets lorsqu'on les utilise en agent simple. L'ABT-737 peut induire la mort à des doses très faibles (nM) dans le myélome multiple (Kline *et al.*, 2007). A des doses plus élevées (µM) et dans des temps plus longs (24h), l'ABT-737 peut aussi induire la mort dans les cellules colorectales HCT116 (Gallenne *et al.*, 2009). Ces différences de réponse à l'ABT-737 en agent simple, suggèrent l'activation de plusieurs mécanismes conduisant à la mort par apoptose, des mécanismes directs d'inhibition d'interaction protéine-protéine, mais aussi des mécanismes transcriptionnels plus longs. En effet, en 2011, il a été montré que l'ABT-737 induisait la multiplication par deux de la transcription d'environ 430 gènes dans des cellules de carcinome rénale (Song *et al.*, 2011).

---

[1] Voir le site de Genentech : http://www.gene.com/gene/pipeline/status/oncology/abt263/

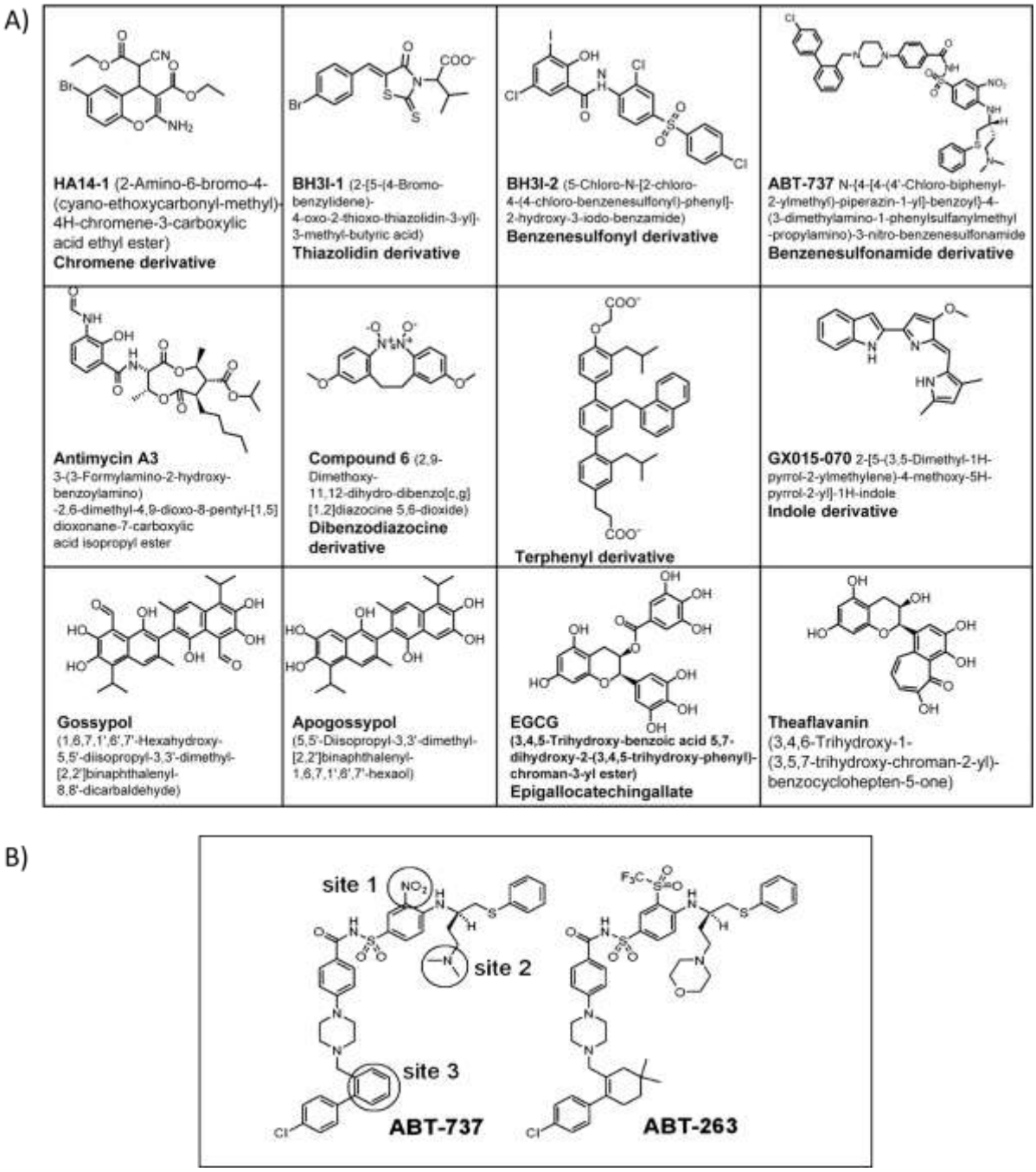


Figure 13 : Structure chimique de différents composés inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. A) Structure des différents composés inhibiteurs. B) Comparaison des structures de l'ABT-737 et de l'ABT-263. (Reed and Pellecchia, 2005; Tse *et al.*, 2008).

5- Les rôles atypiques de Bcl-2 et Bcl-xL

Dans les mécanismes suppresseurs de tumeur, les protéines de la famille Bcl-2 ne sont pas uniquement impliquées dans la mort cellulaire par apoptose, elles peuvent aussi réguler l'autophagie. Ces protéines peuvent également être présentes dans des interactions physiques avec d'autres protéines « hors famille ». Dans des conditions non apoptotiques, Bcl-2, Bcl-xL et/ou Mcl-1 peuvent réguler la progression dans le cycle cellulaire et la réponse aux dommages à l'ADN en partie via leurs interactions avec Cdk2 (impact sur la voie pRb/E2F), c-Myc (interaction physique directe) et p53 (interaction physique directe). Les motifs structurels impliqués et la part de ces effets dans l'activité biologique des membres de la famille Bcl-2 au sein de la cellule tumorale ne sont pas encore complètement maîtrisés.

5-1 Bcl-2/Bcl-xL dans l'autophagie

Beclin-1 (Atg6) est une protéine essentielle dans l'induction de l'autophagie. Cette protéine interagit avec différents cofacteurs pour réguler la protéine kinase PI3Kc (phosphatidylinositol 3 kinase c) qui participe à l'induction de l'auphagie. Beclin-1 est une protéine qui possède aussi un domaine BH3, mais qui n'a pas de fonction pro-apoptotique contrairement aux autres BH3-seul. Grâce à ce domaine BH3, Beclin-1 peut se complexer avec Bcl-2 et Bcl-xL (Maiuri *et al.*, 2007). Une interaction entre Bcl-2/Bcl-xL et Beclin-1 au niveau du réticulum endoplasmique séquestre Beclin-1 et inhibe l'autophagie. Un BH3-seul tel que Bad ou un BH3 mimétique comme l'ABT-737 peut déplacer l'interaction et libérer Beclin-1 déclenchant ainsi l'autophagie (Malik *et al.*, 2011). Ainsi Bcl-2 et Bcl-xL n'inhibent pas seulement l'apoptose, mais également l'autophagie.

5-2 Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 dans la régulation du cycle cellulaire

Bcl-2/Bcl-xL peuvent agir à différents moments du cycle pour induire son arrêt ou au moins freiner son avancée. Ils peuvent favoriser l'entrée en quiescence (phase G0) des cellules. Bcl-2/Bcl-xL pourraient favoriser l'activité d'une protéine kinase Mirk par un mécanisme encore inconnu. Mirk actif est capable de phosphoryler p27, inhibiteur des Cdk, au niveau de la sérine 10. p27 phosphorylé est stabilisé et peut alors contribuer à l'entrée en phase G0 (Janumyan *et al.*, 2008).

Bcl-2 peut également freiner la transition G1-S en augmentant le niveau de p27 et de p130. En effet, l'augmentation de p27 va favoriser sa liaison avec les complexes cycline E/Cdk2 et inhiber l'activité de Cdk2. Cdk2 ne peut alors plus phosphoryler pRb qui reste complexé aux facteurs de transcription E2Fs et bloquent la transition G1-S. En parallèle, l'augmentation de p130, protéine de la famille de pRb, va favoriser la formation de complexe

p130/E2F4. Le complexe p130/E2F4 va inhiber l'expression d'E2F1 et bloquer la transition G1-S (Vairo *et al.*, 2000). On ne sait pas exactement comment Bcl-2 agit sur p27 ou p130. Une hypothèse a été avancée par Greider et al. en 2002, selon laquelle Bcl-2/Bcl-xL pourraient augmenter le niveau de p27 en interférant avec l'activité de c-Myc, l'entrée dans le cycle cellulaire induite par c-Myc étant freinée par Bcl-2/Bcl-xL, mais pas celle induite par E2F1. c-Myc est un régulateur de p27 à différents niveaux : en perturbant la liaison de p27 au complexe cycline E/Cdk2, en activant la dégradation de p27 ou en réprimant la transcription de celui-ci. L'hypothèse serait que Bcl-2 et Bcl-xL en inhibant l'activité de c-Myc, par un mécanisme inconnu, pourraient favoriser la surexpression de p27 et bloquer le cycle cellulaire (Greider *et al.*, 2002).

Bcl-xL peut réguler le cycle à un autre niveau du point de contrôle : la transition G2-M. Lors de dommages à l'ADN, Bcl-xL colocalise au niveau nucléaire avec la protéine Cdk1. Bcl-xL se lie alors à Cdk1 et inhibe son activité kinase entrainant un arrêt en G2-M et par la suite une entrée en sénescence de la cellule (Schmitt *et al.*, 2007).

5-3 Bcl-2 dans la réparation de l'ADN

De nombreux stress cellulaires induisent des modifications chimiques des bases azotées de l'ADN, des cassures simple brin de l'ADN, des pontages intra-brins et inter-brins, des pontages ADN-protéines et finalement des cassures double brin de l'ADN détruisant ainsi l'intégrité du chromosome. Pour répondre à ces stress, la cellule a développé des systèmes complexes lui permettant de sonder son ADN et, si nécessaire, de le réparer. Six grands systèmes de réparation existent au sein des cellules vivantes : la réparation directe de la lésion, la réparation par excision de base (BER pour Base Excision Repair), la réparation par excision de nucléotides (NER pour Nucleotide Excision Repair), la réparation des mésappariements (MMR pour mismatch repair), le Non-Homologue End-Joining (NHEJ) et la réparation par recombinaison homologue (HR pour Homologue Recombinaison) (figure 14) (Fleck and Nielsen, 2004). La première catégorie comprend des mécanismes *ad hoc*, spécifiques d'un type de lésion donnée. Les cinq derniers systèmes sont généralistes et sont chacun capables de réparer un ensemble de lésions diverses. Bcl-2 a été décrit pour être impliqué dans la régulation de trois de ces systèmes de réparation : la réparation par excision de base, la réparation des mésappariements et le Non-Homologue End-Joining.

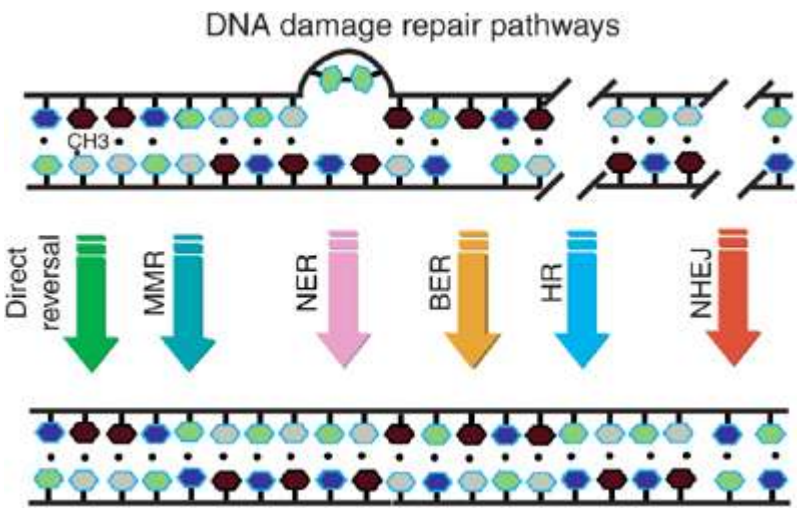


Figure 14 : Voies de réparation de l'ADN activées selon le type de modification de l'ADN. (1) la réparation directe, (2) la réparation des mésappariements MMR, (3) la réparation par excision de nucléotides NER, (4) la réparation par excision de base BER, (5) la réparation par recombinaison homologue HR, et (6) le Non-Homologue End-Joining NHEJ (Hakem, 2008).

Bcl-2, lorsqu'il est surexprimé, inhibe la réparation des cassures double brin en inhibant l'hétérodimère Ku 70/86 impliqué dans le NHEJ. Dans ce cas, Bcl-2 est transloqué au noyau où il se lie à Ku70 et Ku86 grâce à ses quatre domaines BH. Sans Bcl-2, l'hétérodimère Ku70/86 reconnaît et se fixe sur les cassures double brin pour ensuite recruter la DNA-PKc et engager la réparation. En présence de Bcl-2, Ku70/86 ne se lie plus à l'ADN et ne forme plus de complexe avec la DNA-PKc (DNA dependant protein kinase). L'ADN n'est plus réparé et l'instabilité génétique augmente (Wang *et al.*, 2008).

Bcl-2 peut inhiber la réparation des mésappariements MMR de deux manières. Bcl-2 peut interagir avec hMSH6 (human MutS homolog 6) par son domaine BH4 et ainsi inhiber la formation du complexe MutSα composé de hMSH6 et hMSH2 (human MutS homolog 2). La perte du complexe MutSα empêche le MMR et favorise la mutagénèse (Hou *et al.*, 2007). Bcl-2 peut aussi agir plus en amont, en inhibant E2F1. hMSH2 étant une cible d'E2F1, on observe une diminution de l'expression de celle-ci et donc une diminution de la formation du complexe MutSα. Ceci a pour conséquence une perte d'efficacité du MMR et donc une augmentation des mutations ce qui prédispose au développement d'un cancer (Youn *et al.*, 2005).

De même, Bcl-2 peut inhiber la réparation par excision de bases BER de deux façons. D'une part, Bcl-2 se lie par son domaine BH4 à c-Myc au niveau de son domaine MBII et favorise son activité transcriptionnelle, diminuant l'expression d'APE1 (Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1). APE1 est une DNA glycosylase essentielle dans la réparation BER. Sa diminution entraine directement une diminution de la réparation de l'ADN

(Jin *et al.*, 2006). D'autre part Bcl-2 peut aussi directement inhiber APE1 en se fixant à celui-ci grâce à ses domaines BH (Zhao *et al.*, 2008).

Mcl-1, comme Bcl-2 peut avoir une implication à la fois dans l'arrêt du cycle et dans l'initiation de la réparation de l'ADN. Lors de traitements tels que l'étoposide, Mcl-1 est transloqué au noyau où il va d'une part phosphoryler Chk1 et activer sa fonction kinase, entrainant un arrêt du cycle en G2 et d'autre part se lier à NBS1 et γH2AX, deux protéines impliquées dans la réparation NHEJ de l'ADN, au niveau des cassures double brin. Les rôles de Mcl-1 dans l'arrêt du cycle et dans la réparation de l'ADN restent cependant obscurs et demandent à être mieux étudiés (Jamil *et al.*, 2008, 2010). Ainsi, Bcl-2, Bcl-xL et peut être Mcl-1 pourraient promouvoir la tumorigénèse en jouant sur l'instabilité chromosomique et la prolifération.

5-4 Les protéines de la famille Bcl-2 et p53

p53 est un facteur de transcription pour un certain nombre de gènes codant pour les protéines de la famille Bcl-2. En effet, sous l'action de p53, de nombreuses protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bax, Noxa ou Puma peuvent être induites (Miyashita and Reed, 1995; Nakano and Vousden, 2001; Oda *et al.*, 2000). Cependant, p53 n'est pas seulement un facteur de transcription c'est aussi une protéine qui peut interagir directement avec les protéines de la famille Bcl-2 et avoir un impact sur leur activité. p53 se lierait directement à Bcl-2 et Bcl-xL et ainsi diminuerait leur action anti-apoptotique (Deng *et al.*, 2006; Hagn *et al.*, 2010). De même, Bcl-2/Bcl-xL pourrait, par séquestration, avoir une action sur l'activité transcriptionnelle de p53 et sur son interaction avec Bax. L'ensemble de ces interactions sera plus longuement décrit dans la quatrième partie dans les activités non transcriptionnelles de p53.

C – La voie pRb/E2F1

Les protéines de la famille E2F et leur principal régulateur pRb sont des protéines régulatrices majeures de la tumorigénèse. Elles sont impliquées dans la progression du le cycle cellulaire. Parallèlement à cette fonction principale, pRb et E2F1 ont aussi été montrés impliqués dans des processus apoptotiques. Le premier membre de la famille des facteurs de transcription E2F à avoir été décrit est E2F1. Il a été découvert en 1986 et a été isolé par trois groupes indépendants sur la base de sa capacité à se lier au promoteur du gène adénoviral E2 et à l'activer (Kovesdi *et al.*, 1986; La Thangue and Rigby, 1987; Yee *et al.*, 1987). A la fin des années 1980, l'équipe de Joe Nevins découvre la famille E2F et leur rôle dans le cycle cellulaire à travers l'étude de la protéine virale E1A. Ils observent qu'E1A peut dissocier une protéine régulatrice d'E2F1 ce qui permet l'activation d'E2F1 et l'entrée dans le cycle. Cette protéine régulatrice sera ensuite désignée comme la protéine pRb (Kovesdi *et al.*, 1986). En parallèle, La Thangue et son équipe identifient une protéine DRTF1 (Differenciation Regulated Transcription Factor 1) qui possède le même site consensus de liaison à l'ADN qu'E2F1 et qui interagit aussi avec pRb (La Thangue and Rigby, 1987). DRTF1 et E2F1 sont en réalité une seule et même protéine qui gardera le nom d'E2F1. E2F1 est codé par le gène *e2f1* situé sur le bras long du chromosome 20 (20q11.2). C'est une protéine nucléaire de 437 acides aminés dont le poids moléculaire est de 60kD.

Des homologues des protéines E2Fs et pRb ont été décrits chez la drosophile (Ohtani and Nevins, 1994), chez C. Elegans (Ceol and Horvitz, 2001), chez le xénope (Suzuki and Hemmati-Brivanlou, 2000) et chez différentes espèces de plantes (Ramírez-Parra *et al.*, 1999). Toutes ces études montrent que la voie pRb/E2F reste très conservée au cours de l'évolution biologique, démontrant l'importance de cette voie dans la signalisation de divers processus cellulaires (van den Heuvel and Dyson, 2008).

1- Les facteurs de transcription E2F et leur régulateur pRb

1-1 Les facteurs de transcription E2F

Chez les mammifères, les facteurs de transcriptions E2F sont codés par huit gènes (e2f1-8). L'ARN d'E2F3 subissant un épissage alternatif (E2F3a et E2F3b), il existe en tout 9 protéines E2F (figure 15). Les E2F1-5 fonctionnent en hétérodimère qui sont composés d'une sous-unité codée par un gène de la famille E2F et d'une sous-unité codée par un gène de la famille DP. Il existe deux protéines DP : DP1 et DP2. Ce sont des co-activateurs des protéines de la famille E2F qui possèdent le même domaine de liaison à l'ADN que les E2Fs

et reconnaissent la même séquence au niveau des promoteurs. Les protéines E2F1-5 ont aussi en commun d'être régulées par les membres de la famille des protéines à poche (pRb, p107 et p130 décrits plus loin). Les protéines E2F6-8 sont un peu particulières, car contrairement aux premières, elles ne sont pas régulées par les membres de la famille des protéines à poches et elles ne se complexent pas avec les protéines de la famille DP.

Les protéines E2F1, 2 et 3 sont considérées comme des protéines activatrices, car ce sont des facteurs de transcription qui vont majoritairement activer leurs gènes cibles. Cependant cette qualification d'activateur n'est pas tout à fait exacte, car il a récemment été démontré que les protéines E2F1, 2 et 3 pouvaient aussi réprimer leurs gènes cibles suivant le contexte cellulaire (Chong *et al.*, 2009). Les protéines E2F2, E2F3a et E2F3b sont très similaires à E2F1 en particulier au niveau des domaines de liaison à l'ADN, de dimérisation avec les protéines DP et de liaison avec pRb. Ces quatre protéines partagent aussi la particularité d'être régulées uniquement par pRb et non par p107 ou p130. E2F3a et b, issus d'un épissage alternatif, ont une structure et des fonctions distinctes. E2F3a, protéine la plus longue, est préférentiellement exprimée dans les cellules prolifératives alors qu'E2F3b, protéine la plus courte, est aussi exprimée dans les cellules quiescentes (Leone *et al.*, 2000).

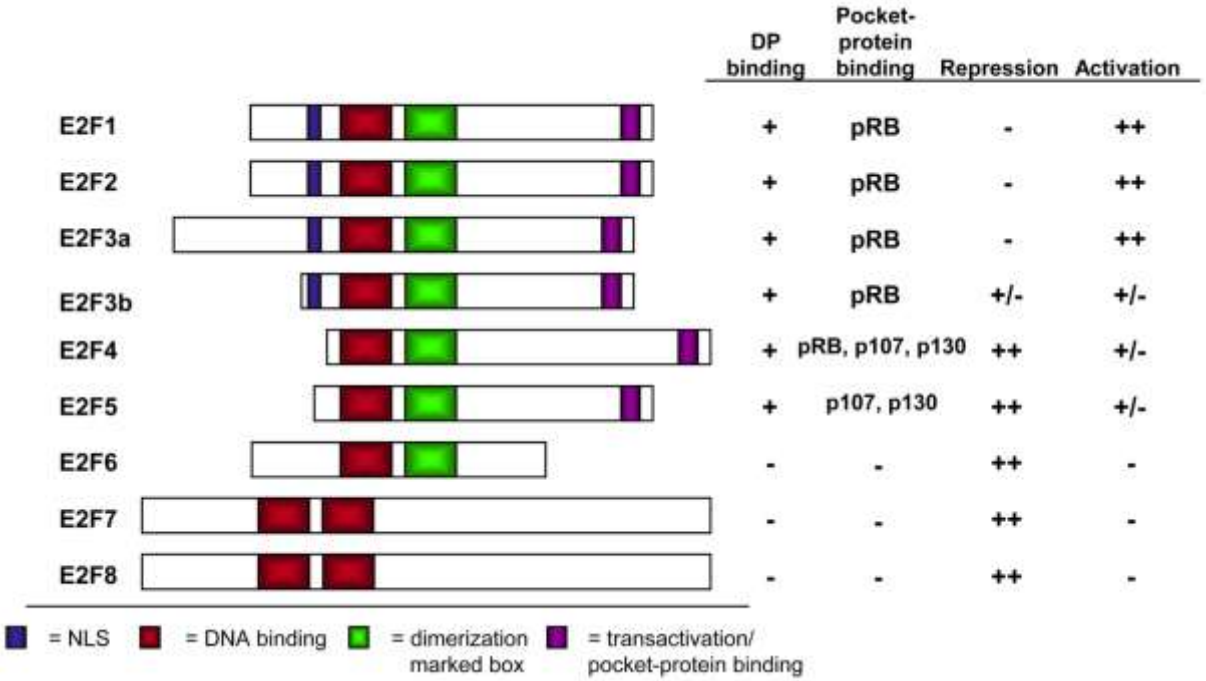


Figure 15 : les facteurs de transcription de la famille E2F. De part leur structure primaire, on peut diviser les protéines E2Fs en trois groupes : E2F1, 2 et 3 qui possèdent une séquence NLS et un domaine de liaison aux pocket-protéines, E2F4 et 5 qui n'ont pas de séquence NLS et EF6, 7 et 8 qui n'ont ni séquence NLS, ni domaine de liaison aux pocket-protéines (Iaquinta and Lees, 2007).

E2F4 à 8 sont considérés comme des répresseurs de la transcription. E2F4 et 5 fonctionnent en hétérodimère avec les protéines DP. E2F4 peut être régulé par l'ensemble des protéines de la famille des protéines à poche (pRb, p107 et p130) alors qu'E2F5 semble s'associer préférentiellement avec p107 et p130. E2F4 et E2F5 fonctionnent, en partie, comme des répresseurs des gènes cibles d'E2F1, 2 et 3 et permettent ainsi une sortie du cycle cellulaire. En phase G0-G1, E2F4 et E2F5 sont majoritaires dans la cellule par rapport à E2F1, 2 et 3. Ils vont se fixer sur les promoteurs cibles, empêchant ainsi les E2Fs activateurs de se fixer à ces promoteurs (Gaubatz *et al.*, 2000). E2F4 et E2F5 peuvent aussi être impliqués dans des processus terminaux de différenciation comme l'adipogénèse ou la maturation des érythrocytes (Fajas *et al.*, 2002; Humbert *et al.*, 2000). E2F6-8 ne forment pas d'hétérodimère avec les protéines DP et ne sont pas régulés par les membres de la famille des protéines à poche. E2F6 est connu pour pouvoir interagir avec les membres du complexe polycomb (PcG), des facteurs chromatiniens impliqués dans la différenciation, permettant la répression de leurs gènes cibles (Trimarchi *et al.*, 2001). E2F7 et 8 sont les dernières protéines identifiées et sont beaucoup moins bien connus que les autres E2Fs (de Bruin *et al.*, 2003; Maiti *et al.*, 2005). Ces deux protéines semblent avoir des fonctions proches dans la prolifération cellulaire.

E2F1 est la protéine la plus étudiée des protéines de la famille E2F. Au-delà d'être impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, elle a la particularité d'être aussi impliquée dans l'apoptose. C'est la seule protéine de la famille E2F qui a été identifiée comme ayant un rôle dans la mort cellulaire (Hallstrom and Nevins, 2003). C'est pourquoi je m'intéresserai par la suite uniquement à la protéine E2F1. Son régulateur principal est la protéine pRb. pRb est une protéine faisant partie de la famille des protéines à poche, qui peut se complexer avec E2F1 et inhiber ses fonctions cellulaires.

1-2 La protéine pRb

Le gène RB1 (rétinoblastome 1) est le premier gène suppresseur de tumeur à avoir été identifié et caractérisé (Lee *et al.*, 1987). La protéine pRb est souvent inactivée dans les cancers par une régulation négative de la part des kinases dépendantes des cyclines (CDK). Elle est fréquemment absente ou mutée dans les cancers du poumon à petites cellules et dans les rétinoblastomes sporadiques et familiaux où le gène a été identifié pour la première fois (Lee *et al.*, 1987). A une fréquence plus faible, on peut retrouver RB1 muté dans d'autres types de cancers sporadiques, souvent dû à une perte d'hétérozygotie. La perte de pRb est critique dans le développement de tumeurs. La perte fonctionnelle de pRb a été impliquée dans des stades avancés de nombreux cancers, dont les cancers du sein, de la vessie, du foie, de l'œsophage et du colon (Arima *et al.*, 2008). Les niveaux d'expression de

pRb sont inversement corrélés avec l'invasion tumorale dans les cancers gastriques (Chou *et al.*, 2006). De plus, un rapport récent indique qu'un des sous types de cancer du sein le plus agressif, les « basal like », exprime un niveau très faible de pRb (Gauthier *et al.*, 2007). L'inactivation de pRb contribuerait alors à l'initiation, la progression des tumeurs ainsi qu'à la formation de métastase.

La protéine pRb codée par le gène RB1 est une protéine de 928 acides aminés dont le poids moléculaire est de 110kD. pRb contient deux domaines A et B séparés par une région flexible appelée aussi « flexible spacer », et qui vont former une structure particulière en forme de « poche » (figure 16). Cette région appelée « small pocket » est critique pour l'activité biologique de pRb en particulier pour son interaction avec les facteurs de transcription E2Fs, mais n'est pas suffisante (Xiao *et al.*, 2003). En effet, seule la région appelée « large pocket » regroupant à la fois les domaines A et B et la région C-terminale peut remplacer *in* vivo l'activité de la protéine pRb totale (Yang *et al.*, 2002). C'est d'ailleurs dans cette région que se trouve concentrée la majorité des mutations retrouvées dans les cancers (Hamel *et al.*, 1993). Des études de structure de pRb ont révélé à la surface d'interaction de la protéine, au niveau du domaine B, une région très conservée dans la famille des protéines à poche, représentant un site de liaison avec les protéines possédant un domaine LXCXE. La séquence LXCXE correspond à une séquence leucine-X-cystéine-X-glutamate où « X » représente n'importe quel acide aminé. Certaines protéines telles que les histones déacétylases HDAC-1 et -2 ou la cycline D, interagissant avec pRb possèdent ce domaine LXCXE. 28 protéines ont été répertoriées comme interagissant avec pRb grâce à ce domaine, par contre les facteurs de transcription E2Fs ne possèdent pas ce domaine d'interaction. De même, certaines protéines virales telles qu'E1A de l'adénovirus ou E7 du papilloma virus humain possèdent également ce site LXCXE ce qui leur permet d'entrer en compétition avec les partenaires cellulaires de pRb et d'interagir avec celui-ci. Ces interactions pRb-protéines virales ont pour conséquence de participer aux processus oncogéniques en inactivant pRb (Lee *et al.*, 1998).

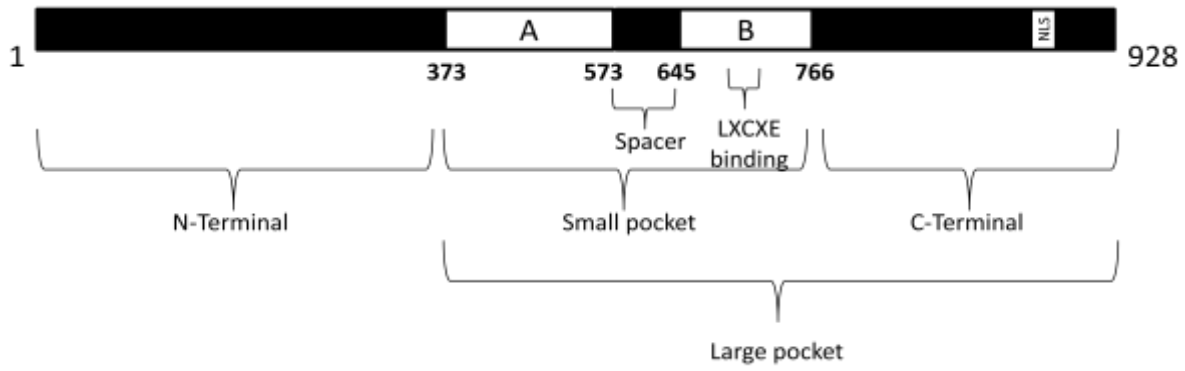


Figure 16 : Structure de la protéine pRb

L'extrémité C-terminale est un domaine d'interaction et de régulation important dans la protéine pRb. Englobée dans le domaine « large pocket », l'extrémité C-terminale participe à l'interaction de pRb avec les protéines de la famille E2F. Cette extrémité permet aussi la liaison de pRb aux protéines MDM2, une ubiquitine ligase, et c-Abl, une protéine kinase ainsi qu'à certaines cyclines (cycline E et A). Enfin, c'est au niveau C-terminal que se trouve la séquence de localisation au noyau (NLS).

Les fonctions du domaine N-terminal sont beaucoup moins connues. Il semble cependant important d'une part dans la stabilisation conformationnelle de la protéine et d'autre part dans l'interaction avec d'autres protéines comme des protéines chaperonnes de la famille Hsp90 (De Falco *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 1996).

p107 et p130 sont deux autres membres de la famille des protéines à poche dont fait parti pRb, qui sont principalement connus pour leurs rôles dans le développement et la différenciation. Ces deux protéines sont structurellement très proches de pRb avec une très grande homologie au niveau de la « poche ». Comme pRb, p107 et p130 possèdent une structure en poche bipartite qui leur permet de se lier aux protéines de la famille E2F ainsi qu'aux protéines virales (Classon and Dyson, 2001). En revanche, p107 et p130 ne se lient pas avec la même affinité que pRb aux protéines de la famille E2F. Alors que pRb s'associe avec E2F-1, -2, -3 et -4, *in vivo*, p107 et p130 s'associe presque exclusivement à E2F-4 et -5 (Hauser *et al.*, 1997). p107 et p130 ne régulant pas E2F1, je m'intéresserai par la suite uniquement à pRb, régulateur majeur d'E2F1.

1-3 Fonction majeure des protéines pRb et E2F : régulation du cycle cellulaire

pRb et les protéines E2Fs de manière coordonnée ou non, sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires dont la plus connue est la régulation du cycle cellulaire.

Au-delà de la prolifération, ces protéines peuvent aussi être impliquées dans la différenciation, la réparation de l'ADN ou la mort cellulaire.

Le rôle le plus connu de pRb et le plus ancien mis en évidence est son rôle dans la régulation du cycle cellulaire au niveau de la transition G1-S (Pardee, 1974). En effet, pRb régule négativement les protéines de la famille E2F qui permettent l'entrée et la progression dans la phase S. La régulation du complexe pRb/E2F dans le cycle cellulaire se fait par phosphorylation de pRb par les CDK (cyclines dependent kinases) (cf chapitre A-2-1 et C-3-1). pRb phosphorylé, les E2Fs sont libérés et ils vont pouvoir agir en tant que facteurs de transcription et activer des gènes codant des protéines impliquées dans l'initiation de la réplication (Mcm2-7, Cdc6…) dans la synthèse de l'ADN (polymérase α, thymidine kinase…) ou dans la progression du cycle cellulaire (cdc2, cycline A, cycline E…) (Bracken *et al.*, 2004). La régulation du cycle par pRb peut se faire aussi indépendamment de sa liaison avec les facteurs de transcription E2Fs, en participant au remodelage de la chromatine en recrutant des facteurs tels que les histones déacétylases (HDAC), Polycomb (protéine de remodelage de la chromatine) ou méthyl transférase (Stevaux and Dyson, 2002).

2- La voie pRb/E2F1 dans les mécanismes suppresseurs de tumeur

2-1 La sénescence

L'une des premières étapes nécessaires au déclenchement de la sénescence, est un arrêt prolongé en G1. pRb a plusieurs possibilités pour participer à cet arrêt et donc favoriser la sénescence. Tout d'abord, $p16^{INKa}$ peut activer pRb en inhibant les kinases dépendantes de la cycline D qui ne peuvent plus phosphoryler pRb. En parallèle, $p14^{ARF}$, codé par le même locus que $p16^{INKa}$, stabilise p53 en interagissant avec son inhibiteur MDM2. p53 activé, peut ensuite inhiber pRb en activant la transcription de p21. Ce dernier va inhiber la phosphorylation de pRb par les kinases et ainsi l'activer. Dans les deux cas, pRb hypophosphorylé peut inhiber les facteurs de transcription E2Fs et provoquer un arrêt en G1 (Lowe and Sherr, 2003). De plus, la protéine pRb, lors de la sénescence, est également accumulée sur les promoteurs des gènes cibles d'E2F et initie la formation de SAHF (senescence-associated heterochromatin foci), des domaines d'hétérochromatine, inhibant ainsi la transcription de ces gènes et provoquant un arrêt en G1 (Narita *et al.*, 2003). Enfin, la protéine pRb peut induire la sénescence indépendamment de son interaction avec les protéines E2F, via l'accumulation de $p27^{KIP1}$, par un mécanisme inconnu, inhibant ainsi les kinases dépendantes de la cycline E et induisant la sénescence (Alexander and Hinds, 2001).

2-2 L'autophagie

Peu d'études ont été menées sur le rôle d'E2F1 dans l'autophagie et les rares études publiées semblent exposer des résultats contradictoires. E2F1, selon le contexte, pourrait avoir un effet différent sur l'autophagie. Dans des cellules d'ostéosarcome Saos2, une activité excessive d'E2F1 inhiberait l'autophagie et la transfection de pRb hypophosphorylée dans ces cellules, lèverait cette inhibition. Une des possibilités pour E2F1 d'inhiber l'autophagie passerait par l'activation de Bcl-2. E2F1 activerait transcriptionnelllement Bcl-2 qui inhiberait l'autophagie en se liant à Beclin 1 et en réprimant l'activité du complexe PI3Kc3 impliqué dans l'autophagie (Jiang *et al.*, 2010). Une autre étude en contradiction avec celle-ci, est venue complexifier le rôle d'E2F1 dans l'autophagie. En effet, dans les cellules d'ostéosarcome U2OS traitées par du 4-hydroxytamoxifen (OHT), E2F1, au lieu de freiner l'autophagie, contribuerait à son déclenchement en activant la transcription directement de ATG8 (autophagy related gene-8), ATG1 (autophagy related gene-1) et DRAM (damage-regulated autophagy modulator) et indirectement de ATG5 (autophagy related gene-5) (Polager *et al.*, 2008). L'ensemble de ces gènes code des protéines impliquées dans l'autophagie. Dans ce cas, E2F1 semble avoir un rôle pro-autophagique.

2-3 L'apoptose

2-3-1 Les voies apoptotiques déclenchées par E2F1

E2F1, contrairement à E2F2 et E2F3, a pour cibles transcriptionnelles des gènes impliqués dans l'apoptose. La surexpression d'E2F1, dans des fibroblastes quiescents, induit l'apoptose alors que la perte d'E2F1 chez des souris diminue fortement l'apoptose des thymocytes (Kowalik *et al.*, 1995; Field *et al.*, 1996). E2F1 peut induire l'apoptose de manière p53 dépendant et p53 indépendant. Plusieurs gènes impliqués dans l'activation, ou l'exécution de l'apoptose, ont été identifiés comme cibles d'E2F1 avec une augmentation de leur expression lorsqu'E2F1 est surexprimé tels que Apaf-1, caspase 3 et 7, p73,…

E2F1 lors de dommages à l'ADN peut stabiliser et favoriser l'activation de p53 (figure 17). La voie la plus connue est celle impliquant la protéine $p14^{ARF}$, cible directe d'E2F1 (Bates *et al.*, 1998). $p14^{ARF}$ activé peut ensuite stabiliser p53 en inhibant son interaction avec MDM2. Malgré tout, cette voie de signalisation n'est pas l'unique voie par laquelle E2F1 peut activer p53 et favoriser l'apoptose. E2F1 a également pour cible ASPP1 et ASPP2, deux cofacteurs de p53 participant à la fixation de p53 sur les promoteurs de gènes pro-apoptotiques dont celui codant la protéine Bax. En parallèle, E2F1 peut activer la transcription de PIN1 qui inhibe iASPP, un inhibiteur de l'apoptose induite par p53 (Mantovani *et al.*, 2007). E2F1 ne fait pas seulement qu'activer p53, mais a un réel rôle de

régulation de son activité selon le contexte cellulaire. Il peut ainsi inhiber l'action de p53 en particulier via SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2), une protéine qui favorise l'ubiquitination de protéines du cycle et via SIRT1, une protéine déacétylase (Kitagawa *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2001).

Cependant, E2F1 peut induire l'apoptose non pas en activant p53, mais en activant la transcription d'un homologue de p53, p73. E2F1, en particulier lorsqu'il est acétylé, peut se fixer sur le promoteur P1 de p73 et activer la transcription de TAp73, la forme active de p73. p73 peut ensuite, comme p53, activer des gènes codant des protéines impliquées dans l'apoptose notamment Bax, Puma ou Noxa (Pediconi *et al.*, 2003). Ainsi, p73 est un acteur majeur de l'apoptose induite par E2F1, en réponse aux dommages à l'ADN, en particulier lorsque p53 est muté. L'inactivation de p73 inhiberait l'apoptose induite par E2F1 et la transfection, dans des cellules d'ostéosarcome, de p73, réactiverait l'apoptose induite par E2F1 (Irwin *et al.*, 2000)

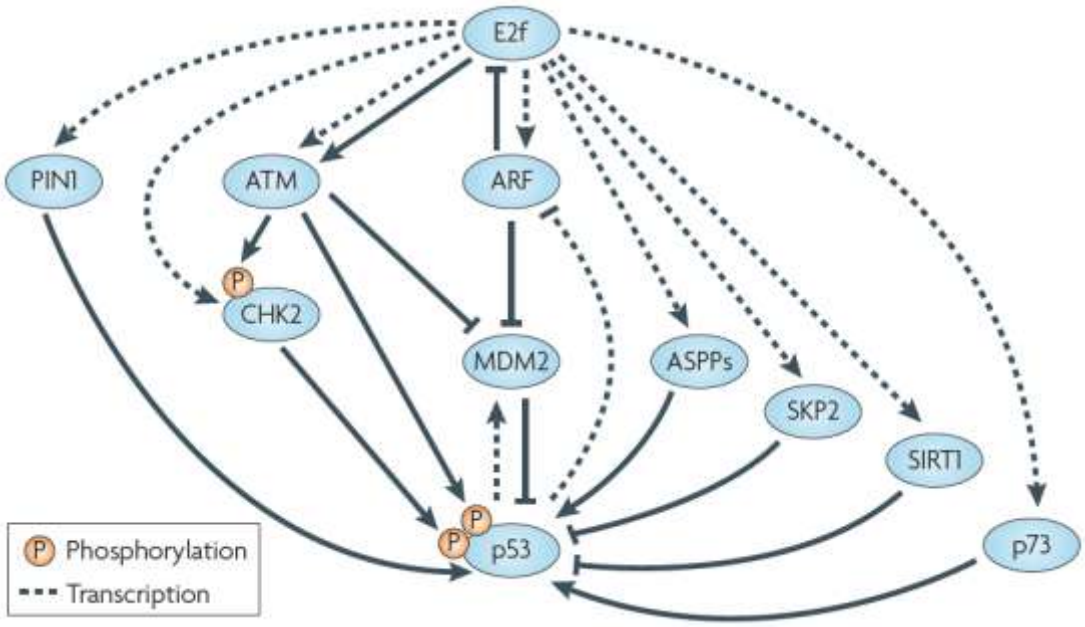


Figure 17 : E2F1 régule le niveau de p53 et son activité. E2F1 peut réguler p53 au niveau de son expression et de son activité en régulant la transcription de plusieurs régulateurs directs ou indirects de p53 (Polager and Ginsberg, 2009)**.**

Par ailleurs, E2F1, dans ses fonctions pro-apoptotiques, peut réguler directement de façon transcriptionnelle, les protéines de la famille Bcl-2 dont Bim, Noxa, Puma et Hrk (Hershko and Ginsberg, 2004). La surexpression d'E2F1 induirait ces quatre BH3-seul, contribuant à induire l'apoptose. Une inhibition de Puma ou Noxa, contrecarrerait cette mort induite par E2F1. E2F1 a donc une fonction activatrice des BH3-seul qui a pour conséquence la translocation de Bax à la mitochondrie et le relargage du cytochrome C conduisant à la mort (Hershko and Ginsberg, 2004; Hao *et al.*, 2007). En parallèle, E2F1 peut réguler négativement les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Mcl-1. Dans les fibroblastes de souris NIH3T3, E2F1 se fixerait directement sur le promoteur de Mcl-1 et réprimerait celui-ci. A l'inverse, une surexpression d'E2F1 diminuerait l'expression de Mcl-1. La régulation de Mcl-1 par E2F1 nécessiterait son domaine de liaison à l'ADN, mais pas nécessairement son domaine de transactivation (Eischen *et al.*, 2001; Croxton *et al.*, 2002).

Enfin, E2F1 peut induire l'apoptose en régulant l'expression d'activateurs directs de l'apoptose comme Apaf-1 ou les caspases. Il est aussi impliqué dans l'activation de la transcription de la protéine appelée RRP1B qui s'associerait à E2F1 et servirait de cofacteur pour induire d'autres gènes cibles d'E2F1 impliqués dans l'apoptose dont la caspase 7 (Paik *et al.*, 2010).

Ainsi, E2F1 est un facteur de transcription important dans le devenir de la cellule, qui est impliqué à la fois dans le cycle cellulaire et dans l'apoptose. Cette dualité dans ces fonctions, E2F1 ne la partage pas avec les autres E2Fs, mais avec un autre facteur de transcription bien connu, p53 (Polager and Ginsberg, 2009). Les voies de signalisation dépendante de p53 ou d'E2F1 sont très souvent dérégulées dans les cancers et elles possèdent de nombreux croisements. Effectivement, E2F1 et p53 ont à la fois des régulateurs communs dont MDM2, mais aussi des gènes cibles communs dont Noxa et Puma.

2-3-2 La liaison spécifique pRb/E2F1

pRb régule la fonction d'E2F1 ainsi que celle d'E2F2 et d'E2F3 dans le cycle cellulaire, mais a-t-il une action sur les fonctions pro-apoptotiques propres à E2F1. Si c'est le cas comment peut-il réguler ces deux fonctions aux conséquences opposées ? L'équipe de F. A. Dick est une des équipes qui a le plus travaillé sur cette question et qui a pu mettre en évidence une liaison spécifique entre E2F1 et pRb qui permettrait à pRb de réguler les fonctions pro-apoptotiques d'E2F1 indépendamment de ses fonctions prolifératives (Dick and Dyson, 2003).

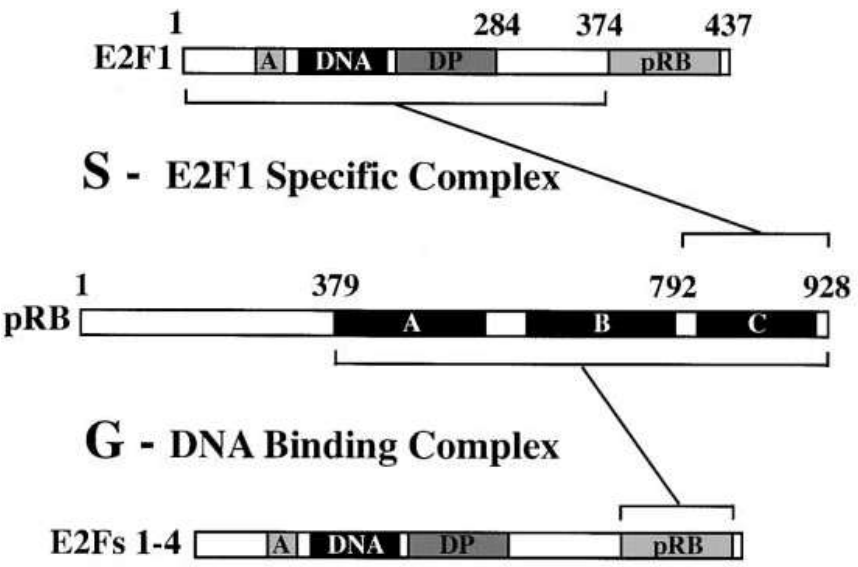


Figure 18 : interactions de pRb avec E2F1 au niveau du site spécifique et du site général. Les régions minimales indispensables pour permettre l'interaction de pRb avec E2F1 au niveau du site spécifique (S) et avec les E2Fs au niveau du site général (G) sont indiquées (Cecchini and Dick, 2011).

pRb possède deux sites de liaison à E2F1 : un site général commun à tous les E2Fs et un site spécifique à E2F1 (Dick and Dyson, 2003). Ces deux interactions sont vraiment distinctes, car elles engagent des sites différents à la fois sur pRb et sur E2F1 (figure 18). Le site général comprend les domaines A et B et l'extrémité C-terminale de pRb et interagit avec l'extrémité C-terminale des E2Fs. Le site spécifique se situe à l'extrémité C-terminale de pRb et interagit avec E2F1 au niveau des acides aminés 272-282, séquence très spécifique d'E2F1. Lorsqu'on intègre cette séquence au niveau d'E2F3, celui-ci acquière la capacité à lier pRb au niveau de son site spécifique (Julian *et al.*, 2008).

La génération d'un pRb muté au niveau du site général appelé RBΔE2F-G, entraine la perte de liaison d'E2F2-4, mais pas d'E2F1. La perte du site général permet toujours à pRb de réguler l'activité pro-apoptotique d'E2F1 par contre pRb perd la majeure partie de sa fonction dans la régulation du cycle cellulaire. La liaison spécifique entre pRb et E2F1 peut donc réguler l'apoptose induite par E2F1, mais n'a qu'une action restreinte sur le contrôle du cycle cellulaire (Julian *et al.*, 2008).

L'interaction de pRb avec les protéines E2Fs est régulée majoritairement par la phosphorylation de pRb. La question qui se pose est de savoir si la phosphorylation de pRb régule la liaison d'E2F1 à pRb au niveau des deux sites ou seulement au niveau d'un des deux. En 2011, l'équipe d'A. Dick démontre qu'E2F1 est capable de se lier à pRb hyperphosphorylé ce qui n'est pas le cas pour les autres E2Fs. Cette liaison est conservée

avec la forme mutée pRbΔE2F-G mais pas avec la forme mutée pRbΔE2F-S (ne possédant plus le site spécifique). Une simple substitution entre un résidu valine et un résidu proline dans le site de liaison spécifique au niveau des E2Fs est responsable de la capacité d'E2F1 et de l'incapacité d'E2F3 à lier pRb hyperphosphorlylé (Cecchini and Dick, 2011). Ces nouvelles données montrent que les fonctions pro-apoptotiques d'E2F1 sont régulées par sa liaison avec pRb au niveau du site spécifique et que cette liaison ne serait pas régulée par l'état de phosphorylation de pRb. Ainsi, les fonctions d'E2F1 dans le cycle cellulaire et dans l'apoptose seraient régulées distinctement (figure 19).

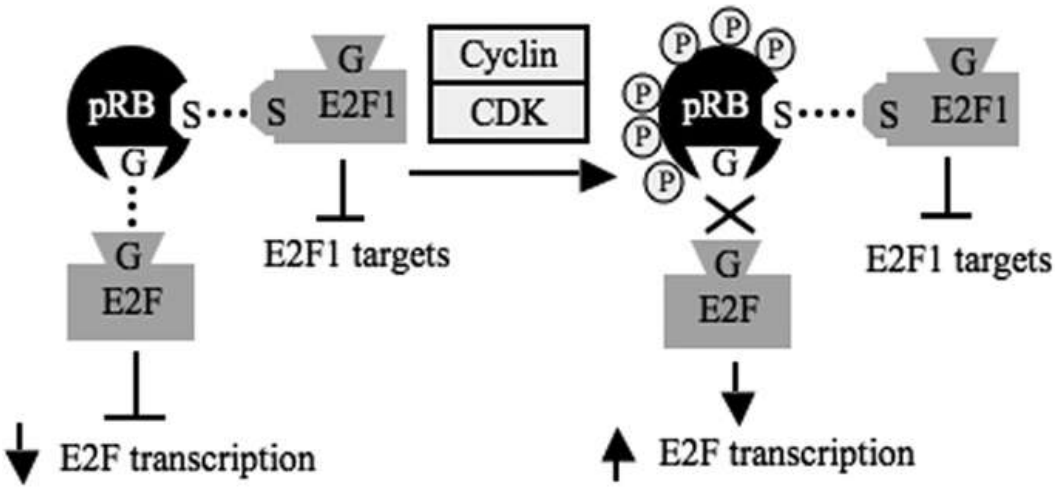


Figure 19 : Model de régulation de l'interaction de pRb et E2F par la phosphorylation. La phosphorylation de pRb par les complexes cyclines/Cdk a pour conséquence une série de changements conformationnels qui inhibe l'interaction des E2Fs avec le site général résultant à une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le cycle. Au contraire, le site spécifique n'est pas perturbé et permet toujours une interaction entre pRb et E2F1 qui régule la transcription. « G », interaction générale ; « S », interaction spécifique (Cecchini and Dick, 2011).

2-3-3 Le clivage de pRb par les caspases

Au cours de l'apoptose, pRb est un substrat des caspases avec plusieurs sites spécifiques reconnus par celles-ci. Le rôle de ce clivage dans l'apoptose induit par E2F1 n'est pas élucidé. Il existe trois sites qui sont conservés des rongeurs jusqu'à l'homme. Deux sites en N-terminal (LExD et DxID) et un site à l'extrémité C-terminale (DEAD). Le site DEAD génère une forme tronquée $p100^{Rb}$ et un petit fragment de 42 acides aminés. Le site DxID génère deux formes tronquées $p68^{Rb}$ et $p48^{Rb}$. Le dernier site LExD est le moins bien connu, il génère une forme tronquée $p76^{Rb}$ (figure 20).

Le site de clivage DEAD est le premier site de pRb étudié. Le clivage de pRb à ce niveau génère la forme tronquée $p100^{Rb}$ et un petit fragment de 42 acides aminés avec un poids apparent de 5 kD. Plusieurs études, dans différentes lignées cellulaires, ont montré que ce clivage s'effectuait lors de l'apoptose et qu'il était dépendant des caspases (Jänicke *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Tan and Wang, 1998). Le clivage de pRb peut être déclenché par différents inducteurs de mort comme TNF-α, CD95/Fas, étoposide, cisplatine… Ce site est reconnu par trois caspases différentes : les caspases 3 et 7 et la caspase 8 (Tan *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2007). *In vitro*, la mutation du site DEAD, empêchant son clivage, inhibe l'effet pro-apoptotique de TNF-α indiquant que le clivage de pRb ne serait pas seulement une conséquence de la mort cellulaire, mais aurait un rôle dans l'apoptose (Tan *et al.*, 1997). *In vivo*, chez la souris, la création d'une mutation similaire (Rb-MI) confère une résistance à l'apoptose dépendante de TNF-α mais pas à l'apoptose induite par TRAIL ou le récepteur FAS (Chau *et al.*, 2002, 2004). pRb est clivé par les caspases lors de l'apoptose, ce qui laisse à penser que le clivage de pRb n'est pas un phénomène précoce inducteur de l'apoptose, mais que ce clivage pourrait participer à des phénomènes d'amplification de ce signal de mort dans certains contextes apoptotiques.

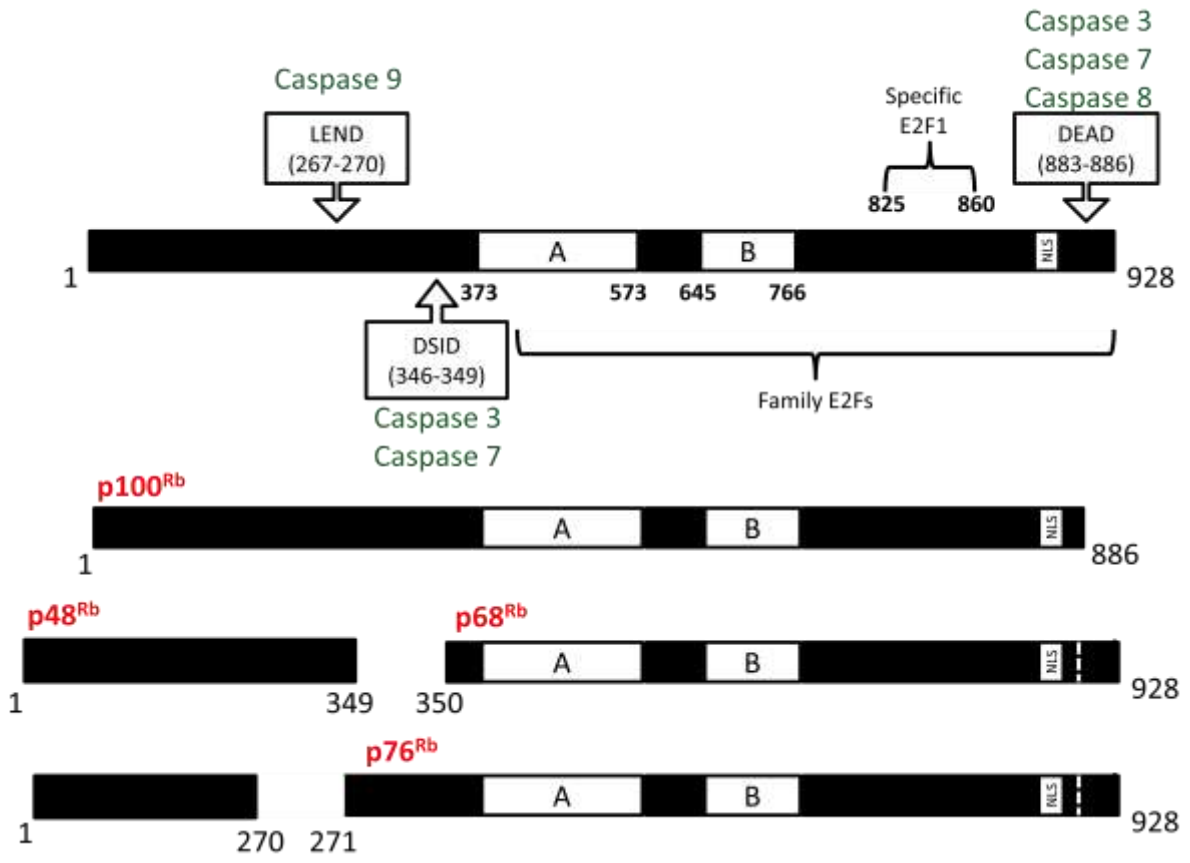


Figure 20 : Différentes formes tronquées de pRb avec les sites de clivage des caspases. Les trois sites de clivage des caspases sont indiqués sur la représentation de pRb total ainsi que les sites spécifique et général d'E2F1 avec pRb. Les formes tronquées générées par le clivage des caspases sont représentées en dessous de pRb total.

D'autres données plus récentes viennent soutenir l'hypothèse que le clivage de pRb permettrait d'amplifier la réponse apoptotique. Au niveau mécanistique, particulièrement pour le déclenchement de la voie apoptotique extrinsèque l'équipe de J.Y Wang propose un clivage de pRb par la caspase 8, au niveau du site DEAD, qui libérerait une protéine non identifiée liée à pRb qui pourrait par la suite amplifier le signal pro-apoptotique (figure 21). Cette protéine inhiberait la dégradation du récepteur TNFR avec le complexe DISC et favoriserait la dissociation du récepteur TNFR à ce complexe. Le complexe DISC, via la caspase 8 pourrait alors cliver Bid et activer la voie intrinsèque (Huang *et al.*, 2007). À part ce modèle proposé il y a quatre ans, le rôle de cette forme tronquée de pRb reste méconnu. A noter que la forme $p100^{Rb}$ garde sa capacité à lier les protéines de la famille E2F suggérant que la forme tronquée de pRb favoriserait l'apoptose non par la libération d'E2F1, mais par un autre mécanisme dépendant ou non d'E2F1 qu'il reste à définir.

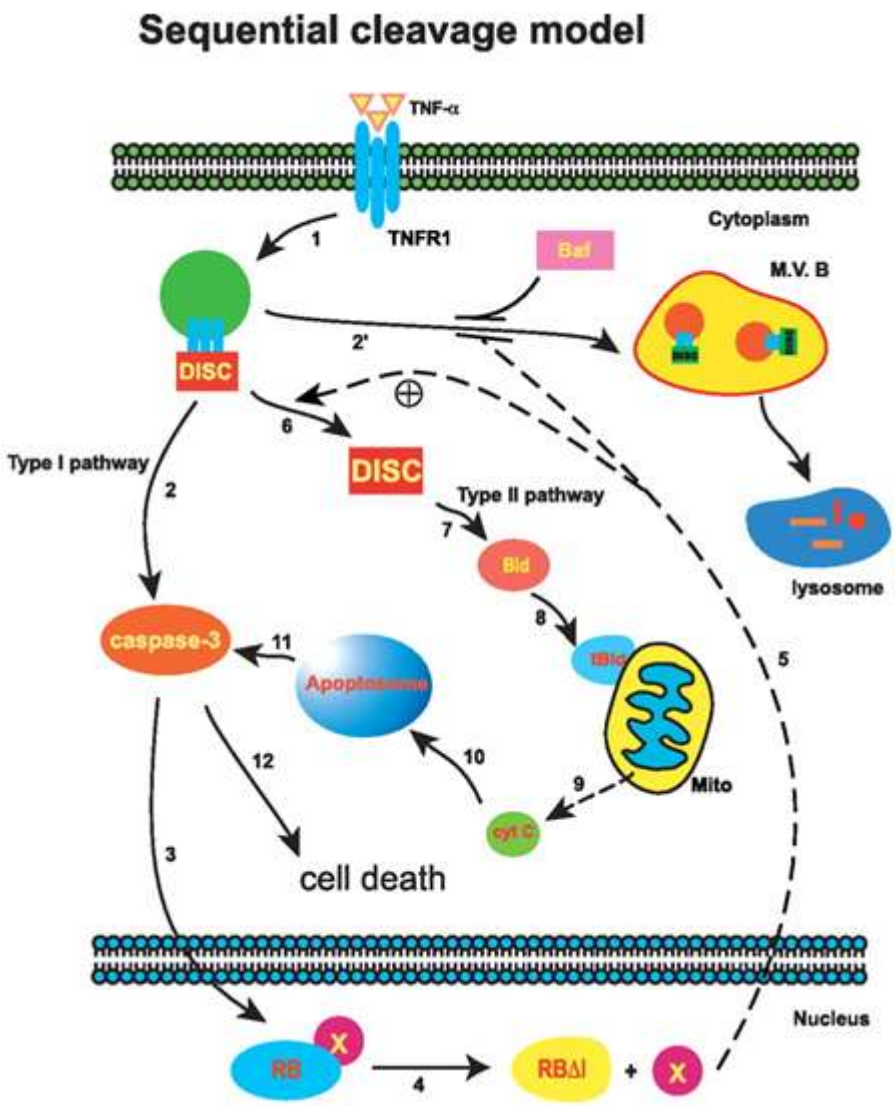


Figure 21 : Déclenchement séquentiel de l'apoptose. pRb est clivé par la voie de signalisation de type I (Type I pathway) ce qui permet la libération d'une protéine non identifiée. Cette protéine peut alors inhiber la dégradation du récepteur TNFR avec le complexe DISC par les lysosomes et favoriser la dissociation du complexe DISC au récepteur TNFR. Le complexe DISC clive la protéine Bid via la caspase 8 et déclenche la voie intrinsèque (Huang *et al.*, 2007).

Le clivage au niveau du site DSID est aussi observé au cours de l'apoptose. Il est reconnu par les caspases 3 et 7 et il génère deux formes tronquées, la forme $p68^{Rb}$ qui conserve les domaines A et B ainsi que l'extrémité C-terminale et la forme plus courte $p48^{Rb}$ qui correspond à la partie N-terminale de pRb (Dou and An, 1998). Ces deux formes tronquées ne semblent plus pouvoir interagir avec les facteurs de transcription E2Fs (Fattman *et al.*, 1997). Ce clivage aurait donc pour conséquence une dérégulation du cycle cellulaire en faveur de la prolifération. $p68^{Rb}$ contient toujours la séquence de localisation au noyau NLS, elle est donc nucléaire. En revanche, $p48^{Rb}$ n'ayant plus cette séquence, serait majoritairement localisé dans le cytoplasme (Dou and An, 1998).

D'après Fattman et al., lors d'un traitement à l'étoposide, les clivages au niveau des sites DEAD et DSID se produiraient de manière séquentielle (figure 22). pRb serait d'abord clivé par les caspases 3 et 7 en C-terminal ce qui provoquerait un changement de conformation de la protéine et l'exposition du site DSID. Les caspases cliveraient pRb ensuite au niveau de ce deuxième site pour générer les formes tronquées $p48^{Rb}$ et $p68^{Rb}$. Ces deux formes ne lieraient plus les protéines E2Fs, qui seraient alors libres d'activer la transition G1-S et de promouvoir l'apoptose (Fattman *et al.*, 2001).

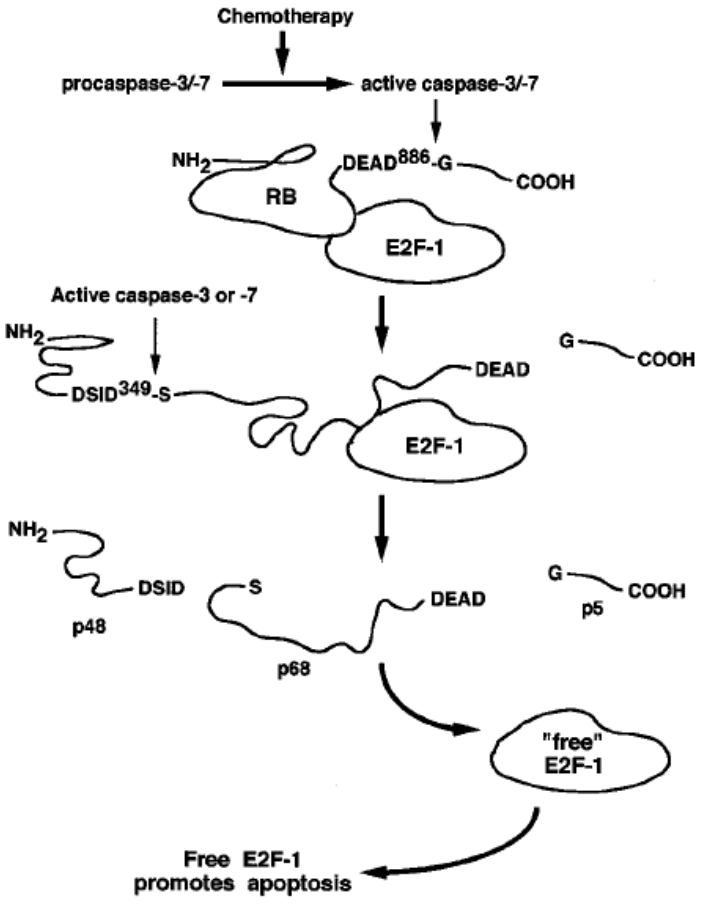


Figure 22 : Model de clivage en deux étapes de la protéine pRb lors de l'apoptose induite par l'étoposide. Le clivage de pRb intervient en deux étapes. Tout d'abord les caspases 3 et 7 clivent pRb au niveau du site DEAD en C-terminal pour générer la forme $p100^{Rb}$. Ce premier clivage démasque le site de clivage DSID qui une fois clivé génère les formes tronquées $p48^{Rb}$ et $p68^{Rb}$ (Fattman *et al.*, 2001).

La forme tronquée $p76^{Rb}$ est la forme la moins bien connue. Le site LExD a été montré comme reconnu par la caspase 9 uniquement, pour le moment. L'introduction de $p76^{Rb}$ dans différentes lignées cellulaires déclenche la mort cellulaire en absence de tout autre inducteur d'apoptose. La mort induite par $p76^{Rb}$ est dépendante de Bax et peut être diminuée par une surexpression de Bcl-2 ou une inhibition des caspases (Le Floch *et al.*, 2010).

Ainsi, les formes clivées de pRb semblent avoir un rôle pro-apoptotique qui n'est pas seulement la conséquence d'une libération d'E2F1 pro-apoptotique. pRb étant un inhibiteur d'E2F1, on aurait pu croire qu'il avait un rôle anti-apoptotique en inhibant l'activation des gènes cibles d'E2F1. Il semble cependant que les fonctions de pRb dans l'apoptose soient plus complexes puisque l'étude de ces formes tronquées de pRb démontre au contraire, un rôle pro-apoptotique de celui-ci. pRb pourrait alors avoir une fonction pro- ou anti-apoptotique suivant le contexte cellulaire et ses modifications post-traductionnelles.

2-3-4 La dualité de pRb dans l'apoptose

pRb est connu majoritairement comme suppresseur de tumeur dû à sa fonction d'arrêt du cycle cellulaire via E2F1 (cf chapitre C-1-2). L'ablation des gènes RB1 chez la souris a pour conséquence majeure un excès d'apoptose dans le muscle squelettique, le système nerveux ou le cristallin conduisant à la mort de la souris (Lee *et al.*, 1992). Ces données témoignent du rôle anti-apoptotique de pRb. La protéine pRb agirait sur l'apoptose de différentes manières. pRb inhiberait les fonctions de facteur de transcription d'E2F1 soit directement en se liant à celui-ci, soit indirectement en recrutant des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine (Stevaux and Dyson, 2002). E2F1 sera alors dans l'incapacité d'activer ses gènes cibles codant des protéines pro-apoptotiques telles que Noxa, Puma ou Bim (Hershko and Ginsberg, 2004). De cette façon pRb peut inhiber l'apoptose dépendante d'E2F1. Par ailleurs, pRb peut avoir un rôle anti-apoptotique dépendant de p53 (Haupt *et al.*, 1995). pRb, empêcherait E2F1 d'activer la transcription de $p14^{ARF}$ et Pin1 qui régulent positivement p53 (figure 17). De plus, pRb peut aussi inhiber l'apoptose induite par un homologue de p53, p73. En se liant à c-Abl, protéine kinase qui peut phosphoryler et activer p73, pRb inhiberait son activité kinase et empêcherait l'activation de p73 (Wang and Ki, 2001). Enfin, pRb pourrait directement inhiber des protéines pro-apoptotiques telles que la protéine nucléaire pp32, la kinase JNK/SAPK ou encore la protéine p85N5 (Adegbola and Pasternack, 2005; Shim *et al.*, 2000; Doostzadeh-Cizeron *et al.*, 1999).

pRb jouerait un rôle pro-apoptotique dans certains contextes cellulaires indépendamment de sa capacité à bloquer E2F1. Chez *Caenorhabditis Elegans*, la protéine

LIN-35 (homologue de pRB) non fonctionnelle entraîne une diminution de l'apoptose des cellules germinales. Une diminution similaire de l'apoptose est retrouvée lors de la perte de DPL-1 (homologue de DP) ou EFL-1 ou -2 (homologue d'E2F1). Les mécanismes mis en jeu, en revanche, sont différents. LIN-35 réprime CED-9, protéine anti-apoptotique homologue de Bcl-2 et DPL-1 et EFL-1 et -2 induisent l'expression de gènes pro-apoptotiques ced-4 et ced-3 (Schertel and Conradt, 2007). Chez la drosophile, RBF (homologue de pRb) induit l'apoptose de manière caspase dépendante dans les cellules en prolifération, mais pas dans les cellules post-mitotiques (Milet *et al.*, 2010). Cette apoptose induite par RBF est inhibée par la co-expression de dE2F1 (homologue d'E2F1). Les mécanismes par lesquels RBF induit l'apoptose chez la drosophile ne sont, aujourd'hui, pas encore connus. Chez les mammifères, pRb peut aussi avoir des fonctions pro-apoptotiques et pourrait participer avec E2F1 à activer des gènes pro-apoptotiques. L'équipe de J.A. Lees a récemment montré que lors de dommages à l'ADN ou lors de stress oncogéniques induits par E1A, le complexe pRb/E2F1 reste formé bien que pRb soit sous sa forme hyperphosphorylée. pRb est retrouvé associé aux promoteurs pro-apoptotiques, cibles d'E2F1 dont p73 et caspase 7 (Ianari *et al.*, 2009). Ces promoteurs sont, dans ce cas, transcriptionnellement actifs et la liaison de pRb avec E2F1 à ces promoteurs est requise pour une induction maximale de l'apoptose *in vivo* et *in vitro*. En effet, la transfection des cellules de glioblastome T98G, par un shpRb, provoque une diminution de la mort induite par la doxorubicine ou l'étoposide et une diminution de l'expression de p73 et caspase 7. Dans les cellules en prolifération où pRb est hyperphosphorylé, les stress génotoxiques favoriseraient la formation du complexe pRb-E2F1-P/CAF. L'hyperphosphorylation de pRb inhiberait, en revanche, sa participation à des complexes répressifs qui se forment dans des cellules non proliératives en G0/G1 (figure 23). Dans les cellules quiescentes, pRb est hypophosphorylé et il peut se lier à des dé-acétylase comme les HDAC ce qui induit un arrêt du cycle plutôt que le déclenchement de la mort cellulaire. Ainsi, pRb, suivant le contexte cellulaire et les voies de signalisation mises en jeu, peut être anti-apoptotique ou pro-apoptotique. Cette complexité de la fonction de pRb est permise uniquement par une importante régulation mettant en jeu à la fois la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination et le clivage.

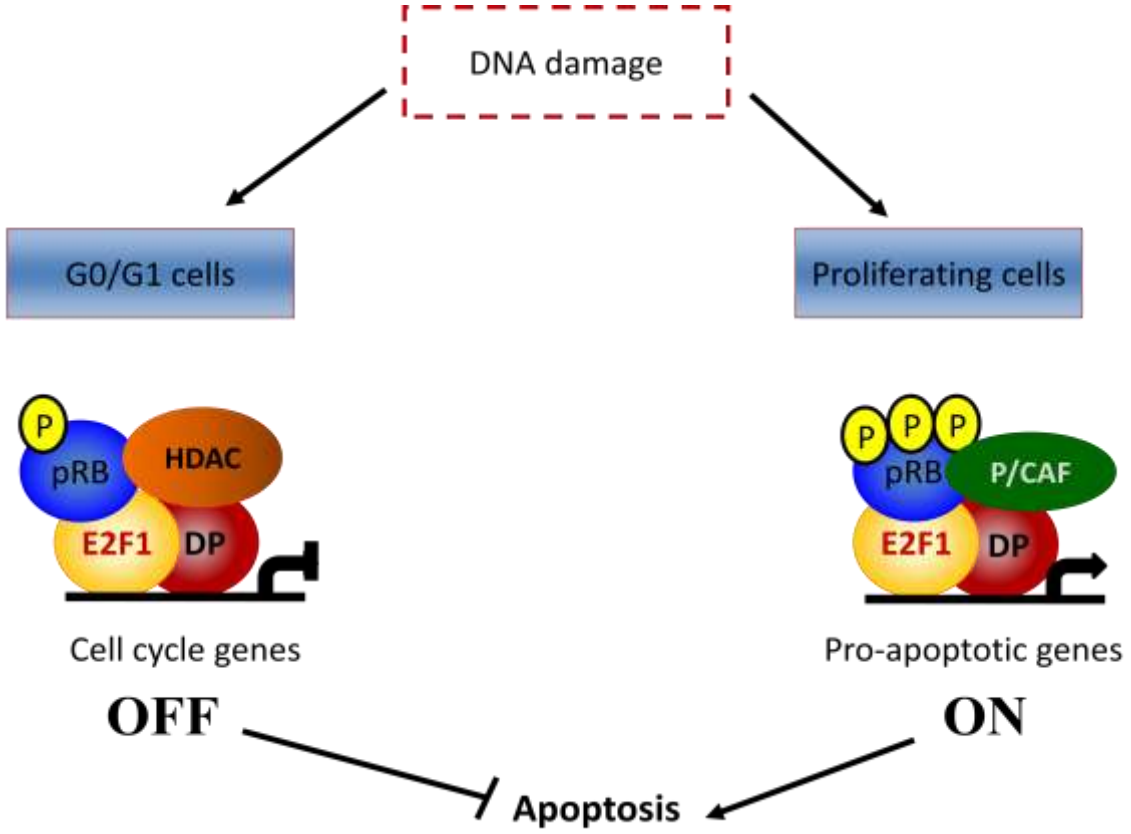


Figure 23 : Modèle de la régulation par le complexe pRb/E2F1 des gènes impliqués dans l'apoptose ou dans la prolifération en réponse aux dommages à l'ADN. Lors de dommages à l'ADN dans les cellules quiescentes pRb hypophosphorylé forme un complexe avec HDAC et E2F1 et inhibe les gènes cibles d'E2F1 impliqués dans le cycle cellulaire induisant ainsi un arrêt du cycle cellulaire. Dans les cellules en prolifération, pRb hyperphosphorylé forme un complexe avec P/CAF et E2F1 et active les gènes cibles d'E2F1 impliqués dans l'apoptose induisant ainsi la mort cellulaire (d'après Ianari *et al.*, 2009).

3- La régulation des protéines pRb et E2F1

3-1 La phosphorylation

La phosphorylation est un mécanisme de régulation essentiel de la protéine pRb, en particulier pour sa fonction dans le cycle cellulaire. Dans les cancers possédant un pRb sauvage, celui-ci est présent majoritairement sous sa forme hyperphosphorylée, dû à une dérégulation des CDK, conduisant à une prolifération accrue des cellules cancéreuses. Cependant, la phosphorylation de pRb peut aussi avoir des conséquences dans le déclenchement de l'apoptose en régulant l'association de pRb avec E2F1 dans différents complexes (figure 23).

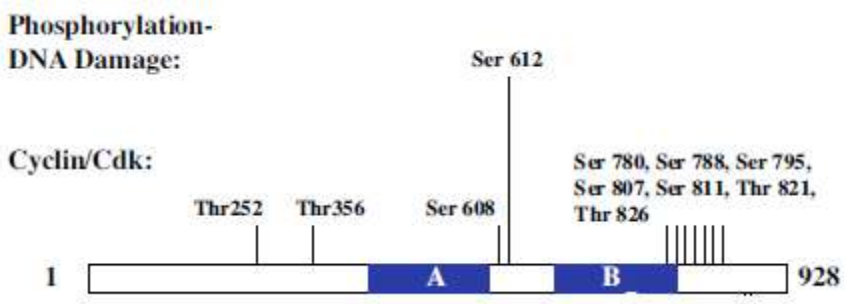


Figure 24 : Localisation des sites de phosphorylation de pRb étudiés par mutagénèse (d'après (Dick, 2007).

La protéine pRb possède au moins 21 sites de phosphorylation possibles dont 16 d'entre eux peuvent potentiellement être phosphorylés par les cylines/Cdk (séquence consensus). Ces sites de phosphorylation sont situés au niveau de trois régions, dans le domaine N-terminal proche du début du domaine A, dans la région séparant les domaines A et B (le « flexible spacer ») et dans le domaine C-terminal juste après le domaine B. Sur ces 16 sites, 11 ont été substitués par une alanine par mutagénèse dirigée pour prévenir de l'inactivation de pRb (figure 24). Ces expériences ont montré que les formes non-phosphorylables de pRb pouvaient bloquer la prolifération cellulaire dans les fibroblastes et dans les lignées cellulaires tumorales.

pRb est majoritairement phosphorylé par les complexes cyclines/Cdk. Lors de la phase G1, pRb va être phosphorylé successivement par le complexe Cycline D/cdk 4-6 puis par le complexe Cycline E/cdk 2 permettant ainsi la libération des E2Fs (figure 25) qui vont pouvoir agir en tant que facteurs de transcription et activer des gènes cibles impliqués dans la transition G1-S. En fin de phase S, le complexe Cycline A/Cdk2 phosphoryle E2F1/DP1 ce qui le détache de l'ADN et permet son ubiquitinylation et sa dégradation (Dynlacht *et al.*, 1997).

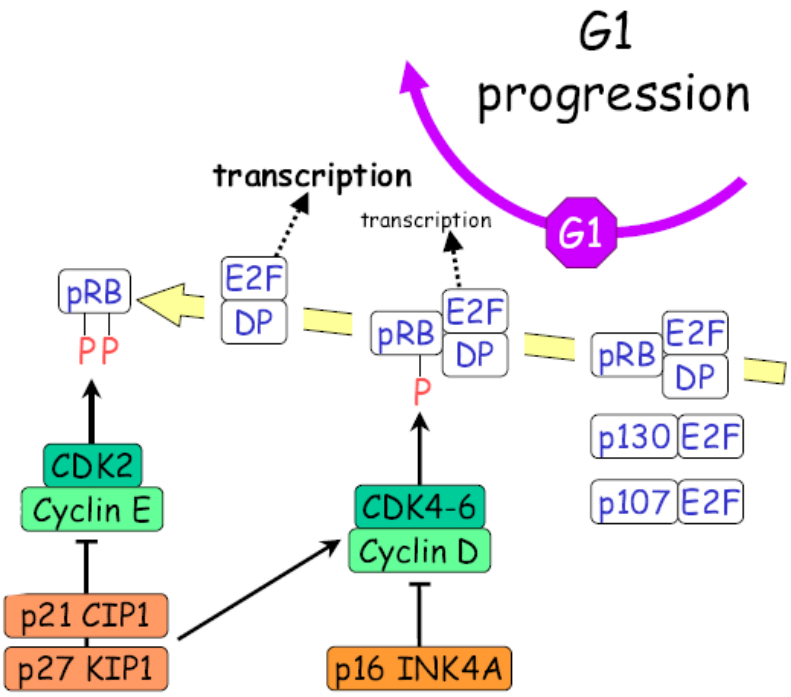


Figure 25 : La phosphorylation de pRb dans la transition G1-S. Lors de la transition G1-S pRb est phosphorylé une première fois par Cycline D/CDK4-6 puis une deuxième fois par Cycline E/CDK2. Ces phosphorylations successives permettent la libération des protéines E2Fs et la transition G1-S. Ces phosphorylations peuvent être inhibées par les CKI $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$ et $p16^{Ink4}$ (Meijer, 2003)**.**

Les protéines pRb et E2F1 pourraient aussi être phosphorylées lorsque la cellule subit des dommages à l'ADN. pRb, en réponse aux dommages à l'ADN causés par des radiations ionisantes ou par des ultraviolets, est déphosphorylé au niveau des sites de phosphorylation reconnus par les cyclines/Cdk par des phosphatases non identifiées et phosphorylé au niveau de la sérine 612 par Chk1/2. L'ensemble de ces modifications permet la formation du complexe pRb/E2F1 (Inoue *et al.*, 2007). La formation de ce complexe permettrait d'inhiber E2F1 et de provoquer un arrêt en G1-S donnant du temps à la cellule pour réparer son ADN. La voie ATM/ATR/Chk2 peut aussi, lorsque les dommages sont trop importants, stimuler la phosphorylation d'E2F1 à l'extrémité N-terminale conduisant à une stabilisation de la protéine qui induirait par la suite une apoptose dépendante d'E2F1 (Stevens *et al.*, 2003).

3-2 L'acétylation et la méthylation

La première acétylation de pRb, observée en 2001 par l'équipe de La Thangue, est activée par l'adénovirus E1A. E1A permet le recrutement à la fois de p300, une acétylase, et de pRb. L'acétylation de pRb par p300 sur les lysines 873 et 874 bloque la phosphorylation

de pRb ce qui favoriserait un arrêt du cycle (Chan *et al.*, 2001). Par la suite l'acétylation de pRb par p300 a été observée lors de dommages à l'ADN. Lors de traitement à l'étoposide, cette acétylation favoriserait la formation de complexe entre pRb et les protéines E2Fs par le site général, mais inhiberait la formation du complexe entre pRb et E2F1 par son site spécifique ce qui aurait pour conséquence un arrêt du cycle ainsi qu'un déclenchement de l'apoptose par E2F1 (Markham *et al.*, 2006). pRb peut aussi être acétylé par PCAF au niveau des mêmes lysines 873 et 874. Cette acétylation a un impact sur les fonctions de pRb dans la différenciation. Elle favorise sa localisation au noyau et la différenciation des cellules musculaires et des kératinocytes (Nguyen *et al.*, 2004; Pickard *et al.*, 2010). L'acétylation par p300 ou PCAF est réversible. Sirt1, une dé-acétylase, peut s'associer à pRb et dé-acétyler celui-ci. Le rôle de cette dé-acéylation de pRb n'est pas encore élucidé, on peut cependant penser qu'une dé-acétylation de pRb permettrait à celui-ci d'être de nouveau phosphorylé ce qui annulerait l'arrêt du cycle provoqué par l'acétylation de pRb (Wong and Weber, 2007). Tip60 peut acétyler pRb ce qui favoriserait sa dégradation par le protéasome. L'acétylation par Tip60 peut être inhibée par $p14^{ARF}$, permettant ainsi l'accumulation de pRb et un arrêt du cycle en G1 (Leduc *et al.*, 2006).

E2F1 comme pRb est aussi régulé par un système d'acétylation. E2F1 possède trois lysines au niveau N-terminal, près du domaine de liaison à l'ADN (lys 117, 120 et 125). On retrouve ces trois lysines conservées chez E2F2 et -3 mais pas dans E2F-4, -5 et -6 (Marzio *et al.*, 2000). E2F1, en particulier sous dommages à l'ADN, peut être acétylé par p300/CBP ou PCAF ce qui a pour conséquence une stabilisation de la protéine, une augmentation de sa liaison à l'ADN et de son activité transcriptionnelle, en particulier pour le promoteur TP73 codant l'homologue de p53, p73 (cf chapitre D-1-2) (Pediconi *et al.*, 2003; Martínez-Balbás *et al.*, 2000; Ianari *et al.*, 2004). L'acétylation d'E2F1 aurait alors plutôt un effet positif sur sa fonction pro-apoptotique. Cette acétylation est réversible, E2F1 étant la cible de déacétylases telles que HDAC1 ou, plus récemment mise en évidence, Sirt1 (Ianari *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006).

La lysine 873 de pRb, peut être acétylée, mais peut aussi être méthylée par Set 7/9. La méthylation de pRb favorise l'interaction de celui-ci avec HP1 une protéine de l'hétérochromatine. Cette méthylation serait nécessaire pour pRb pour provoquer un arrêt du cycle et favoriser la différentiation dépendante de pRb (Munro *et al.*, 2010). E2F1, quant à lui, peut être méthylé sur la lysine 185 par Set 9 et déméthylé par LSD ce qui aurait un rôle dans sa fonction pro-apoptotique (Kontaki and Talianidis, 2010; Xie *et al.*, 2011). Sous doxorubicine, E2F1 serait déméthylé par la protéine LSD ce qui favoriserait sa fixation sur ses gènes cibles pro-apoptotiques et participerait à l'induction de l'apoptose. Au contraire, la méthylation d'E2F1 par Set9 serait un frein à la mort cellulaire dépendante d'E2F1 (Kontaki

and Talianidis, 2010). L'étude de la méthylation de pRb et E2F1 est très récente et demande à être mieux approfondie pour en comprendre tous les mécanismes. Ainsi, comme la phosphorylation des sérines et thréonines, l'acétylation et la méthylation des lysines régulent la liaison pRb/E2F1 et leurs fonctions dans le cycle cellulaire et l'apoptose.

3-3 Régulation de pRb et E2F1 par Mdm2

Mdm2 est une ubiquitine ligase majoritairement connue pour son rôle dans la régulation de p53. Elle se lie également à d'autres protéines et notamment à pRb et E2F1, régulant leur stabilité. Mdm2 interagit avec pRb via son domaine central acide et inhibe les fonctions de celui-ci dans le cycle cellulaire, en partie en bloquant la formation du complexe pRb-E2F1-ADN. Mdm2 provoque la dégradation de pRb de deux façons : dépendante ou non de l'ubiquitination. Indépendamment de l'ubiquitination, MDM2 pourrait regrouper pRb et C8 (sous-unité du protéasome 20S) au sein d'un même complexe et favoriser ainsi sa dégradation par le protéasome (Sdek *et al.*, 2005; Uchida *et al.*, 2005). MdmX, un homologue structural de Mdm2 stabiliserait, au contraire, pRb en inhibant son ubiquitination par Mdm2 (Uchida *et al.*, 2006).

Mdm2 a un effet inverse sur E2F1 puisqu'au lieu de favoriser sa dégradation, il stabilise celui-ci. Mdm2 en se liant à E2F1 inhibe l'interaction E2F1/SCF^{SKP2}, une ubiquitine ligase, et donc inhibe son ubiquitination et sa dégradation (Zhang *et al.*, 2005). La liaison Mdm2/E2F1 stabilise E2F1, mais inhibe son activité transcriptionnelle, E2F1 ne pouvant plus se lier à l'ADN. Lorsqu'on traite des lignées cellulaires, mutées pour p53, par la Nutlin-3, un inhibiteur de MDM2, on inhibe l'interaction entre E2F1 et MDM2. Lors de dommages à l'ADN, en traitant notamment au cisplatine, E2F1 libéré induirait des protéines pro-apoptotiques comme Noxa ou p73. Cependant, dans des cellules avec un p53 sauvage comme les cellules colorectales HCT116 ou les cellules de liposarcome LS141, l'activité pro-apoptotique de la Nutlin-3 passerait uniquement via p53, E2F1 étant négativement régulé (Ambrosini *et al.*, 2007). E2F1 aurait ainsi un rôle pro-apototique très important dans des cellules ayant un p53 non fonctionnel et cette fonction pro-apoptotique serait en partie régulée par MDM2.

D – La protéine p53

1- La famille de p53

La protéine p53 a été découverte en 1979 de manière simultanée par 4 équipes de recherche. Trois de ces équipes s'intéressaient aux virus SV40 et ont caractérisé une protéine cellulaire de 55 kDa capable d'interagir avec l'antigène T (Lane and Crawford, 1979; Kress *et al.*, 1979; Linzer and Levine, 1979). Parallèlement, l'équipe de L. Old caractérisait une protéine de même poids moléculaire en cherchant à identifier de nouveaux antigènes tumoraux (DeLeo *et al.*, 1979). Le nom définitif de p53 a été donné par L. Crawford en 1984. Initialement identifié comme un oncogène, p53 fut classé comme suppresseur de tumeur en 1989 grâce aux travaux de l'équipe de B. Volgelstein qui montraient que p53 était muté dans un certain nombre de cancers (Baker *et al.*, 1989). La protéine p53 sous forme monomérique est une protéine de 393 résidus, codée par le gène TP53 situé sur le chromosome 17. p53 est actif sous sa forme tétramérique et il est impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence, la réparation de l'ADN, le métabolisme, l'autophagie, l'invasion cellulaire, l'angiogénèse ou encore le vieillissement. Nommé le gardien du génome, p53 est essentiel dans la prévention du développement de cancers. En conséquence, la mutation du gène TP53 est l'altération génétique la plus fréquente retrouvée dans les cancers, avec un cancer sur deux ayant un p53 muté. Grâce à la base de données PubMed, on peut recenser, en 2011, plus de 58000 articles scientifiques portant sur la protéine p53 ce qui témoigne à la fois de son importance et de la complexité de ses fonctions.

1-1 Structure de p53

Le facteur de transcription p53 est constitué de 6 différents domaines fonctionnels : le domaine d'activation de la transcription (TAD) qui peut être divisé en deux sous-domaines TADI et TADII, une région riche en proline (PRR), le domaine de liaison à l'ADN (DBD), la région contenant le signal de localisation au noyau, le domaine d'oligomérisation et la région C-terminale régulatrice (figure 26). La majorité des mutations de p53 se trouve dans le domaine central de liaison à l'ADN ce qui explique que la majorité des mutants de p53 ne puisse plus se fixer à l'ADN (figure 26).

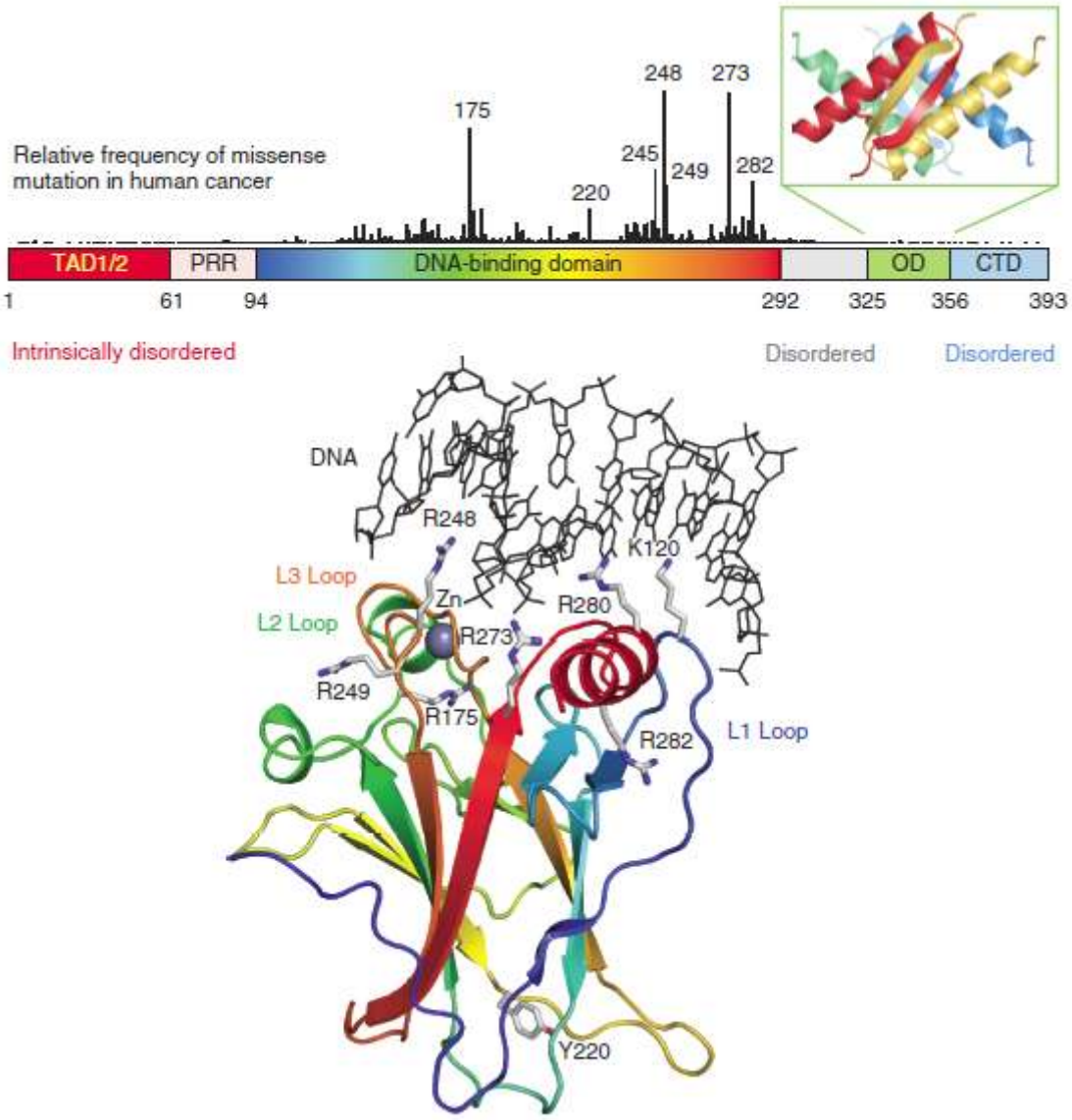


Figure 26 : Les domaines structuraux de p53 : le domaine d'activation de la transcription (TAD) qui peut être divisé en deux sous-domaines TADI et TADII, la région riche en proline (PRR), le domaine de liaison à l'ADN (DBD), la région contenant le signal de localisation au noyau, le domaine d'oligomérisation (OD) et la région C-terminale régulatrice (CTD). Les barres verticales indiquent la fréquence relative des mutations non-sens dans les cancers humains pour chaque résidu d'après la base de données « TP53 mutations database » (www-p53.iarc.fr). L'interaction entre le DBD de p53 et l'ADN est représentée schématiquement avec les principales mutations (Joerger and Fersht, 2010).

La région N-terminale est une région non structurée de p53, malgré tout, on peut observer des hélices α au niveau des domaines d'interaction avec d'autres protéines. La région N-terminale comprend le domaine d'activation de la transcription (TAD) et le domaine riche en proline. Le domaine TAD est divisé en deux sous-domaines TADI (résidus 1-40) et TADII (résidus 40-61). Ce domaine TAD est un site par lequel p53 peut se lier avec une multitude de protéines comme la machinerie transcriptionnelle, le co-activateur p300/CBP et les répresseurs MDM2/MDM4. Des mutations dans les domaines TAD (L22Q/W23S,

W53Q/F54S) provoquent une stabilisation de la protéine p53, mais aussi, une perte de son activité transcriptionnelle dû probablement à un changement de conformation (Wahl, 2006). La région riche en proline PRR (résidus 64-92) fait la liaison entre le domaine TAD et le domaine de liaison à l'ADN. Cette région de p53 contient cinq motifs « PXXP ». Ce motif présent dans la protéine p53 humaine n'est pas présent chez les autres mammifères. On retrouve cependant une prévalence de proline dans cette région, indiquant une importance de garder une certaine rigidité dans cette région, pour des raisons de fonction ou de structure (Toledo *et al.*, 2007). Le rôle du domaine PRR n'est pas complètement élucidé. Celui-ci semble participer à la liaison de p53 avec p300/CBP et MDM2 en partenariat avec le domaine TAD. De plus, le domaine PRR serait impliqué dans la liaison de p53 à Bcl-xL au niveau de la mitochondrie (Xu *et al.*, 2006).

Le domaine central DBD (DNA Binding Domain) a une organisation en feuillet β qui lui permet d'interagir avec l'ADN (résidus 94-292). Cette structure peut être séparée en deux motifs structuraux qui peuvent lier le petit sillon d'une part et le grand sillon de l'ADN d'autre part. Ce domaine permet à p53 de se fixer sur ces promoteurs cibles à des séquences spécifiques appelées « élément de réponse » (ER). Ces séquences sont sous forme de palindrome composé de deux demi-sites formés de dix nucléotides séparés par 0-13 nucléotides. Sous forme de tétramère, deux domaines DBD lient un demi-site, formant un dimère symétrique (el-Deiry *et al.*, 1992). Selon l'organisation du domaine ER, l'affinité de p53 pour le promoteur sera différente. Majoritairement, on retrouve les sites de liaison à forte affinité au niveau des gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN alors que les gènes cibles impliqués dans l'apoptose ont une plus faible affinité (Weinberg *et al.*, 2005). Le domaine central DBD de p53 est la région la plus fréquemment mutée dans les cancers (95% des mutations se trouvent dans le DBD). Ces mutations ont pour conséquence, une impossibilité pour p53 de se lier à l'ADN ainsi qu'à diverses protéines telles que Bcl-xL qui se lie à p53 par le domaine DBD comme décrit plus loin (cf D-2-2).

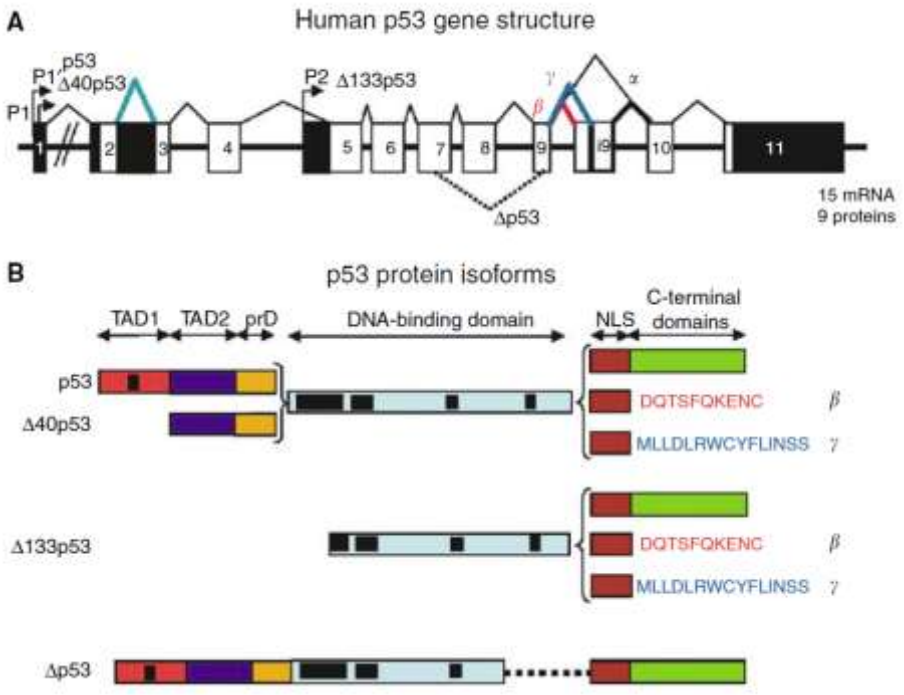


Figure 27 : p53 humain. (A) schéma de la structure de gène TP53 avec les promoteurs P1, P1' et P2 et les épissages alternatifs α, β et γ. (B) Représentation des différentes isoformes de p53 ainsi que les domaines principaux de p53 (Bourdon, 2007).

En absence de stress, p53 est présent sous forme de monomère. Lors de stress, des modifications post-traductionnelles permettent à p53 de se dimériser puis de se tétramériser, lui permettant de se fixer à l'ADN. La tétramérisation de p53 se fait via son domaine d'oligomérisation OD (résidus 325-356). Cette région est constituée d'un feuillet β et d'une hélice α. Deux monomères de p53 vont tout d'abord former un dimère où les feuillets β et les hélices α vont s'associer de façon antiparallèle pour former le domaine central hydrophobe. Deux dimères peuvent ensuite s'associer par leurs hélices α pour former un tétramère.

La région C-terminale régulatrice, CTD (résidus 356-393) est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, la méthylation et la neddylation. L'ensemble de ces modifications régule les fonctions et les niveaux de p53 dans la cellule.

La protéine p53 existe sous 9 isoformes. Les neufs isoformes de p53 sont issues de trois promoteurs P1, P1' et P2 et d'épissages alternatifs (figure 27) (Bourdon *et al.*, 2005). Les différentes isoformes de p53 sont présentes dans les tissus sains et dans les tissus cancéreux, mais les niveaux d'expression varient. Les différents promoteurs sont retrouvés chez l'homme, la drosophile et le zebrafish mais les épissages alternatifs sont spécifiques de chaque espèce. Récemment une dixième isoforme de p53 fut mise en évidence. Il existe un épissage alternatif intra-exon des exons 7 et 9 qui donne une forme Δp53 tronquée au

niveau du DBD (Rohaly *et al.*, 2005). Cette forme tronquée de p53 semble rester au cytoplasme, mais une étude plus approfondie est requise pour comprendre son rôle et établir son expression dans les différents tissus. La découverte de ces isoformes a une importance capitale dans l'étude de l'activité de p53. En effet, selon l'anticorps utilisé pour la détection de p53, une perte de celui-ci peut correspondre soit à la diminution de l'expression de p53, soit à l'expression d'une autre isoforme, non reconnue par l'anticorps. Certaines études de p53 devront alors être reprises en prenant en compte ce nouveau paramètre.

1-2 Les homologues de p53 : p73 et p63

Deux homologues de p53 ont été découverts, p73 en 1997 et p63 en 1998 (Yang *et al.*, 1998; Jost *et al.*, 1997). p73 et p63 partagent des séquences similaires ainsi que des domaines structuraux avec p53, mais ils ont plus de similarité entre eux qu'avec p53, en particulier dans le domaine central DBD. Ces deux protéines peuvent aussi former des oligomères, lier l'ADN et transactiver des gènes cibles de p53. Ils sont impliqués dans la différenciation et dans la réponse cellulaire au stress. p73 est ubiquitaire dans les tissus sains avec une prédominance de la forme p73α (figure 28), mais il est exprimé à un niveau très faible. p63 a une expression plus spécifique, on le retrouve dans le placenta, les glandes mammaires et salivaires ainsi que dans les parois épithéliales et les organes urogénitaux (Ikawa *et al.*, 1999). Comme p53, p73 et p63 possèdent différents promoteurs et peuvent subir différents épissages alternatifs. La protéine p73 possède 2 promoteurs P1 et P2 ainsi que sept épissages alternatifs en C-terminal et quatre en N-terminal (figure 28) (Bourdon, 2007). Théoriquement, il existe 29 isoformes différentes de p73 ce qui rend difficile l'étude de cette protéine. Les deux promoteurs P1 et P2 codent deux protéines p73 aux fonctions opposées : la protéine totale transcriptionnellement active TAp73 et la protéine dominant négative avec une extrémité N-terminale tronquée ΔNp73. TAp73 qui possède le domaine de transactivation, induit l'arrêt du cycle et l'apoptose. Sa transcription peut être induite par différents facteurs de transcription dont en particulier E2F1. Au contraire, ΔNp73 qui a perdu le domaine de transactivation, inhibe l'apoptose induite par TAp73 ou p53. De plus, ΔNp73 est induite par TAp73 et p53, créant ainsi une boucle de rétrocontrôle négative qui régule les fonctions de p53 et TAp73 (Melino *et al.*, 2002). Contrairement au gène TP53, le gène TP73 est muté dans de très rares cas, moins de 0.5% des tumeurs possèdent un p73 muté. Ceci peut s'expliquer par son rôle ambigu d'oncogène et de suppresseur de tumeur selon le promoteur utilisé pour transcrire p73.

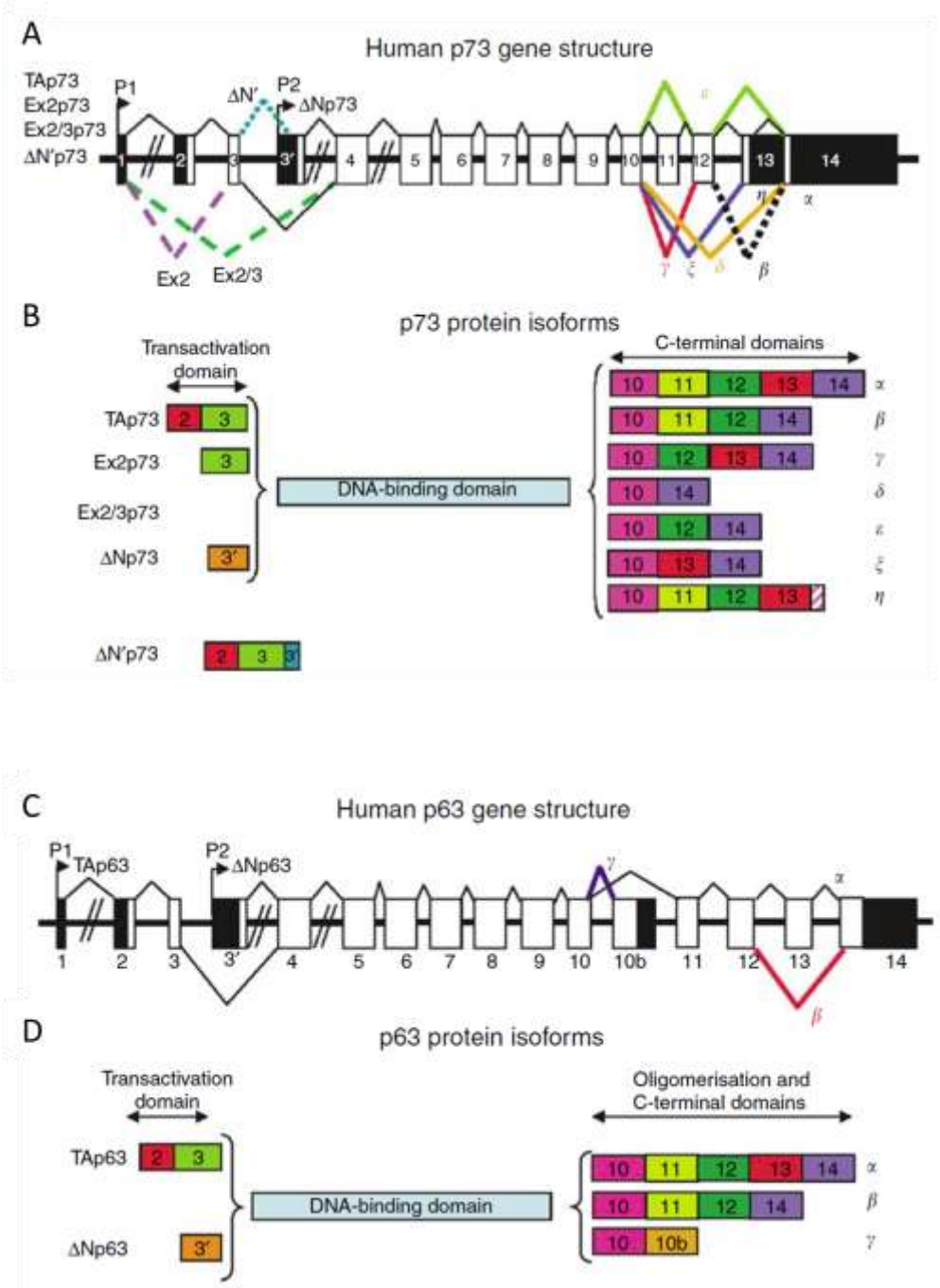


Figure 28 : p73 et p63 humain. (A) schéma de la structure du gène TP73 avec les promoteurs P1 et P2 et les épissages alternatifs en C et N terminal. (B) Représentation des différentes isoformes de p73 ainsi que ces domaines principaux. (C) schéma de la structure du gène TP63 avec les promoteurs P1 et P2 et les épissages alternatifs en C terminal. (D) Représentation des différentes isoformes de p63 ainsi que ces domaines principaux (Bourdon, 2007).

Le gène TP63 possède trois sites d'épissage alternatif au niveau C-terminal et un promoteur alternatif P2 situé au niveau de l'intron 3 (figure 28). Il existe donc six isoformes possibles de p63 divisées en deux, les isoformes générées par le promoteur P1, TAp63 qui possèdent le site de transactivation et les isoformes générées par le promoteur P2 qui ont perdu le domaine de transactivation, ΔNp63. La protéine p63 a un rôle essentiel dans le

développement. Les souris p63-null ne survivent pas plus de quelques jours après leur naissance, elles montrent des malformations craniofaciales, des membres réduits et un défaut dans le développement de la peau et d'autres tissus (Mills *et al.*, 1999).

2- Les activités biologiques de p53

2-1 p53 nucléaire

La protéine p53 contribue à de multiples processus normaux ou pathologiques, en particulier grâce à son rôle de facteur de transcription (figure 29). Les cibles transcriptionnelles de p53 sont multiples et sont impliquées dans de nombreux phénomènes biologiques. Lorsque le génome est endommagé, p53 est activé et il peut induire un arrêt transitoire de la prolifération cellulaire en G1 ou G2 pour permettre la réparation de l'ADN ou un arrêt permanent (la sénescence) ou encore l'élimination de la cellule par apoptose. Le choix du devenir de la cellule se fait selon les partenaires de p53, ses modifications post-traductionnelles et sa localisation.

La protéine p53 est souvent considérée comme le gardien du génome dû à son rôle important dans les points de contrôle du cycle cellulaire. Lorsque la cellule subit des dommages à l'ADN, p53 permet un arrêt du cycle cellulaire soit au niveau du point de contrôle G1-S soit au niveau du point de contrôle G2-M. Au niveau du point de contrôle G1-S, p53 peut activer la transcription du gène codant pour la protéine p21 qui va inhiber les complexes cycline/Cdk et ainsi bloquer la transition G1-S. Au niveau du point de contrôle G2-M, p53 peut à la fois activer la transcription de la forme 14-3-3σ, protéine régulatrice qui va séquestrer le complexe cycline B/Cdk1 dans le cytoplasme et la transcription de GADD45 qui va inhiber la formation de ce même complexe. En inhibant le complexe cycline B/Cdk1 permettant la transition G2-M, p53 induit un arrêt du cycle en G2. Ces arrêts du cycle, lors de dommages à l'ADN, permettent à la cellule d'avoir le temps de réparer ces dommages. p53 peut alors aussi intervenir et favoriser cette réparation de l'ADN que ce soit une réparation de type NER, BER, MMR, HR ou NHEJ. Malgré tout, lorsque les dommages sont trop importants et ne peuvent être réparés, la protéine p53 peut alors induire la mort par apoptose.

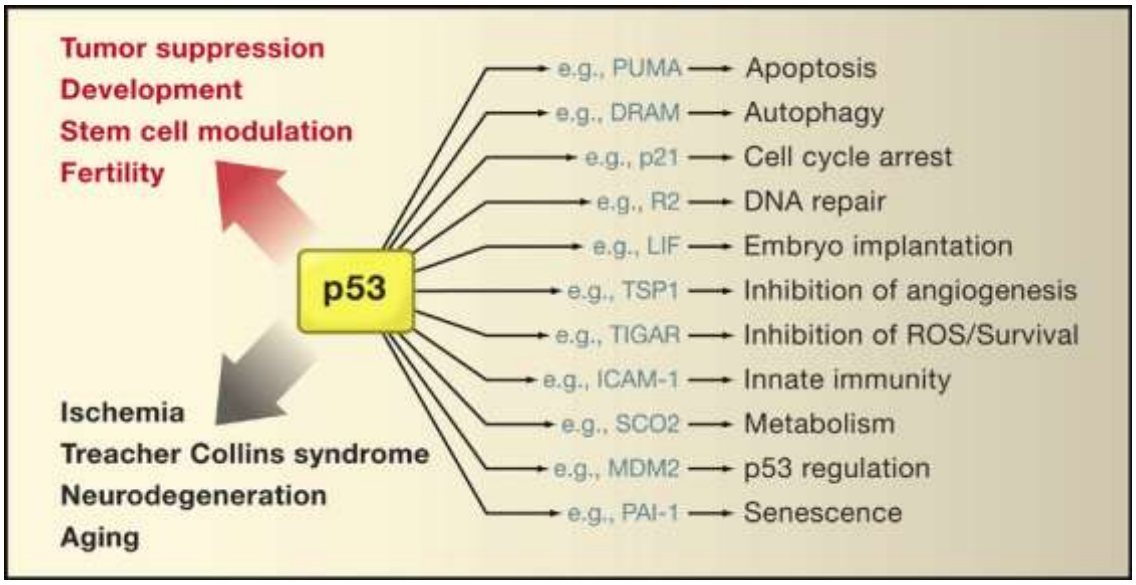


Figure 29 : p53 contribue à de nombreux processus physiologiques (rouge) et pathologiques (noir) par son activité transcriptionnelle (gris) (Vousden and Prives, 2009).

L'induction de l'apoptose est une fonction essentielle de p53 en tant que suppresseur de tumeur. La perte de la mort apoptotique induite par p53 accélère la formation de tumeur dans le cerveau chez la souris (Symonds *et al.*, 1994). Lors de l'apoptose, p53 peut induire à la fois la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Dans la voie extrinsèque, p53 a comme cibles transcriptionnelles les récepteurs de mort situés dans la membrane tels que DR5, 4 ou Fas. De plus, il peut activer le gène codant la protéine Bid qui va pouvoir lier la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Dans la voie intrinsèque, p53 cible majoritairement les protéines de la famille Bcl-2. p53 peut activer les protéines pro-apoptotiques comme Bax qui fut le premier identifié comme étant régulé par p53 en 1995 (Miyashita and Reed, 1995). Puma et Noxa font aussi partie des cibles transcriptionnelles de p53. Il a été montré que la surexpression de p53, suite à un traitement à la doxorubicine de lignées cellulaires déficientes en p53 telles que les SAOS2, provoque une induction de Puma et la mort cellulaire de ces lignées suite à un relargage du cytochrome C (Nakano and Vousden, 2001). De même, lorsqu'on traite des cellules murines primaires au rayon X, on observe une induction de Noxa et cette induction est dépendante de p53. Lorsque cette augmentation de Noxa est bloquée, le déclenchement de l'apoptose est inhibé (Oda *et al.*, 2000). Noxa comme Puma sont donc deux cibles directes de p53 qui contribuent au déclenchement de l'apoptose induite par celui-ci. En plus d'activer certains gènes, p53 a la capacité d'en réprimer d'autres ce qui est le cas pour le gène codant la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Dans les cellules hématopoïetiques, p53 a été montré présent sur le promoteur de Bcl-2 et réprimant sa transcription, favorisant ainsi l'apoptose (Wu *et al.*, 2001). Les protéines de la

famille Bcl-2 ne sont pas les uniques cibles de p53 lui permettant d'activer l'apoptose. p53 peut aussi augmenter l'expression de protéines telles qu'Apaf-1 ou la caspase 6.

L'apoptose n'est pas l'unique mécanisme suppresseur de tumeur que p53 peut déclencher. p53 est aussi impliqué dans l'induction de la sénescence et de l'autophagie. La surexpression de p53 ou de p21 suffit à induire la sénescence de nombreux modèles cellulaires alors que l'inhibition conjointe de ces deux protéines permet d'échapper à l'induction de la sénescence (Itahana *et al.*, 2007). p53, via p21 peut inhiber l'activité des complexes cycline/Cdk et provoquer un arrêt en G1, première étape dans l'induction de la sénescence. De même, de part sa fonction de facteur de transcription, p53 peut induire l'autophagie. DRAM, protéine lysosomale modulatrice de l'autophagie, est par exemple une cible directe de p53 (Crighton *et al.*, 2006). Son activité pro-autophagique dans le noyau contraste avec son activité anti-autophagique dans le cytoplasme (voir partie D-2-2). Cette dualité dans le rôle de p53 dans l'autophagie montre une fonction complexe de régulateur suivant le contexte cellulaire et non simplement un inducteur ou un inhibiteur de l'autophagie.

2-2 p53 cytoplasmique

La fonction de facteur de transcription de p53 au niveau du noyau est sa fonction principale. Malgré tout, p53 peut aussi avoir d'autres activités non transcriptionnelles dans le cytoplasme où il peut activer l'apoptose et inhiber l'autophagie. Au niveau nucléaire, p53 peut activer la transcription de gènes codant des protéines de la famille Bcl-2 comme Puma, Noxa ou Bax. Au niveau cytoplasmique, p53 peut aussi interagir directement au niveau de la mitochondrie avec les membres pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 via son domaine DBD et induire l'apoptose. Les mutants de p53 sont souvent mutés dans le domaine DBD ce qui inhibe l'activité transcriptionnelle de p53, mais ceci empêche aussi l'interaction de p53 avec les protéines de la famille Bcl-2 et donc l'induction de l'apoptose.

p53 peut interagir directement avec les protéines pro-apoptotiques à multi domaines BH, Bak et Bax. Lors de stress génotoxiques, p53 peut se complexer avec Bak et induire son oligomérisation ce qui aura pour conséquence une perméabilisation de la membrane et le relargage du cytochrome C. La formation du complexe p53/Bak coïncide avec la perte de l'interaction Bak/Mcl-1. Contrairement à p53, Mcl-1 a un effet inhibiteur sur Bak et inhibe l'apoptose. Mcl-1 et p53 ont donc des effets opposés sur l'apoptose en modulant l'activité de Bak (Leu *et al.*, 2004). Parallèlement, p53 peut aussi se lier directement à Bax et induire son oligomérisation. Dans ce cas, p53 peut dissocier le complexe Bcl-xL/Bax ou Bcl-2/Bax et libérer les fonctions pro-apoptotiques de Bax (Chipuk *et al.*, 2004).

De même, p53 peut lier les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bcl-xL, Bcl-2 ou Mcl-1. Bcl-2 possède un domaine appelé « Flexible loop domain » (FLD) qui contient deux régions régulatrices, une positive et l'autre négative. La région régulatrice positive permet la liaison de Bcl-2 avec p53 au niveau de son domaine DBD et la formation de ce complexe inhibe l'activité anti-apoptotique de Bcl-2. En effet, l'interaction Bcl-2/Bax diminue au profit de l'interaction Bcl-2/p53, ce qui libère Bax et permet l'induction de l'apoptose (Deng *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que lorsque p53 s'associe à une protéine anti-apoptotique telle que Bcl-xL, ceci entraine un changement de conformation de celle-ci au niveau des hélices 3 et 4. Cette nouvelle conformation, plus ouverte, augmente l'affinité de Bcl-xL pour les BH3-seul. De cette manière, p53 facilite la dissociation du complexe Bcl-xL/Bax-Bak par les BH3-seul (Hagn *et al.*, 2010). Enfin, p53 peut aussi favoriser l'action des BH3-seul en favorisant leur interaction avec les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak. Par exemple, p53 peut lier Mcl-1 ce qui diminue les interactions Bim/Mcl-1 au profit des interactions Bim/Bax-Bak. Bim peut alors directement activer Bax et Bak et induire l'apoptose (Han *et al.*, 2010).

Les activités transcriptionnelles et non transcriptionnelles de p53 peuvent induire l'apoptose indépendamment l'une de l'autre, mais elles peuvent aussi être complémentaires pour induire l'apoptose. Puma, cible transcriptionnelle de p53 illustre parfaitement cette complémentarité. Sous stress oncogénique, p53 peut activer la transcription de Puma qui va pouvoir inhiber l'interaction Bcl-xL/p53 au profit de l'interaction p53/Bax et ainsi induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale et l'induction de l'apoptose (figure 30).

En plus d'activer l'apoptose, p53 cytoplasmique peut aussi inhiber l'autophagie. L'inhibition de p53, même dans les cellules énucléées, conduit à l'induction de l'autophagie de manière indépendante à ses fonctions nucléaires. p53 étant un frein à l'autophagie, de nombreux inducteurs de l'autophagie stimulent la dégradation de p53 par le protéasome via MDM2 (Tasdemir *et al.*, 2008). Le domaine DBD de p53 n'est pas requis pour inhiber l'autophagie contrairement à l'activité pro-apoptotique. Les deux fonctions cytoplasmiques de p53 sont donc bien séparées (Morselli *et al.*, 2008).

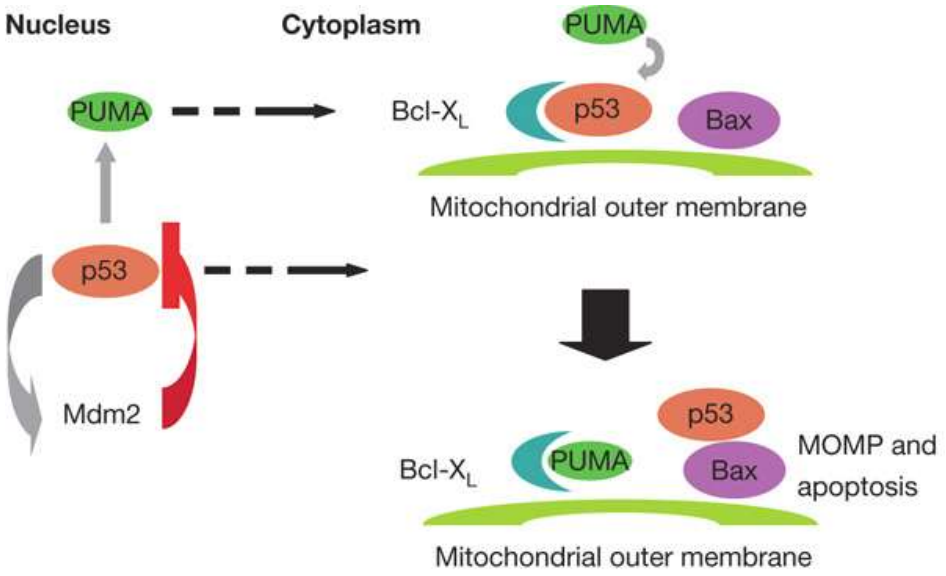


Figure 30 : Complémentarité des fonctions nucléaires et cytoplasmiques de p53. p53 induit l'expression de Mdm2 qui va ensuite inhiber p53. Des stress cellulaires interrompent cette inhibition, permettant ainsi à p53 de s'accumuler à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. p53 active la transcription de Puma qui pourra ensuite déplacer l'interaction p53/Bcl-xL dans le cytoplasme au profit de l'interaction p53/Bax et déclencher l'apoptose (Green and Kroemer, 2009).

3- La régulation de p53

La protéine p53 est un facteur de transcription qui peut être modifié de façon post-traductionnelle sur environ trente sites différents par phosphorylation, acétylation, méthylation, ubiquitination, neddylation ou sumoylation en réponse à différents stress cellulaires (figure 31). Plusieurs approches génomiques ont montré que p53 pouvait induire ou inhiber l'expression de 1500 gènes. Cette capacité de p53 à moduler autant de gènes différents est permise par une combinaison, finement régulée, de l'ensemble de ces modifications post-traductionnelles. Celles-ci permettent de moduler la stabilité de p53, son activité de facteur de transcription, son affinité pour ses différents promoteurs cibles et ainsi permettent la régulation du devenir de la cellule en contrôlant l'induction de l'arrêt du cycle, de l'apoptose ou encore de la sénescence.

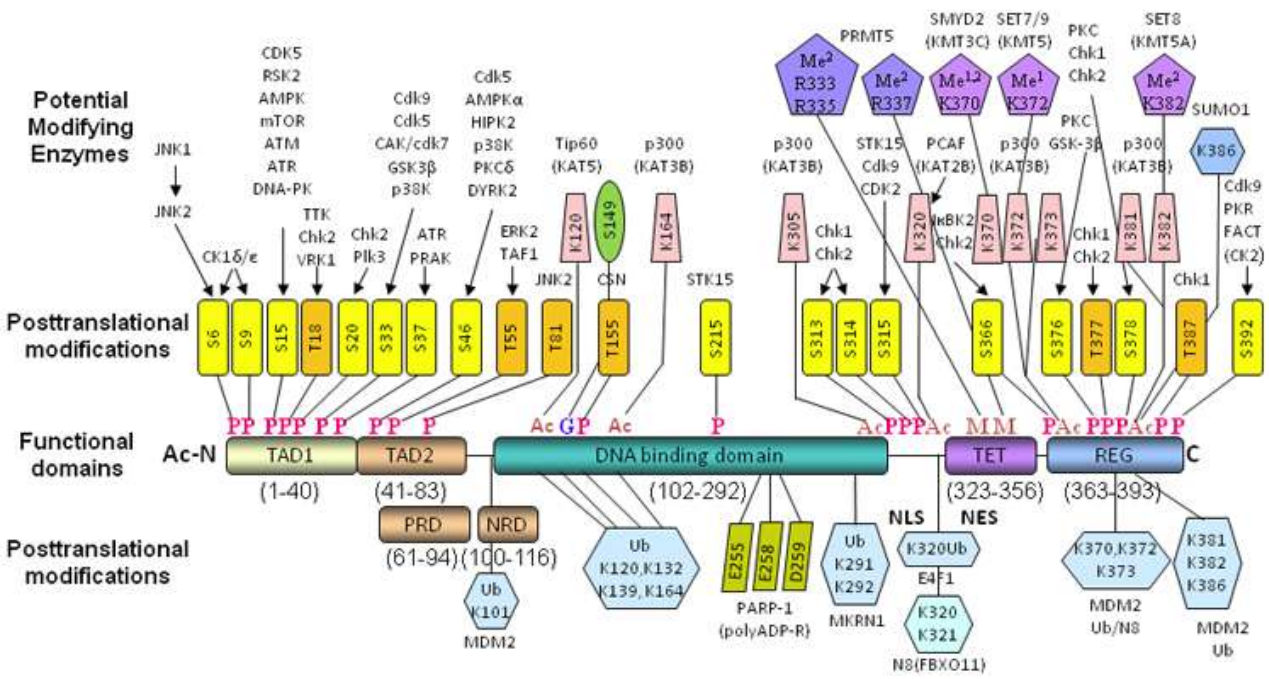


Figure 31 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de p53 ainsi que ses modifications post-traductionnels. Les domaines fonctionnels de p53, TAD (domaine de transactivation), PRD (domaine riche en proline), NRD (domaine de régulation N-terminal), DBD (domaine de liaison à l'ADN), TET (domaine de tétramérisation) et REG (domaine de régulation en C-terminal) ainsi que les sites de modifications post-traductionnelles (P, phosphorylation; Ac, acetylation; G, glycosylation; Me, mono(1) or di-(2) méthylation, N8, neddylation; Ub, ubiquitination; polyADP-R, poly-ADP-ribosylation) sont indiqués avec les enzymes qui peuvent accomplir ces modifications in vitro. Les séquences signales d'exportation nucléaire (NES) et de localisation nucléaire (NLS) sont aussi indiquées (d'après le site de Carl Anderson http://www.bnl.gov/biology/cellbio/human_p53.asp).

3-1 La phosphorylation

La phosphorylation est une des modifications post-traductionnelles les plus courantes de p53. Il a été identifié 15 sérines et 6 thréonines qui pouvaient être phosphorylées sur la protéine p53. La phosphorylation de p53 peut avoir une conséquence sur sa stabilité. En effet, dans certains cas de phosphorylation, p53 ne pourra plus interagir avec MDM2, une ubiquitine ligase favorisant la dégradation de p53 par le protéasome. C'est le cas de la phosphorylation de la ser15 lors de dommages à l'ADN. Cette sérine peut être phosphorylée par différentes kinases telles que DNAPK ou ATM/ATR, et cette phosphorylation va induire un changement de conformation de p53 qui va inhiber son interaction avec MDM2 (Shieh *et al.*, 1997). p53, ainsi stabilisé va pouvoir ensuite induire un arrêt du cycle cellulaire. De même, lors d'irradiation γ, Chk2 peut phosphoryler p53 au niveau de la ser20 ce qui aura pour conséquence de stabiliser p53 en évitant son ubiquitination par MDM2 et d'activer p53 pour induire l'arrêt du cycle cellulaire voir l'apoptose (Hirao *et al.*, 2000). La phosphorylation de p53 peut aussi avoir une conséquence sur sa localisation. Une induction de la

phosphorylation de p53 sur la ser15 lors d'irradiation UV va permettre la séquestration de p53 au noyau. En effet, la ser15 se situe dans une séquence d'exportation nucléaire (NES) au niveau N-terminal. Cette localisation de p53 au noyau favoriserait son activité transcriptionnelle (Zhang and Xiong, 2001). Enfin, la phosphorylation de p53 pourrait avoir une conséquence sur son affinité pour ses promoteurs cibles. Lors de sévères dommages à l'ADN, l'apoptose est favorisée par rapport à l'arrêt du cycle et la réparation de l'ADN. Dans ce cas, p53 peut être phosphorylé par la kinase HIPK2 au niveau de la ser46 ce qui a pour conséquence d'augmenter l'affinité de p53 pour les gènes cibles impliqués dans l'apoptose au détriment des gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle. En dehors des cas de sévères dommages à l'ADN, p53 régule HIPK2 par un rétrocontrôle négatif en induisant l'expression de MDM2 qui est responsable de la dégradation de HIPK2 (Rinaldo *et al.*, 2007).

3-2 L'acétylation

L'acétylation est la deuxième modification post-traductionnelle importante de p53 qui permet de moduler son activité transcriptionnelle ou non. p53 fut la première protéine n'appartenant pas à la famille des histones, identifiée comme étant régulée par acétylation et déacétylation. Les niveaux d'acétylation de p53 ont été montrés impliqués dans la réponse aux stress cellulaires et corrélés avec l'activation et la stabilisation de p53 (Tang *et al.*, 2008). La combinaison des différentes phosphorylations et acétylations de p53 permet une régulation fine et spécifique des différents groupes de gènes cibles de p53. En effet, il a été montré dans des cellules de cancer du poumon que l'acétylation de p53 provoquait un changement de conformation de celui-ci au niveau de l'extrémité N-terminale et du domaine DBD. Ceci jouerait sur les interactions protéine-protéine de p53, sur ses modifications post-traductionnelles, sur son affinité avec ses différents promoteurs cibles et donc sur son activité transcriptionnelle. Lorsque l'acétylase PCAF acétyle p53 au niveau de la lysine K320, p53 ne peut plus être phosphorylé sur les ser15 et ser46. p53 se fixerait alors sur ses promoteurs cibles à haute affinité comme p21 et induirait un arrêt du cycle. En revanche, lorsque p53 est acétylé par p300 au niveau de la lysine K373, il peut être phosphorylé sur les ser15 et ser46. p53 se fixerait alors sur ses promoteurs cibles à faible affinité comme Bax et induirait l'apoptose (figure 32) (Knights *et al.*, 2006). Au-delà de son association avec la phosphorylation, l'acétylation seule peut avoir un impact sur la décision entre l'arrêt du cycle et l'apoptose médiée par p53. La lysine K120 de p53, souvent mutée dans les cancers, peut être acétylée par l'acétylase Tip60 lors de l'apoptose induite sous différents stress comme l'étoposide. Lorsque la lysine K120 est acétylée, ceci induit l'apoptose, mais n'a aucun effet sur l'arrêt du cycle. D'ailleurs lorsque la lysine K120 est mutée, l'apoptose est inhibée ainsi que la transcription de Puma, cible pro-apoptotique de p53, ce qui n'est pas le cas pour les

gènes cibles p21 ou Mdm2 (Tang *et al.*, 2006). Enfin, les différentes acétylations de p53 peuvent aussi avoir un impact sur le même promoteur. Par exemple, dans des cellules du cancer de la prostate, le traitement par un inhibiteur des déacétylases (HDACi) CG1521, favorise l'acétylation de p53 sur la lysine K373 ce qui induit la transcription de p21 par le recrutement de différents co-activateurs. En revanche, le traitement par le HDACi Trichostatine A qui favorise l'acétylation de p53 sur la lysine K382, inactive la transcription de p21 (Roy and Tenniswood, 2007).

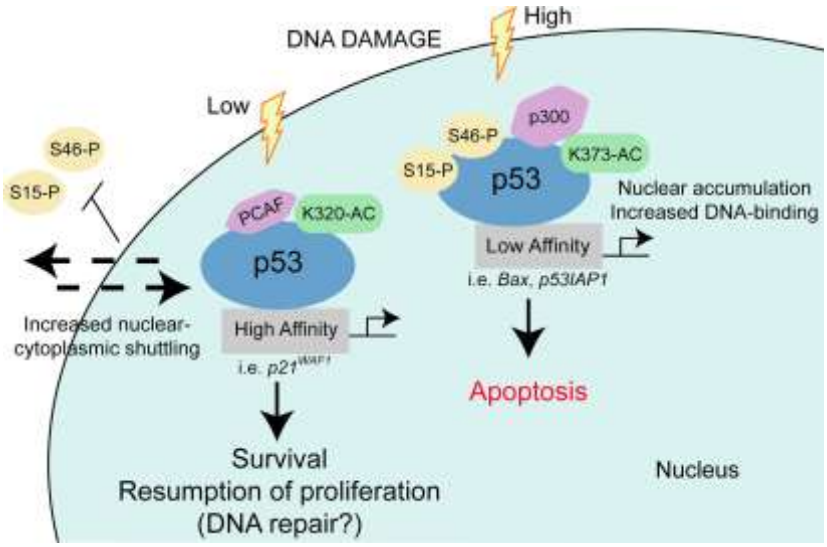


Figure 32 : les combinaisons des modifications post-traductionnelles de p53 et ses interactions protéine-protéine contrôlent le devenir de la cellule. Lors de faibles dommages à l'ADN p53 est acétylé par PCAF au niveau de la lysine K320 ce qui inhibe sa phosphorylation et permet l'activation de gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire. Lors de forts dommages à l'ADN, p300 acétyle p53 au niveau de la lysine K373 ce qui permet la phosphorylation de p53 et ainsi provoque l'activation de gènes impliqués dans l'apoptose par p53 (Knights *et al.*, 2006)**.**

L'acétylation régule la fonction transcriptionnelle de p53, mais aussi ses fonctions indépendantes de la transcription. L'utilisation d'HDACi comme le Saha ou le LAQ824 augmente l'acétylation de p53 au niveau des lysines K120, K373 et K382 et induit l'apoptose même lorsque p53 est muté et n'a plus sa capacité à activer la transcription. Par contre, la perte totale de p53 inhibe l'apoptose induite par les HDACi. p53 participe donc à l'apoptose induite par les HDACi de façon indépendante à son activité transcriptionnelle. La poursuite de cette étude a montré que lorsque p53 n'est pas acétylé il permet la formation d'un complexe p53-Ku70-Bax ce qui inhibe l'action pro-apoptotique de Bax et l'apoptose. Au contraire lorsqu'on traite au HDACi, p53 est acétylé ce qui libère Bax de p53 et Ku70 et permet son activation et l'induction de l'apoptose (Yamaguchi *et al.*, 2009). La même année, cette étude sur l'impact de l'acétylation de p53 sur ses activités non transcriptionnelles a été renforcée par une seconde étude sur l'acétylation de p53 par Tip60 sur la lysine K120. Cette étude a montré que la forme p53, actéylée sur la lysine K120, est enrichie à la mitochondrie, mais que cette acétylation n'a pas d'effet sur la localisation ou la stabilisation de p53 ni sur son interaction avec Bcl-xL ou Bax. En revanche, la forme p53 acétylée sur la lysine K120 serait essentielle pour permettre à p53 de libérer Bak de Mcl-1 et ainsi induire l'apoptose (Sykes *et al.*, 2009).

3-3 L'ubiquitination

Alors que la phosphorylation et l'acétylation de p53 régulent préférentiellement l'activité de p53, l'ubiquitination de p53 régule sa stabilité (Hock and Vousden, 2010). MDM2 est la plus importante ubiquitine ligase capable d'ubiquitiner p53, mais ce n'est pas l'unique. D'autres ubiquitines ligases peuvent, de façon plus exceptionnelle, ubiquitiner p53 comme c'est le cas pour p300 ou E4F1 (Grossman *et al.*, 2003; Le Cam *et al.*, 2006). Les cellules non stressées maintiennent un niveau peu élevé de p53 dû à un rapide turnover, p53 étant dégradé par le protéasome après avoir été ubiquitinylé. Lorsque p53 est polyubiquitinylé par MDM2 (ajout d'une chaîne composée d'au moins quatre ubiquitines), il est dirigé vers le protéasome pour sa dégradation. p53 est principalement polyubiquitinylé sur six lysines situées en C-terminal (K370, K372, K373, K381, K382 et K386). p53 peut aussi être monoubiquitinylé, mais cette modification aura l'effet contraire à la polyubiquitination. Les protéines monoubiquitinylées sont plus stables du fait qu'il fasse au moins quatre ubiquitines pour que la protéine soit reconnue par le protéasome. C'est le cas de l'ubiquitine ligase E4F1 qui monoubiquitine p53 au niveau de la lysine K320 ce qui le stabilise et permet son recrutement sur la chromatine (Le Cam *et al.*, 2006). MDM2 pourrait quant à lui mono ou polyubiquitinylé p53, ceci dépendrait de la concentration des deux protéines. Un faible niveau de MDM2 engendrerait la monoubiquitination de p53, alors qu'un fort niveau de

MDM2 engendrerait la polyubiquitination de p53 et sa dégradation (Li *et al.*, 2003). Lorsque p53 est monoubiquitinylé, celui-ci pourrait malgré tout être sujet à la dégradation via p300 qui polyubiquitinerait p53 monoubiquitinylé (Grossman *et al.*, 2003).

MDM2 est une protéine très importante dans la stabilisation de p53 et la régulation de son niveau dans la cellule. Lorsque p53 est stabilisé et actif dans la cellule, pour revenir à un niveau faible, basal de p53, il existe une boucle de rétrocontrôle négatif impliquant la protéine MDM2. En effet, p53 peut induire l'expression de MDM2 et MDM2 peut induire la dégradation de p53 (Harris and Levine, 2005). Le gène mdm2 est un gène cible de p53. Sa transcription va permettre à la protéine MDM2 de favoriser la dégradation de p53 et de revenir à un niveau basal. Cette boucle de rétrocontrôle permet d'avoir des niveaux élevés de p53 pendant des temps très courts, lors de stress, et de revenir rapidement à des niveaux basaux faibles. En effet, un niveau de p53 élevé, non régulé par MDM2 est toxique pour la cellule. Les souris mdm2$^{-/-}$ meurent *in utero* et la délétion simultanée de p53 permet de restaurer la viabilité des souris (Jones *et al.*, 1995; Montes de Oca Luna *et al.*, 1995).

4- Les mutants de p53

4-1 Les mutants de p53

Au vu de l'importance de p53 dans la résistance des cellules à la tumorigénèse, on comprend pourquoi celui-ci est muté dans plus de la moitié des cancers compromettant ainsi sa fonction (Hollstein *et al.*, 1991). La majorité des mutations de p53 sont des mutations monoalleliques faux-sens de type somatique (figure 33). La majorité de ces mutations faux-sens est située dans le domaine DBD et induit une perte de l'activité transcriptionnelle de p53. De plus, presque un tiers de ces mutations faux-sens sont regroupées sur six résidus du DBD (figure 33) (Petitjean *et al.*, 2007). Les mutants de p53 ainsi formés, sont souvent accumulés à un très fort niveau dans les tumeurs, au contraire du p53 sauvage qui est habituellement maintenu à un faible niveau dans les tissus sains, dû à sa demi-vie courte. L'ensemble de ces mutants est classé en deux catégories de mutants selon leur effet sur la stabilité de p53. Les mutants de p53 peuvent être des mutants de contact ou des mutants de conformation (Bullock and Fersht, 2001). Le premier groupe inclut des mutations dans les résidus directement impliqués dans la liaison à l'ADN comme les mutations R248Q et R273H. Le second groupe inclut les mutations qui provoquent un changement global ou local de conformation telles que les mutations R175H ou R282W.

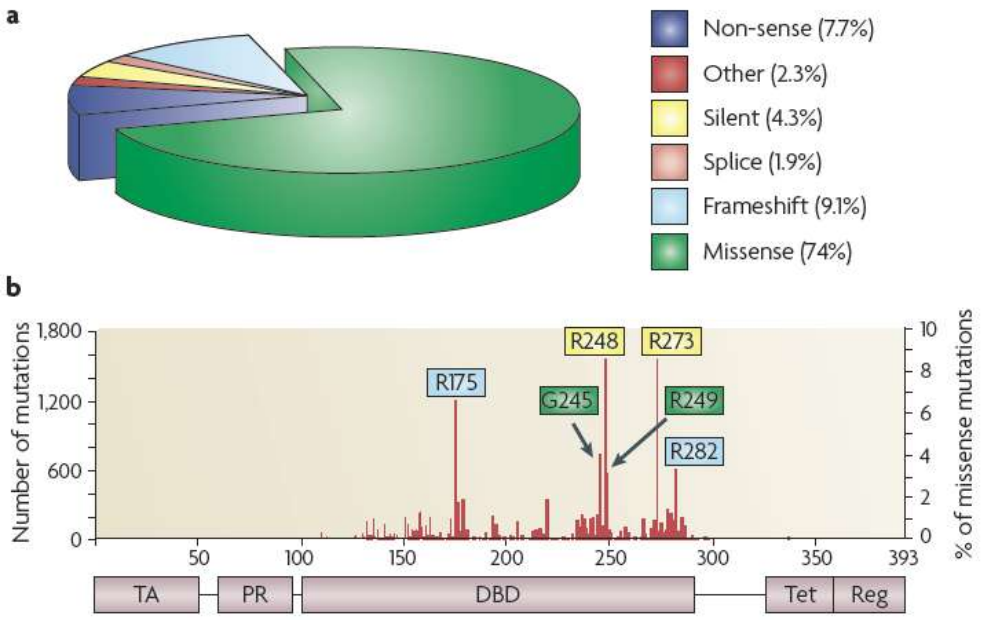


Figure 33 : Répartition des mutations somatiques de TP53 en accord avec la base de données IARC TP53 (Brosh and Rotter, 2009)**.**

Les mutants de p53 peuvent s'associer au p53 sauvage (mutation présente sur un seul allèle) et former des hétéro-tétramères non fonctionnels. Les mutants de p53 deviennent alors des dominant-négatifs. Il a été montré par la suite que les mutants de p53 peuvent aussi s'associer et inactiver les protéines de la famille p53, p73 et p63. Cette fonction des mutants de p53 est un mécanisme majeur dans leur participation à la tumorigénèse, p63 et p73 pouvant en partie compenser la délétion de p53 (Gaiddon *et al.*, 2001). Une récente étude a montré que les mutants de contact et les mutants de conformation ne développaient pas le même mécanisme pour réguler négativement p53 sauvage, p63 et p73. Alors que les mutants de contact peuvent effectivement former des hétéro-tétramères avec ces trois protéines et ainsi agir comme des dominants négatifs, les mutants de conformation vont agir sur ces protéines de manière beaucoup plus complexe et surprenante en formant des agrégats très proches du modèle prion (Xu *et al.*, 2011). En effet le changement de conformation de ces mutants expose un brin β, enfoui chez p53 sauvage, et qui permet une β agrégation de p53. Ces mutants de p53 peuvent aussi coagréger avec p63 ou p73. D'ailleurs, une seconde mutation dans le possible sous domaine d'agrégation inhibe la co-agrégation de p63 ou p73 avec p53 mutant et restaure ainsi les fonctions de ces deux protéines. Cette agrégation nécessite une étape initiale appelée nucléation, où plusieurs séquences d'agrégation doivent être simultanément accessibles pour permettre une auto-association de celles-ci. Les mutants de conformation de p53 présentent à leur surface ce segment d'agrégation présent dans le domaine DBD et, lors de leur

tétramérisation, peuvent initier l'agrégation par nucléation (figure 34). Cette récente étude ouvre de nouvelles perspectives sur les propriétés et les mécanismes d'action des mutants de p53 et permettrait de considérer le cancer comme une maladie associée à l'agrégation de protéine comme la maladie d'Alzheimer. Ceci ouvre alors de nouvelles voies dans le développement de molécules thérapeutiques ciblant p53.

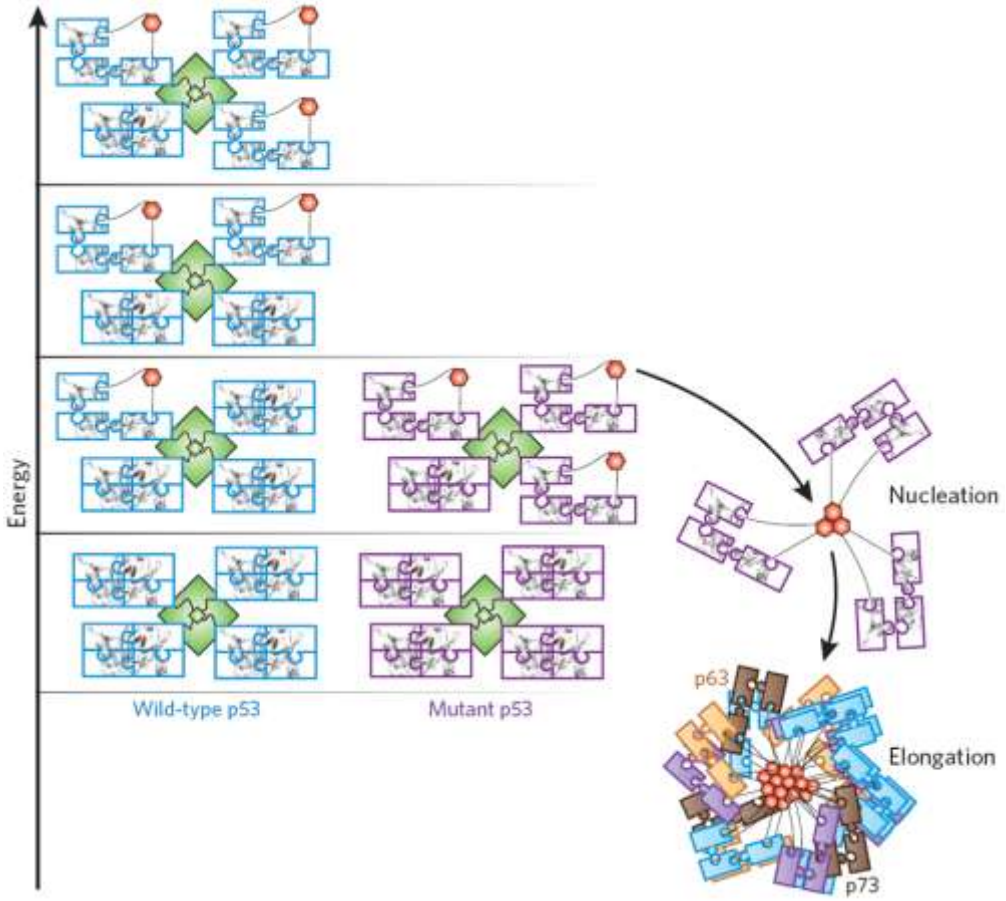


Figure 34 : Formation d'agrégats par les protéines p53 mutées. Les mutants de conformation de p53 présentent à leur surface un segment d'agrégation présent dans le domaine DBD (point rouge). Ces séquences d'agrégation sont simultanément accessibles ce qui permet une auto-association de celles-ci et la nucléation. La nucléation est une étape initiale essentielle à l'agrégation. Les protéines p63, p73 et p53 sauvage peuvent ensuite s'associer à ces agrégats (Magzoub and Miranker, 2011).

De plus en plus d'études indiquent que les mutants de p53 peuvent aussi acquérir de nouvelles propriétés oncogéniques qui sont indépendantes du p53 sauvage ou des protéines p63 et p73. La première preuve de cette hypothèse et que lorsqu'on transfecte des mutants de p53 dans des cellules p53 null, on observe une augmentation de leur capacité à former des tumeurs chez la souris (Wolf *et al.*, 1984; Shaulsky *et al.*, 1991; Dittmer *et al.*, 1993). En effet, même si les p53 mutants ne peuvent plus lier l'ADN au niveau des sites consensus de p53 sauvage, il a été montré que ces mutants pouvaient malgré tout se fixer sur l'ADN en liant préférentiellement des motifs structuraux de l'ADN plutôt que des séquences consensus (Göhler *et al.*, 2005). Cette nouvelle propriété permet aux p53 mutants de se lier à une variété de gènes et de les réguler de manière totalement indépendante du p53 sauvage. En parallèle, p53 mutant peut interagir avec d'autres facteurs de transcription et augmenter ou atténuer leur activité. C'est le cas par exemple de SP1 et ETS1, deux facteurs de transcription qui peuvent interagir avec p53 sauvage ou p53 mutant. L'interaction avec un p53 mutant aurait un effet opposé à la liaison avec un p53 sauvage, suggérant le recrutement dans le complexe, par p53 sauvage ou mutant, de cofacteurs additionnels distincts (Kim and Deppert, 2004). De récentes études ont démontré que ce gain de fonction des protéines p53 mutées pouvait participer à l'acquisition de propriété invasive de la part des cellules cancéreuses. En effet, dans des cellules du cancer du colon, les protéines p53 mutées peuvent réguler négativement l'E-cadhérine, protéine qui participe à l'adhésion cellulaire. Cette répression du gène de l'E-cadhérine par p53 mutant serait médiée par deux facteurs de transcription Slug et Zeb-1 ayant l'E-cadhérine pour gène cible. La mise sous silence de p53 mutant endogène dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 (cancer du sein) ou dans les SW620 (cancer du colon) n'exprimant plus l'E-cadhérine, restaure son expression. Cette étude montre l'importance de p53 dans la progression du phénotype non invasif au phénotype invasif des cellules cancéreuses (Roger *et al.*, 2010). Les protéines p53 mutées semblent donc avoir un rôle complexe dans la tumorigénèse en favorisant certaines activités biologiques comme le cycle cellulaire et en inhibant d'autres comme l'apoptose ou l'adhésion cellulaire, participant ainsi activement à l'agressivité des tumeurs. Ainsi, les mutants de p53 démontrent des caractéristiques fonctionnelles très différentes du p53 sauvage. Une partie des fonctions du p53 sauvage est perdue (LOF, Loss Of Function), alors que de nouvelles fonctions sont acquises (GOF, Gain Of Function). Les protéines p53 mutées peuvent alors presque être considérées comme de nouvelles protéines.

4-2 Les molécules pharmacologiques ciblant p53

p53 est une protéine essentielle dans la cancérogénèse qui joue un rôle majeur dans de nombreux processus permettant la prévention d'une transition d'une cellule saine à une

cellule cancéreuse. Elle est mutée dans de nombreux cancers et semble une cible stratégique dans le développement de nouvelles molécules anticancéreuses. En revanche, cibler p53 reste difficile, car il est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation et aussi parce que lorsque p53 est muté, on observe non seulement une inactivation de p53 sauvage, mais aussi une activation de p53 muté avec de nouvelles propriétés oncogéniques. Ceci complexifie donc la donne en ce qui concerne le développement de nouveaux médicaments ciblant p53. Diverses approches ont été élaborées pour cibler p53 lors de traitements anticancéreux dont trois principales. La première approche consiste à activer p53 sauvage avec des molécules comme RITA ou la Nutlin-3. La Nutlin-3 est une molécule qui inhibe MDM2 et qui, par conséquent, va stabiliser p53 alors que RITA est une molécule qui cible directement p53 au niveau de son domaine N-terminal. Les deux autres approches consistent à réactiver les p53 mutants avec la molécule PRIMA-1 qui permet une reconformation de ces protéines, ou à tuer sélectivement les cellules possédant un p53 muté (figure 35) (Wang and Sun, 2010). De nombreuses molécules ont été ainsi développées pouvant s'associer à des traitements anticancéreux plus classiques et augmenter ainsi l'efficacité du traitement. Certaines de ces molécules sont déjà en essais cliniques comme la Nutlin-3, en revanche aucune n'est encore utilisée en thérapie.

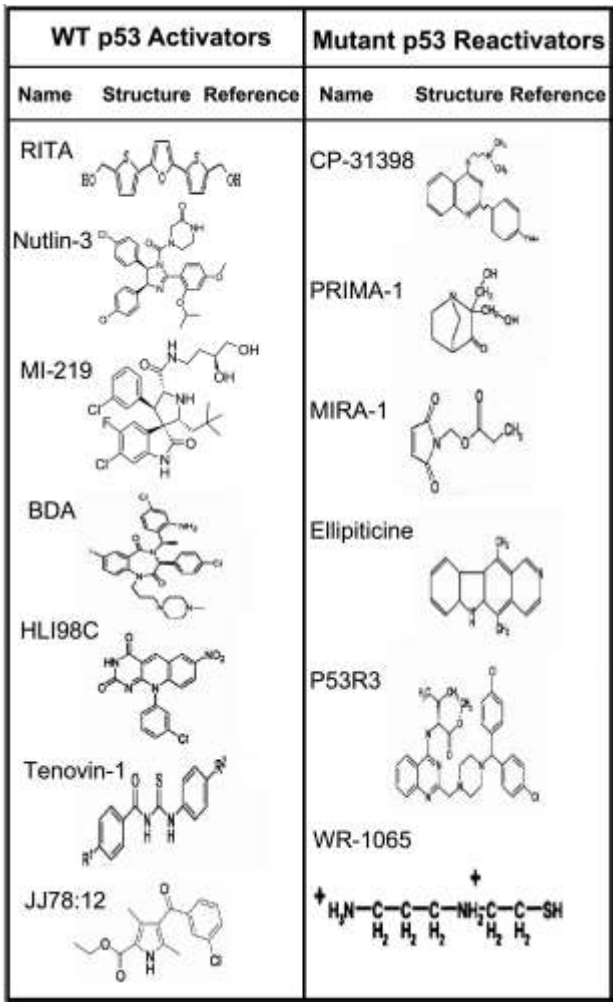


Figure 35 : Structure des petites molécules développées pour activer ou réactiver p53 (Wang and Sun, 2010)**.**

E – Les objectifs de la thèse

L'ABT-737 est un BH3 mimétique qui se fixe sur les protéines Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w et rompt les interactions entre les protéines anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Des travaux précédents, effectués par Tristan Gallenne au laboratoire, ont démontré que l'ABT-737, dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$, induit l'apoptose en libérant Puma et Bax de Bcl-xL. La libération de Puma permet à celui-ci d'interagir avec des protéines Bax monomériques et inactives et d'induire leur activation (Gallenne *et al.*, 2009). Cette rupture des interactions provoquée par l'ABT-737 intervient très rapidement après administration du traitement. L'ABT-737 peut rompre les interactions entre protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 après quelques heures de traitement. De manière surprenante, alors que l'ABT-737 a une action aussi rapide, certaines lignées cellulaires sont sensibles à l'ABT-737 utilisé en agent simple, mais sur des temps très longs, de l'ordre de 24 à 48h. Ces observations laissent à penser qu'au-delà de son action directe de rupture d'interaction, l'ABT-737 pourrait avoir une action plus complexe qui s'inscrirait dans le long terme. En 2011, l'équipe d'A.S. Kraft a montré que le traitement des cellules de carcinome rénal PV-10 induisait la transcription de 430 gènes, dont le gène PMAIP1 codant la protéine Noxa (Song *et al.*, 2011). Dans cette étude, l'expression du gène PMAIP1 est multipliée par quatre sous ABT-737. L'induction de Noxa sous ABT-737 est une conséquence pouvant avoir un impact majeur sur l'efficacité du BH3 mimétique. En effet, l'un des principaux freins à l'induction de la mort par l'ABT-737 est la présence de Mcl-1, non ciblé par cette molécule. L'induction de Noxa permettrait d'inhiber Mcl-1 et donc de contribuer à l'efficacité de l'ABT-737.

À partir de ces données, deux protéines BH3-seul semblent importantes dans la mort induite par l'ABT-737 : Puma et Noxa. Notre intérêt s'est donc porté sur l'implication de ces deux protéines dans la mort cellulaire induite par l'ABT-737 et plus particulièrement de Noxa dont la fonction dans ce contexte a été beaucoup moins étudiée. Une partie des protéines de la famille Bcl-2 est codée par des gènes cibles de p53 et d'E2F1, notamment Puma et Noxa. Les protéines pRb (régulateur d'E2F1) et p53, sont deux suppresseurs de tumeur, majoritairement mutés ou dérégulés dans les cancers. Notre étude s'est donc portée sur l'impact des voies pRb/E2F1 et p53 dans la réponse à l'ABT-737 dans les cellules cancéreuses. Afin de nous focaliser sur l'étude du rôle possible de la voie pRb/E2F1 dans la mort cellulaire dépendante de l'ABT-737, nous avons travaillé, dans un premier temps, dans des cellules cancéreuses avec un p53 muté. pRb et E2F1 peuvent, tous les deux, suivant le contexte, être pro-apoptotiques. Est-ce le cas lorsqu'on traite des cellules p53 muté par l'ABT-737 ? Et dans ce cas, leurs modifications post-traductionnelles, en particulier la phosphorylation ou le clivage de pRb, ont-elles un impact sur leur possible rôle dans

l'apoptose déclenchée par l'ABT-737 ? Enfin, p53 est une protéine qui a un impact sur les protéines de la famille Bcl-2 en tant que facteur de transcription, mais aussi directement dans le cytoplasme en interagissant avec ces protéines : qu'en est-il d'E2F1 ? Celui-ci pourrait-il agir en interagissant directement avec des protéines de la famille Bcl-2 ?

Dans un second temps, nous avons étudié l'impact des deux voies, pRb/E2F1 et p53, sur l'induction de la mort cellulaire par l'ABT-737, dans une lignée cellulaire cancéreuse p53 sauvage. Nous avons cherché à déterminer si ces deux voies ou seulement l'une des deux étaient impliquées dans l'apoptose dépendante de l'ABT-737 et si ce rôle était dépendant de leur activité transcriptionnelle. Ces données ont permis de mettre en avant l'importance de ces deux voies dans la réponse à l'ABT-737, ouvrant de nouvelles perspectives pour lever la résistance des cellules cancéreuses à l'ABT-737.

Résultats

A – L'induction de Noxa dépendante des caspases, mais aussi d'E2F1, favorise le déclenchement de la mort cellulaire par l'ABT-737

Dans les cellules cancéreuses, les protéines anti-apoptotiques sont fréquemment surexprimées ce qui favorise la survie cellulaire et l'échappement à de nombreux stimuli inducteurs de mort, déclenchés lors du développement tumoral (Fesik, 2005; Warr and Shore, 2008). L'ABT-737, en ciblant ces protéines anti-apoptotiques permet la mort de cellules cancéreuses. Toutes les cellules cancéreuses ne sont pas sensibles à l'ABT-737 utilisé en agent simple. Son efficacité dépend des interactions protéine-protéine présentes dans la cellule et de l'expression des protéines anti-apoptotiques ciblées ou non par l'ABT-737. En particulier, un fort niveau de Mcl-1 dans la cellule est souvent corrélé à une résistance à l'ABT-737 (van Delft *et al.*, 2006; Tagscherer *et al.*, 2008). Dans certains cas l'ABT-737 met plusieurs jours à induire la mort cellulaire. Ce délai important ne peut être expliqué uniquement par des ruptures d'interaction qui sont des phénomènes beaucoup plus rapides. En plus de sa fonction d'inhibiteur d'interaction protéine-protéine, l'ABT-737 a été montré comme modifiant le transcriptome des cellules traitées. En 2011, il a été montré que l'ABT-737 induisait la multiplication par deux de la transcription d'environ 430 gènes dans des cellules de carcinome rénal (Song *et al.*, 2011). Une des fonctions moins connue de l'ABT-737 pourrait être d'induire la transcription de gènes favorisant l'induction de l'apoptose.

L'objectif de ma thèse est d'identifier les voies de signalisation permettant d'induire les protéines BH3-seul, notamment Puma et Noxa, afin de sensibiliser les cellules cancéreuses à l'ABT-737. Dans un premier temps, nous avons choisi de travailler dans des lignées cellulaires p53 muté afin de nous focaliser sur la voie pRb/E2F1 qui peut induire l'apoptose indépendamment de p53 (Hershko and Ginsberg, 2004; Pediconi *et al.*, 2003). Pour cela, nous avons choisi la lignée cellulaire de glioblastome, U251, qui possède la mutation de p53 R273H et dont la viabilité cellulaire n'est pas affectée par l'ABT-737 à 2µM après 24h de traitement, mais qui présente 20% de mort cellulaire après 48h de traitement. Nous avons alors montré que Noxa, contrairement à Puma, est un acteur clé de la mort cellulaire induite par l'ABT-737 dans des lignées cellulaires possédant un p53 non fonctionnel. Lors de traitement à l'ABT-737, Noxa est induit et cette induction est dépendante à la fois d'E2F1 et de pRb. En effet, nous avons pu démontrer qu'E2F1, mais également pRb, sous ABT-737, étaient toujours complexés et qu'ils étaient tous les deux présents sur le promoteur de Noxa. La mort cellulaire déclenchée par l'ABT-737 est une mort dépendante des caspases. Ces caspases ont un impact sur le niveau d'expression de Noxa mais aussi directement sur la voie pRb/E2F1 en clivant la protéine pRb. Ces résultats suggèrent que

l'activation de la voie pRb/E2F1 pourrait permettre de sensibiliser les cellules cancéreuses résistantes à ce BH3 mimétique. L'utilisation, en clinique, de combinaison de l'ABT-263 (équivalant oral de l'ABT-737) avec des molécules activant la voie pRb/E2F1 telles que la Nutlin-3 pourrait s'avérer particulièrement efficace, en particulier dans des cellules cancéreuses où p53 est non fonctionnel.

La première partie de ces résultats sera soumise pour publication à *Oncogene* au plus tard en début d'année 2012.

1- Article : "A caspase and E2F-1 dependent feed forward mechanism of Noxa induction favors activation of cell death by the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737"

A caspase and E2F-1 dependent feed forward mechanism of Noxa induction favors activation of cell death by the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737

Joséphine Bertin-Ciftci[1], Benjamin Barre [1,2], Philippe Juin [1], Frédérique Braun [1]

1- Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers - UMR 892 – INSERM / Université de Nantes, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes 8 Quai Moncousu BP 7072144007 Nantes Cedex 1 France

2- Institut de Cancérologie de l'Ouest, CLCC Paul Papin, 2 rue Moll, 49033 ANGERS France

Abstract

ABT-737 is a functional analogue of ABT-263 (navitoclax), an anticancer agent inhibitor of some Bcl-2 homologues. Monotherapy cytotoxicity has been reported for these compounds in some cases, and this single agent activity is understood to be promoted or mitigated, respectively, by preexisting complexes between pro-apoptotic Bcl-2 family members and Bcl-2 homologues that these compounds inhibit (Bcl-2, Bcl-xL…) or not (Mcl-1…). We herein describe an additional, transcription dependent, mechanism that contributes to sensitivity to ABT-737. This one relies, upon treatment with ABT-737, on a caspase dependent induction of Noxa, a BH3-only protein known to inhibit Mcl-1. This induction is dependent upon the transcription factor E2F-1, which occupies the Noxa promoter in response to treatment. The E2F-1 regulatory protein pRb is cleaved by caspases upon ABT-737 treatment and it contributes to Noxa up-regulation and to cell death. Thus, we proposed that low-level activation of the caspase cascade allows enhancing E2F-1 transcription of Noxa by a pRb dependent mechanism, thereby providing a feed forward mechanism that fuels ABT-737 efficiency.

Keywords: ABT-737, BH3-only, pRB/E2F-1, apoptosis, caspase

Introduction

Proteins of the Bcl-2 family are major regulators of apoptosis (Adams and Cory, 2007; Lalier *et al.*, 2007; Kelly and Strasser, 2011). This family of proteins is composed of anti- and pro-apoptotic proteins. Pro-apoptotic proteins are divided into two subgroups: *multi-domain* proteins such as Bax and Bak that share 3 domains of homology, with Bcl-2 (Bcl-2 homology, BH, domains) and BH3-only proteins, such as Bid, Bim, Puma, Bad, Noxa... Anti-apoptotic proteins are frequently overexpressed in cancer cells. They exert in such cells a survival activity which allows them cells to escape from the deleterious effects of many death stimuli inherent to tumor biology or induced by therapy and they are, therefore, valid therapeutic targets for the development of anticancer agents. Anti-apoptotic proteins promote survival, in great part, by physically interacting with the BH3 domain of their pro-apoptotic counterparts via a well-characterized binding interface. Thus, numerous small molecules that bind to the BH3-binding grove of Bcl-2 homologues (the so-called "BH3 mimetics") have been developed as pro-apoptotic inhibitors of these proteins (Chonghaile and Letai, 2008). There are subtle yet significant differences in the BH3-binding interface of each Bcl-2 homologue, so that there are promiscuous but also selective interactions between these proteins and multi-domain or *BH3-only* proteins. For instance, Bim or Puma interact with all known Bcl-2 homologues whereas Bad interacts preferentially with Bcl-2 and Bcl-xL and Noxa with Mcl-1 (Du *et al.*, 2011). Thus, there is a lack of redundancy in the survival activities of Bcl-2 homologues, which explains that they exert complementary effects on cell survival. These differences also explain that currently known BH3-mimetics only inhibit subsets of anti-apoptotic proteins.

One promising BH3-mimetic is the orally bioavailable compound ABT-263 (navitoclax) which has entered clinical trials (http://www.gene.com/gene/pipeline/status/oncology/abt263/). The ABT-737 compound is an analog of ABT-263, which is widely used in preclinical studies. It potently inhibits the BH3 binding activity of Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-w but it has no effect on that of Mcl-1 and Bfl-1 (Oltersdorf *et al.*, 2005). *In vitro*, ABT-737 was shown to present monotherapy toxicity against some, but not all, leukemia, lymphoma, multiple myeloma, glioma, small cell lung and colorectal cancer cell lines (Chonghaile and Letai, 2008) and it is important to characterize what determines this single agent activity. Preceding studies have identified some of the conditions required for ABT-737 (and ABT-263) to kill cancer cells. ABT-737 protein targets (e.g. Bcl-2, Bcl-xL…) must engage complexes with "BH3 activators" (BH3-only proteins that can directly activate multi-domain proteins when free from anti-apoptotic proteins), such as Bim or Puma (Del Gaizo Moore *et al.*, 2007; Gallenne *et al.*, 2009), and/or active Bax (Gautier *et al.*, 2011). Efficient apoptosis therefore requires that death-initiating signals (relying, for instance, on Puma or Bax) are not sequestered by an excess of empty Mcl-1 or Bfl-1, that are not inhibited by ABT-737 and high levels of Mcl-1 are known to correlate with resistance to ABT-737 (van Delft *et al.*, 2006; Tagscherer *et al.*, 2008). Consistently, resistance to ABT-737 may be overcome by combined treatments that decrease Mcl-1 expression and/or induce

Noxa, a BH3-only protein that essentially functions as an inhibitor of Mcl-1 (Okumura *et al.*, 2008; Zall *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Quinn *et al.*, 2011).

Such studies establish that the efficiency of ABT-737 as a single agent is determined by protein-protein complexes that are sensitive or not to this compound. Cell free assays have put forth the notion that pro-apoptotic activity of ABT-737 relies on the nearly immediate ability of this compound to disrupt preexisting complexes (Buron *et al.*, 2010). On some occasions, the effects of ABT-737 on whole cells might nevertheless take numerous days to be manifest, suggesting that *de novo* synthesis of key actors, and thus possibly transcriptional regulatory pathways might intervene. It is important to note along this line that ABT-737 was shown to impact on transcription. In particular, ABT-737 treatment was shown to induce the expression of death receptor 5 via induction of NF-kappaB activity (Song *et al.*, 2008). It was also shown to induce a two-fold change in the transcription of nearly 430 genes when added to renal carcinoma cells (Song *et al.*, 2011). Whether or not some of these effects of ABT-737 influence its pro-apoptotic activity as a single agent has not been studied so far.

Examples of transcriptional pathways that can modulate levels of the BCL-2 protein family and shift the balance towards a pro-apoptotic phenotype to enhance sensitivity to ABT-737 are the one that involves p53 (of which Puma and Noxa are direct transcriptional targets, (Polager and Ginsberg, 2009)) and E2F-1 (Stevens and La Thangue, 2004; Polager *et al.*, 2008). E2F-1 differs from other E2F family members due to its ability to regulate not only cell cycle, but also apoptosis. Indeed, E2F-1 induces the expression of several apoptotic proteins of the Bcl-2 family, in addition to that of p73, caspase 3 and 7 (Stiewe and Pützer, 2000; Iaquinta and Lees, 2007; Polager and Ginsberg, 2009). In response to some stimuli, E2F-1 was shown to induce the expression of several BH3-only proteins, notably Puma, Noxa and Bim (Hao *et al.*, 2007; Hershko and Ginsberg, 2004; Zhao *et al.*, 2005) and to promote apoptosis independently from p53. Enhancement of E2F-1 activity may represent an interesting alternative in p53 tumors (Ambrosini *et al.*, 2007; Polager and Ginsberg, 2009; Peirce and Findley, 2009).

We herein provide evidence that activity of E2F-1 contributes to the sensitivity of cancer cells to ABT-737 by promoting the expression of Noxa upon treatment by this compound. Induction of Noxa is caspase dependent and it coincides with caspase dependent cleavage of the E2F-1 regulatory protein pRb, which contributes itself to Noxa induction. Thus, we propose that a feed forward mechanism through which low level activation of the caspase cascade enhances E2F-1 transcription of Noxa by a pRb dependent mechanism, fuels ABT-737 efficiency.

Results

ABT-737 induces late but specific pro-apoptotic activity against U251 cells

We investigated the effects of ABT-737 on U251 cells, a glioblastoma cell line in which p53 harbors a mutation R273H that affects its DNA binding activity. We were intrigued by the observation that ABT-737 exerts delayed effects on cell death. Indeed, evaluation of cell viability showed that after 24h of treatment with 2μM of ABT-737, no cell death could be detected (Figure 1A). In contrast, significant cell death rates were detected in cells treated for an additional 24h. DNA content evaluation indicated that cell death that occurred at this time was associated with a significant percentage of cells with a subG1 DNA content, but that it was not associated with detectable modifications of cell cycle distribution (data not shown).

We performed numerous experiments to confirm that the late effects of ABT-737 on cell viability rely on the canonical mitochondrial apoptotic pathway. First, we investigated the role played by caspases in the induction of cell death. U251 cells were pre-treated with zVAD-fmk, a pan caspase inhibitor and then treated with 2μM of ABT-737 during 48h. zVAD-fmk did inhibit cell death (Figure 1A). Second, we investigated whether the multi-domain pro-apoptotic protein, Bax, which plays a major role in the apoptotic response of human cancer cells (including in that of human colorectal cancer cells to ABT-737, (Gallenne *et al.*, 2009), was involved in the late apoptotic effects of ABT-737. We knocked down Bax expression by RNA interference using transfected siRNAs whose efficiency was checked by western blot analysis of Bax expression (Figure 1B). Silencing of Bax significantly reduced the rate of cell death induced by ABT-737 indicating that this protein is involved in cell death response (Figure 1B). Finally, we wished to confirm that the delayed effects of ABT-737 are on-target effects. We thus investigated whether U251 cells rely on Bcl-2 and/or Bcl-xL (two main targets of ABT-737) expression to maintain viability. We analyzed the response of these cells to the knock down of Bcl-2, Bcl-X_L or both by RNA interference using transfected siRNAs. The efficiency of the siRNAs was checked by western blot as described above (Figure 1C). Silencing of either Bcl-2 or Bcl-X_L alone had no effect on cell viability. However, simultaneous silencing of Bcl-2 and Bcl-x_L induced cell death at a similar rate to that measured upon ABT-737 treatment (Figure 1A and 1C).

Thus the viability of U251 requires the sustained and combined activities of Bcl-2 and Bcl-xL. Their treatment with the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737 consistently induces a caspase dependent cell death mediated by the pro-apoptotic protein Bax, but these effects take several hours to be manifest.

E2F-1 dependant induction of the BH3-only Noxa plays a major role in U251 cell death induced by ABT-737

The fact that the influence of ABT-737 on the viability of U251 cells takes some time to be patent suggests that the mounting of a death signal intervenes. To characterize such a putative signal, we investigated the expression of Bcl-2 family members in ABT-737 treated U251 cells and found that the BH3-only Noxa was highly up-regulated upon ABT-737 treatment in U251 cells (Figure 2A). Noxa was shown to play a key role in ABT-737 sensitivity by antagonizing Mcl-1 (Albershardt *et al.*, 2011)**.** We thus investigated what role it might play in the late effects of ABT-737 and we found that knock down of Noxa expression by siRNA decreased significantly cell death induced by this compound (Figure 2B).

We investigated whether the induction Noxa by ABT-737 occurred at a transcriptional level. qPCR experiments showed that the mRNA levels of Noxa were increased after 48h of ABT-737 treatment (Figure 2C). As U251 cells express a mutated p53, the latter transcription factor is unlikely to be involved in the transcriptional upregulation of Noxa by ABT-737. In contrast, we reasoned that E2F-1 might be a good candidate as a transcription factor involved in Noxa induction. Consistent with this, we found that the mRNA levels of p73, another transcriptional target of E2F-1, were also upregulated by ABT-737 (Figure 2C). The fact that ABT-737 treatment induces occupancy of the Noxa and p73 promoter regions by E2F-1, as evaluated in CHIP experiments described below, further establishes that ABT-737 impacts on E2F-1 transcriptional activity.

To confirm that E2F-1 is involved in the induction of Noxa by ABT-737 treatment, we analyzed the consequence of its knock down by RNA interference. The efficiency of the siRNAs was confirmed by western blot as described above (Figure 3B). The induction of Noxa was significantly affected by silencing of E2F-1 upon ABT-737 treatment in U251 cells (Figure 3A). In agreement with a key role played by Noxa, silencing of E2F-1 decreased significantly cell death (Figure 3B). We also analyzed whether, conversely, the effects of over-expressed E2F-1. Over-expression of E2F-1 increased Noxa expression (Figure 3C). Whereas such over-expression proved insufficient to affect cell viability by itself, it nevertheless enhanced sensitivity to induction of cell death by ABT-737 (Figure 3D). Up-regulation of Noxa and sensitization to ABT-737 induction of cell death by over-expression of E2F-1 was also observed in the colorectal cancer p53-null HCT116 cells (Figure S1).

Taken together, these results indicate that ABT-737 treatment induces E2F-1 dependent Noxa upregulation, and that this process contributes to cell death induced by the compound.

The E2F-1 regulatory protein pRb is cleaved by caspases upon ABT-737 and it contributes to caspase dependent induction of Noxa

We investigated how ABT-737 might impact on E2F-1 induction of Noxa. We observed no detectable modification in the expression of E2F-1 upon ABT-737 treatment (Figure 4A). E2F-1 activity was shown enhanced by the release of E2F-1 from pRb upon the phosphorylation state of this latter (Iaquinta and Lees, 2007). In fact, ABT-737 treatment had no impact on the phosphorylation at Ser 870-811 of the E2F-1 regulatory protein pRb (Figure 4A). One remarkable feature was that upon ABT-737 treatment, in addition to the 110 Kda band corresponding to the full-length pRb, three other bands were detected of 100 Kda, 68 Kda and 48 Kda respectively (Figure 4A). To confirm that these bands did correspond to pRb, we knocked down expression of the latter protein by RNA interference. The p110, p68 and p48 bands were no more detected in cells in which pRb was silenced by RNA interference but were still detected in cells transfected with the siRNA control (Figure 4C). These bands were also observed when Bcl-2 and Bcl-X_L were silenced simultaneously but not when either one of them was down regulated alone, indicating that it was an on-target effect of ABT-737 treatment (Figure 4B).

We inferred that the observed modifications of pRb upon ABT-737 might result from caspase activation upon treatment by this compound. Indeed, numerous data have shown that pRb can be cleaved by caspase 3 and 7 at two sites, the DEAD and the DISD sites, respectively (An and Dou, 1996; Boutillier *et al.*, 2000; Fattman *et al.*, 2001; Katsuda *et al.*, 2002). Cleavage at the DEAD site truncated pRb at the C-terminal giving rise to a band of 100 Kda while two bands of 48 Kda and 68 Kda, respectively, were obtained after cleavage at the DSID site (Figure 5A). To test whether the observed bands corresponded to caspase cleavage products of pRb, pRb expression profile was analyzed in U251 cells pre-treated with zVAD-fmk, a pan caspase inhibitor, prior to ABT-737 treatment. The full-length p110 and the p100 forms were always detected but not the p68 form when cells were pretreated with the caspase inhibitor (Figure 5B). Furthermore, we found that the truncated forms of pRb, p68 and p48, were not observed upon treatment with ABT-737 of cells in which Bax expression had been silenced by RNA interference (Figure 1B and 4C). At least, the pRb expression profile was determined in cell treated by ABT-737 at different times and correlated with cell death measured. Of note, the resolution of the gel we used did not allow to discriminate the p110 Kda band from the p100 Kda band. Consistent with data above, the appearance of the truncated form of p68Rb was concomitant with increased of cell death (Figure 5C).

We performed two types of experiments to investigate whether caspase cleavage of pRb contributes to Noxa and cell death induction by ABT-737. First, U251 cells were pre-treated with a pan caspase inhibitor, Q-VD-OPH prior to treatment with ABT-737 and Noxa expression was analyzed by western blot. Induction of Noxa by ABT-737 was not observed under these conditions

(Figure 5D). Second, we investigated what role pRb might play in these effects by investigating the consequence of its knock down by RNA interference. Silencing of pRb induced an inhibition of the up-regulation of Noxa upon ABT-737 treatment similar to that observed when E2F-1 was silenced (Figure 3A). Moreover, silencing of pRb had no effect on the viability of U251 cells by itself, but it significantly decreased cell death rates induced by ABT-737 treatment (Figure 3B). Thus, caspase activity and the pRb protein both contribute to Noxa and cell death induction by ABT-737.

pRb and E2F-1 interact together and bind to the Noxa promoter upon ABT-737 treatment

The data above indicate that both E2F-1 and its regulatory protein pRb contribute to Noxa induction and concomitant cell death induced by ABT-737. pRb regulates E2F-1 transcriptional activity in great part by physically interacting with this protein (Iaquinta and Lees, 2007; Polager *et al.*, 2008). It is well understood that physical interaction between hypophosphorylated pRb and E2F-1 inhibits the ability of the latter to induce the expression of genes involved in cell cycle progression. However, a recent study suggests that the hyperphosphorylated pRb can maintain an interaction with E2F-1 (Cecchini and Dick, 2011). Moreover, published data indicated that pRb may also function, in certain instances, as a binding partner for E2F-1 that contributes to its ability to induce the expression of pro-apoptotic genes (Ianari *et al.*, 2009; Julian *et al.*, 2008). To further understand the functional interplay between pRb and E2F-1 during ABT-737 induction of cell death, we thus investigated the interaction between E2F-1 and the forms of pRb observed under these conditions.

First, E2F-1 antibodies were used in immunoprecipitations experiments using lysates from ABT-737 treated cells. E2F-1 was found to interact with full-length pRb (including with its phosphorylated form) in cells treated with ABT-737 or not (Figure 6A). Both the p100Rb and the p68Rb forms interacted with E2F-1 upon ABT-737 treatment. The latter interactions are consistent with the fact that these two truncated forms still harbor the domain of interaction with E2F-1 (Figure 5A) (Dick, 2007). Second, we used pRb antibodies in reverse immunoprecipitations experiments. Importantly, the antibody used (pRB XZ55) recognizes the full-length pRb and the p68Rb form (Figure 5A). Our data indicate that E2F-1 coimmunopreciptated with pRb (Figure 6A).

These data indicate that full length and truncated forms of pRb, interact with E2F-1 upon ABT-737 treatment and may cooperate with this transcription factor to induce Noxa transcription. To investigate this possibility, the ability of E2F-1 and pRb to occupy promoter regions of Noxa and p73 in response to ABT-737 was analyzed by CHIP experiments. Of note, anti-pRb antibodies used in these assays recognize all forms of pRb. Both E2F-1 and pRb were found to occupy Noxa and p73 promoter regions with an increased of the signal under ABT-737 treatment (Figure 6B). pRb was not found on

the PLK1 promoter, an E2F-1 gene target while as expected E2F-1 was detected (Figure 6B). No amplification was either observed with negative controls (p73 control and PLK1 control, Figure 6B).

These data indicate that pRb full length but also the truncated form p68Rb interact with E2F-1 upon ABT-737 treatment and that pRb and E2F-1 are recruited on the p73 and Noxa promoters indicated that they may contribute together to regulate the transcription of these two target genes.

Nutlin3a sensitizes cells to ABT-737 induction of cell death through the pRb/E2F-1 pathway and the BH3-only Noxa

One implication from the results shown above is that approaches that enhance E2F-1 activity may contribute to increase sensitivity to ABT-737 by a pRb and Noxa dependent mechanism, independently from p53. To investigate this, we employed the MDA-MB-231 breast cancer cell line, in which p53 is mutated (R280K), and that are hardly sensitive to ABT-737 as a single agent, to the very least under the conditions used (Figure 7A). We used Nutlin-3a, an inhibitor of the ubiquitin ligase Mdm2, as this compound was shown to enhance chemosensitivity in an E2F-1 dependent manner in cells p53 null or lacking a functional p53, through upregulation of p73 and Noxa or Puma (Ambrosini *et al.*, 2007; Peirce and Findley, 2009). MDA-MB-231 cells were thus treated with ABT-737 combined with Nutlin-3a or not. While 48h treatment with 10 μM Nutlin-3a or with 2 μM ABT-737 had no effect on cell viability by themselves, combination of these two treatments induced dramatic cell death rates in MDA-MB-231 cells (Figure 7A).

The involvement of E2F-1 and of pRb, in cell death induced by Nutlin-3a combined to ABT-737 was evaluated using RNA interference. Cell death induced by ABT-737 combined to Nutlin3 was significantly decreased in cells in which E2F-1 or pRb expressions were silenced, consistent with a combined role of both proteins in the cell death process induced (Figure 7B). Consistently, ABT-737 added to Nutlin-3a induced no detectable cell death in the BT549 breast cancer cell line which lacks both p53 and pRb expression (data not shown).

We also investigated the role played by Noxa in this process. The expression of Noxa was analyzed in untreated cells or in cells treated for 48h with 10 μM Nutlin-3a and/or 2 μM ABT-737. Noxa was increased in cells treated with both ABT-737 and Nutlin3 while no modification was observed in cells treated with ABT-737 or Nutlin-3 alone (Figure 7C). To determine if Noxa is a key actor of cell death induced by the combined treatment, Noxa was silenced by RNA interference and cell death measured in MDA-MB-231 treated with ABT-737 combined to Nutlin-3a. Silencing of Noxa induced a strong decrease in cell death rates (Figure 7B). Thus, Noxa contributes to cell death induction in MDA-MB-231 cells treated with ABT-737 combined to Nutlin-3a.

These data suggest that enhancement of E2F-1 activity by Nutlin-3a allows to sensitive cells to ABT-737 treatment at least in part by promoting the up-regulation of Noxa.

Discussion

With possible side effects of ABT-737, the determination of molecular pathways that contribute to its single agent activity, and the characterization of approaches that can enhance this activity are timely. We report here that ABT-737 treatment can induce the expression of Noxa that, in turn, contributes to the ability of ABT-737 to promote cell death. Noxa is a BH3-only protein that potently binds to Mcl-1 (Du *et al.*, 2011). Since the latter anti-apoptotic protein is not targeted by ABT-737, we assume that the ability of Noxa to promote ABT-737 induction of cell death relies in great part on its ability to inhibit Mcl-1. Investigation of Noxa mRNA levels upon ABT-737 treatment allowed us to show that Noxa up-regulation occurs at a transcriptional level. Our data are consistent with a preceding report by Kraft and colleagues who identified the Noxa gene (PMAIP1) as one gene whose expression is strongly induced upon treatment of renal carcinoma cells with ABT-737 (Song *et al.*, 2011). It is also interesting to note that induction of Noxa mRNA and protein appears, in fact, to be a common feature of cell treatment with inhibitors of Bcl-2 homologues, as other compounds with BH3-mimetic properties were also found to induce Noxa mRNA (Albershardt *et al.*, 2011).

Work by Kraft and colleagues put forth the notion that low level activation of the caspase cascade contribute to the effects of ABT-737 on the transcription of some genes (Song *et al.*, 2011). Likewise, we found that caspase activity plays a role in Noxa induction by ABT-737. Since Noxa is a key player in the induction of cell death by ABT-737, a view emerges from our study in which caspase activity not only contributes to the final stages of cell death induced by inhibition of Bcl-2 homologues, but also amplifies the apoptotic process upstream of mitochondria. This view is consistent with the observation that executioner caspases are required for full blown Bax activation and mitochondrial permeabilisation in response to diverse stimuli (Lakhani *et al.*, 2006). It is also consistent with the more recent observation that, when caspase activity is blocked, subsets of mitochondria remain refractory to permeabilisation and allow cells to survive to death stimuli (Tait *et al.*, 2010). Our work establishes that, to the very least in response to ABT-737 treatment, Noxa induction may be a critical event through which caspases regulate mitochondrial permeabilisation.

The transcription factor E2F-1 plays a role in this amplificatory loop, as evidenced by its role in cell death induced by ABT-737, by its influence on Noxa expression and its ability to occupy regions in the Noxa promoter upon treatment with the compound. E2F-1 was already described to promote apoptosis in response to either DNA damage or oncogenic stress, in part through regulating the transcription of genes encoding for BH3-only proteins (Iaquinta and Lees, 2007; Polager and Ginsberg, 2009). HDAC inhibitors promote an E2F-1 mediated apoptosis through activation of the

BH3-only Bim in the cancer colorectal HCT116 p53-null cell line expressing inducible E2F-1 (Tan *et al.*, 2006). In NIH3T3 cells, E2F-1 bound at least to the BH3-only proteins Noxa and Puma promoters and E2F-1 induced apoptosis was strongly affected by the inhibition of the expression of either Noxa or Puma (Hershko and Ginsberg, 2004). In U251 cells, we found no effect of ABT-737 treatment on the expression of PUMA mRNA, and we also found that Puma expression is dispensable for efficient induction of apoptosis by ABT-737 (Figure S2). Our qPCR and CHIP assays nevertheless imply that the effect of ABT-737 treatment on E2F-1 extends to at least one other well characterized pro-apoptotic E2F-1 gene target, p73.

Importantly, we found no detectable effect of ABT-737 treatment on the expression of an E2F-1 gene target involved in cell cycle regulation, CCNA2 (data not shown). This suggests that the influence of ABT-737 on E2F-1 activity might be restricted to pro-apoptotic genes such as Noxa and p73. A recent work has established that induction of cell cycle regulatory *versus* pro-apoptotic genes by E2F-1 relies on very different biochemical events, and that they are differentially affected by pRb. Whereas hypophosphorylated pRb negatively regulates the expression of cell cycle genes by E2F-1, it participates (even in its phosphorylated form) to a transcriptionally active complex together with E2F-1 to regulate expression of pro-apoptotic genes (Ianari *et al.*, 2009). In response to DNA damage, Rb was recruited together with E2F-1 on the p73 promoter in p53 deficient T98G cell line and p73 mRNA levels were found reduced by silencing of pRb that also decreases sensitivity to cell death induction by DNA damage (Ianari *et al.*, 2009). Our data are mostly consistent with these data, as they show that, upon treatment with a BH3 mimetic also, pRb interacts with E2F-1, is recruited to the p73 promoter and to that of Noxa, and that pRb contributes to Noxa expression and to cell death induction. The view that emerges from this finding that, contrary to current understanding of the regulation of E2F-1 by pRb, this latter may form complex with E2F-1 that might contribute to the induction of cell death (Ianari *et al.*, 2009; Julian *et al.*, 2008).

Our data suggest that caspase cleavage of pRb may favor these molecular events. One feature of pRb is that it can provide a link between caspase activation and E2F-1 activity as it is cleaved by caspase 3 and 7 during chemotherapy-induced cell death, at two distinct sites giving rise to truncated forms (An and Dou, 1996; Fattman *et al.*, 2001). Our data are consistent with a cleavage of pRb at these two sites upon ABT-737 treatment giving rise to the p100Rb, p68Rb and p48Rb forms. Cleavage of pRb by caspase 3 was previously proposed to coincide with increased apoptosis and it was assumed to result in the release of E2F-1 from cleaved pRbs (Boutillier *et al.*, 2000; Katsuda *et al.*, 2002). Nevertheless, the p68Rb truncated form keeps the domain of interaction with E2F-1. In agreement with this, we found that p68Rb did interact with E2F-1 upon ABT-737 treatment. Since caspase activity is required to up-regulate Noxa and since a siRNA targeting pRb expression impedes the induction of Noxa similarly to a siRNA E2F-1, we propose that the p68Rb form might play an active role in the E2F-1 up-regulation of Noxa by engaging complexes with this protein that are transcriptionnal active. We are currently unable to test this hypothesis directly due to our incapacity to

efficiently transfect U251 cells with pRb. Since pRb cooperates with E2F-1 to induce Noxa in response to ABT-737, and since pRb expression is weak at best in human cancer cells, we expect the pathway reported here to be seldom self-sufficient to induce apoptosis. However, our data imply that therapeutic approaches that enhance the E2F-1 pathway, such as one relying on the Mdm2 inhibitor Nutlin-3a as reported here, may have clinical utility when combined with orally bioavailable compound analog of ABT-737, ABT-263. Synergy between Nutlin-3 and ABT-737 has been reported before (Wade *et al.*, 2008), yet it was ascribed to the ability of Nutlin-3 to enhance expression of wild type p53. Our data imply that the combination may be efficient, even in tumors carrying mutant p53, provided pRb is expressed.

In conclusion, our studies put forth the notion that transcription regulation might be involved in the cellular response to BH3-mimetics and to ABT-737 in particular. It established that activation of the pRb/E2F-1 pathway may constitute an efficient way to overcome cellular resistance to ABT-737, even in cells with dysfunctional p53, through the induction of Noxa.

Materials and Methods

Cell lines and cell culture

The U251 and MDA-MB-231 cell lines were obtained from ATCC. HCT116 p53$^{-/-}$ cells were kindly provided by Dr B. Vogelstein (The John Hopkins Kimmel Cancer Center, Baltimore, MD). All cell lines were incubated at 37°C and humidified 5% CO2-95% air in growth media which is supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin,100 mg/mL streptomycin and 5% (U251 and MDA-MB-231) or 10% (HCT116 p53$^{-/-}$) fetal calf serum (FCS), unless otherwise stated. HCT116 p53$^{-/-}$ cells were grown in McCoy's 5A and U251 and MDA-MB-231 in DMEM. When specified, ABT-737 (Abbott) was used at 2µM, Nutlin-3 (Sigma) at 10µM, zVAD-FMK (Promega) at 50µM and Q-VD-OPh (R&D System) at 10µM.

Plasmids, siRNAs and transfection

The E2F-1 gene from pSG5L HA E2F-1 vector (Addgene Plasmid 10736) was cloned into PcDNA3_Flag from pcDNA3 flag p53 (Addgene Plasmid 10838). The plasmid, named PcDNA3_E2F1_Flag, was sequenced. PcDNA3_E2F1_Flag were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) into U251 cells or HCT116 p53$^{-/-}$ cells and the expression of the ectopic E2F-1 proteins was checked by western blot analysis. The siRNAs were purchased for siScramble (SC37007), sipRb (sc-29468) from Santa Cruz, siBcl-2 (HSC.RNAI.N000633.6.1), siBax (HSC.RNAI.N138761.10.1), siE2F1 (HSC.RNAI.N005225.10.3) from IDT, siBcl-xL (BCL2L1 Human ON-TARGETplus L-003458-00), siPuma (ON-TARGETplus smart pool t-004380-00-0005)

from Thermo scientific and siNoxa (AC2Z4U4) from Ambion. Cells were transfected using lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) according to manufacturer's instructions and were incubated with nucleotides for 48 h before subsequent experiments.

RNA extraction and quantitative real-time PCR

Total RNAs were extracted with RNAeasy mini kit (Qiagen). The quality of the RNAs was assessed by analysis the 28S:18S rRNA ratio using the RNA 6000 Nano Assay kit and the Agilent 2100 bioanalyser (Agilent Biotechnologies). One microgram of RNA was retro-transcribed using Supers script transcriptase (Superscript II, Invitrogen). Following foward and reverse primers designed with Amplifix software were used: p73 (5'-CTTCAACGAAGGACAGTCTG-3' and 5'-AAGTTGTACAGGATGGTGGT-3'), Noxa (5'- GCTGGAAGTCGAGTGTGCTA-3' and 5'-CCTGAGCAGAAGAGTTTGGA-3'), rplpO (5'-GATGACCAGCCCAAAGGAGA-3' and 5'-GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT-3') and β_2-microglobulin (5'-GGCATCTTCAAACCTCCATGATG-3' and 5'-TTCACCCCCACTGAAAAAGATGA-3'). Real time PCR was carried out using the Brilliant Sybr Green QPCR core reagent kit (Stratagene) and the thermocycler of the MX-4000 multiplex Quantitative PCR system (Stratagene). Quantitative normalization of cDNA in each sample was performed using rplpo and β_2-microglobulin mRNAs as internal control. Relative quantification was carried out using the $\Delta\Delta$Ct method.

Immunoblot analysis and antibodies

After two washings with cold PBS, cells were lysed in ice-cold lysis buffer (SDS: 1% ; EDTA: 10mM ; Tris-Hcl ph 8,1: 50mM ; inhibiteurs de protéases Na3VO4 1mM, NaF 100x) and extracts were sonicated two or three times for 10min each. Protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid (BCA) method. Protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred onto a PVDF membrane (Millipore) and revealed with a chemiluminescence kit (Millipore). For signal detection the membranes were incubated overnight with antibodies to Actin (MAB1501R, Millipore), β-Tubulin (T0198, Sigma), Bax (A3533, Dako), Noxa (ALX-804-408, Enzo Life Science), Puma (4743, Sigma), Bcl-2 (1017-1, Epitomics), Bcl-xL (1018-1, Epitomics), E2F-1 C-20 (sc-193, Santa cruz), E2F-1 (3742, Cell Signaling), pRb XZ55 (554144, BD Pharmingen), pRb G3-245 (554136, BD Pharmingen), pRb 4H1 (9309, Cell Signaling), phospho-pRb (S807-811) (558389, BD Pharmingen), Flag (F1804, Sigma), RNA polymerase II (sc-899, Santa Cruz).

ChIP

Attached cells were cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 10min, then the reaction was stopped by 10mL of 125mM Glycin and cells washed twice with 10 ml of cold PBS. Cells were lysed with 500µl of lysis buffer (1% SDS, 10mM EDTA, 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 8.1, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2µg/ml leupeptin, 5µg/ml aprotinin, 1µg/ml pepstatin A, 0.5M NaF, 100mM Na3VO4), and extracts were sonicated six times for 20s each. Supernatants were recovered by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C, diluted one time in dilution buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin A, 0.5 M NaF, 100mM Na3VO4), and subjected to one round of immunoclearing for 1h at 4°C using protein-G-agarose coated with salmon sperm DNA (Millipore). Immunoprecipitations were performed overnight with specific antibodies, then 20µl of protein G-agarose-coated beads with salmon sperm DNA (50%) was added for 1 h at 4 °C. Beads were then washed for 10 min in TSE1 (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.1, and 150mmol/NaCl), TSE2 (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.1, and 500mmol/ NaCl), and TSE3 (0.25M LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholate, 1mM EDTA, and 10mM Tris-HCl, pH 8.1). Beads were washed once with TE buffer (10mM Tris, pH 8, 100mM EDTA) and eluted with 500 µl of elution buffer (1% SDS and 0.1M NaHCO3). Eluates were heated at 65 °C for 6h, and DNA was precipitated using classic procedures. For PCR, 5 µl from a 100µl DNA preparation was used for 25–30 amplification cycles. The following primers were used: NOXA IS (5'-CGTCTAGTTTCCCTACGTC-3' and 5'-AGATGCCAACTACACACG-3'), p73 -1100 (5'-TGAGCCATGAAGATGTGC-3' and 5'-GCTGCTTATGGTCTGATGCTTATG-3'), p73 control (5'-CAATTGTCCCCCTCTTCTGA-3' and 5'-GTGGCAGAAGGGTGCTTAAA-3'), PLK1 IS (5'-GTTTTCCCCGGCTGGGTCCG-3' and 5'-AAGCTGCGCTGCAGACCTCG-3'), PLK1 control (5'-TGTGCAGGTGGGTGTAGTTG-3' and 5'-CCAGGCACAAGGCTAAGAGT-3').

Cellular assays

Cell viability was determined by blue trypan staining. Immunoprecipitations were performed on cell extract (500µg) from cells lysed by lysis buffer (HEPES 10mM; NaCl 150mM; 1% CHAPS; pH7.4; protease inhibitors) in the presence of 0.5% Nonidet P-40 (CA-630, Sigma). Cell extracts were precleared with 20µl of protein G-agarose (Sigma-Aldrich, 50% slurry in phosphate-buffered saline) for 1h at 4°C, and cleared extracts were immunoprecipitated with 4µg of the indicated antibodies overnight at 4 °C followed by the addition of 50µl of protein G-agarose for 1h at 4°C. Immunoprecipitated proteins were washed two times in lysis buffer and one time with 10mM Tris, pH 8, 100mM EDTA, prior to the addition of sample buffer.

Acknowledgements

J. Bertin is supported by grants from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. P. Juin is supported by ARC (n° SFI20101201568), Fondation de France (Tumor committee), Région Pays de Loire and Canceropole Grand Ouest (2010-12798).

References

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

Albershardt TC, Salerni BL, Soderquist RS, Bates DJP, Pletnev AA, Kisselev AF, *et al.* (2011). Multiple BH3 mimetics antagonize anti-apoptotic MCL1 by inducing the endoplasmic reticulum stress response and up-regulating BH3-only protein NOXA. *J Biol Chem* 286(28):24882-95

Ambrosini G, Sambol EB, Carvajal D, Vassilev LT, Singer S, and Schwartz GK. (2007). Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene* 26: 3473-3481.

An B, and Dou QP. (1996). Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res.* 56: 438-442.

Boutillier AL, Trinh E, and Loeffler JP. (2000). Caspase-dependent cleavage of the retinoblastoma protein is an early step in neuronal apoptosis. *Oncogene* 19: 2171-2178.

Buron N, Porceddu M, Brabant M, Desgué D, Racoeur C, Lassalle M, *et al.* (2010). Use of human cancer cell lines mitochondria to explore the mechanisms of BH3 peptides and ABT-737-induced mitochondrial membrane permeabilization. *PLoS ONE* 5: e9924.

Cecchini MJ, and Dick FA. (2011). The biochemical basis of CDK phosphorylation-independent regulation of E2F1 by the retinoblastoma protein. *Biochem. J* 434: 297-308.

Chonghaile TN, and Letai A. (2008). Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene* 27 Suppl 1: S149-157.

van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, *et al.* (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 10: 389-399.

Dick FA. (2007). Structure-function analysis of the retinoblastoma tumor suppressor protein - is the whole a sum of its parts? *Cell Div* 2: 26.

Du H, Wolf J, Schafer B, Moldoveanu T, Chipuk JE, and Kuwana T. (2011). BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *J. Biol. Chem.* 286: 491-501.

Fattman CL, Delach SM, Dou QP, and Johnson DE. (2001). Sequential two-step cleavage of the retinoblastoma protein by caspase-3/-7 during etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* 20: 2918-2926.

Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, and Letai A. (2007). Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J. Clin. Invest.* 117: 112-121.

Gallenne T, Gautier F, Oliver L, Hervouet E, Noël B, Hickman JA, *et al.* (2009). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J. Cell Biol* 185: 279-290.

Gautier F, Guillemin Y, Cartron PF, Gallenne T, Cauquil N, Le Diguarher T, *et al.* (2011). Bax activation by engagement with, then release from, the BH3 binding site of Bcl-xL. *Mol. Cell. Biol* 31: 832-844.

Hao H, Dong Y, Bowling MT, Gomez-Gutierrez JG, Zhou HS, and McMasters KM. (2007). E2F-1 induces melanoma cell apoptosis via PUMA up-regulation and Bax translocation. *BMC Cancer* 7: 24.

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

Ianari A, Natale T, Calo E, Ferretti E, Alesse E, Screpanti I, *et al.* (2009). Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer Cell* 15: 184-194.

Iaquinta PJ, and Lees JA. (2007). Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol* 19: 649-657.

Julian LM, Palander O, Seifried LA, Foster JEG, and Dick FA. (2008). Characterization of an E2F1-specific binding domain in pRB and its implications for apoptotic regulation. *Oncogene* 27: 1572-1579.

Katsuda K, Kataoka M, Uno F, Murakami T, Kondo T, Roth JA, *et al.* (2002). Activation of caspase-3 and cleavage of Rb are associated with p16-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 21: 2108-2113.

Kelly PN, and Strasser A. (2011). The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 18: 1414-1424.

Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA Jr, Booth CJ, Mehal WZ, *et al.* (2006). Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311: 847-851.

Lalier L, Cartron P-F, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B, *et al.* (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 12: 887-896.

Okumura K, Huang S, and Sinicrope FA. (2008). Induction of Noxa sensitizes human colorectal cancer cells expressing Mcl-1 to the small-molecule Bcl-2/Bcl-xL inhibitor, ABT-737. *Clin. Cancer Res.* 14: 8132-8142.

Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, *et al.* (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435: 677-681.

Peirce SK, and Findley HW. (2009). The MDM2 antagonist nutlin-3 sensitizes p53-null neuroblastoma cells to doxorubicin via E2F1 and TAp73. *Int. J. Oncol.* 34: 1395-1402.

Polager S, and Ginsberg D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. *Nat. Rev. Cancer* 9: 738-748.

Polager S, Ofir M, and Ginsberg D. (2008). E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene* 27: 4860-4864.

Quinn BA, Dash R, Azab B, Sarkar S, Das SK, Kumar S, *et al.* (2011). Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 10:1397-411

Song JH, Kandasamy K, and Kraft AS. (2008). ABT-737 induces expression of the death receptor 5 and sensitizes human cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 283: 25003-25013.

Song JH, Kandasamy K, Zemskova M, Lin Y-W, and Kraft AS. (2011). The BH3 mimetic ABT-737 induces cancer cell senescence. *Cancer Res* 71: 506-515.

Stevens C, and La Thangue NB. (2004). The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst.)* 3: 1071-1079.

Stiewe T, and Pützer BM. (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat. Genet.* 26: 464-469.

Tagscherer KE, Fassl A, Campos B, Farhadi M, Kraemer A, Böck BC, *et al.* (2008). Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 27: 6646-6656.

Tait SWG, Parsons MJ, Llambi F, Bouchier-Hayes L, Connell S, Muñoz-Pinedo C, *et al.* (2010). Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Dev. Cell* 18: 802-813.

Tan J, Zhuang L, Jiang X, Yang KK, Karuturi KM, and Yu Q. (2006). Apoptosis signal-regulating kinase 1 is a direct target of E2F1 and contributes to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through positive feedback regulation of E2F1 apoptotic activity. *J. Biol. Chem.* 281: 10508-10515.

Wade M, Rodewald LW, Espinosa JM, and Wahl GM. (2008). BH3 activation blocks Hdmx suppression of apoptosis and cooperates with Nutlin to induce cell death. *Cell Cycle* 7: 1973-1982.

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.

Zhang L, Lopez H, George NM, Liu X, Pang X, and Luo X. (2011). Selective involvement of BH3-only proteins and differential targets of Noxa in diverse apoptotic pathways. *Cell Death Differ.* 18: 864-873.

Zhao Y, Tan J, Zhuang L, Jiang X, Liu ET, and Yu Q. (2005). Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102: 16090-16095.

Figure legends

Figure 1 ABT-737 induced a caspase and Bax dependent cell death in U251. (A) U251 cells were treated by ABT-737 2µM and Z-VAD-FMK 50µM (ZVAD) for 24h or 48h and cell death was assayed by a trypan blue-staining**.** (B) U251 cells were transfected with the indicated siRNA. 48h later, cells were treated by ABT-737 2µM for 48h. Western blot analysis of Bax was performed and cell death was assayed by a trypan blue-staining. (C) U251 cells were transfected with the indicated siRNA. 72h later, cells were harvested. Western blot analysis of Bcl-xL and Bcl-2 was performed and cell death was assayed by a trypan blue-staining. Data presented in (A) (B) and (C) are mean ± SEM of three independent experiments.

Figure 2 The BH3-only Noxa is involved in cell death in response to ABT-737. (A) U251 were treated by ABT-737 2µM for 3h, 6h 9h, 16h, 24h and 48h and western blot analysis of Noxa was performed**.** (B) U251 cells were transfected with the indicated siRNA. 48h later, cells were treated by ABT-737 2µM for 48h. Western blot analysis of Noxa was performed and cell death was assayed by a trypan blue-staining. (C) Noxa and p73 mRNA levels were measured by real-time RT-PCR analysis and normalized to RPLPO and β_2-microglobuline. Data presented in (B) and (C) are mean ± SEM of three independent experiments.

Figure 3 E2F-1 and pRb is involved in the induction of cell death and of Noxa level. U251 cells were transfected with the indicated siRNA. 48h later, cells were treated by ABT-737 2µM for 48h. Western blot analysis of Noxa (A), pRb and E2F-1 (B) was performed and cell death was assayed by a trypan blue-staining (B). U251 cells were transfected with PcDNA3_E2F1_Flag or PcDNA3_Flag. 24h later, cells were treated by ABT-737 2µM for 48h. Western blot analysis of Noxa was performed (C) and cell death was assayed by a trypan blue-staining (D). Data presented in (B) and (D) are mean ± SEM of three independent experiments.

Figure 4 pRb is cleaved under ABT-737 and this cleavage is Bcl-2, Bcl-xL and Bax dependant. (A) U251 cells were treated by ABT-737 2µM for 48h and western blot analysis of proteins expression was performed. (B) U251 cells were transfected with the indicated siRNA. 72h later, cells were harvested and western blot analysis of proteins expression was performed. (C) U251 cells were transfected with the indicated siRNA. 48h later, cells were treated by ABT-737 2µM for 48h and western blot analysis of proteins expression was performed.

Figure 5 pRb cleavage and Noxa induction are caspase dependant. (A) Schema of pRb with caspases cleavage sites, E2F interaction sites and fixation antibody sites, and schema of pRb cleaved forms $p68^{Rb}$ and $p48^{Rb}$. (B) U251 cells were treated by ABT-737 2µM and/or Z-VAD-FMK 50µM (ZVAD) for 48h and western blot analysis of pRb was performed. (C) U251 cells were treated by ABT-737

2µM for indicated time. Western blot analysis of pRb expression was performed. (D) U251 cells were treated by ABT-737 2µM and Q-VD-OPh 10µM for 48h and western blot analysis of Noxa was performed.

Figure 6 pRb and E2F-1 interact together and bind to Noxa and p73 promoter. (A) U251 cells were treated by ABT-737 2µM for 48h and cells lysates were immunoprecipated (IP) with an anti-E2F-1 or an anti-pRb antibody and the presence of E2F-1, full length pRb, truncated form $p68^{Rb}$ and phosphorylated form of pRb in the immunoprecipitated fractions was analysed by immunoblotting. (B) U251 cells were treated by ABT-737 2µM for 48h and soluble chromatin was prepared and immunoprecipitated with antibodies directed against pRB, E2F-1 and RNA polymerase II (Pol II). DNA was amplified using pair of primers that covers the E2F-1 binding sites of the Noxa, p73 and PLK1 promoters as indicated. ChIP assays were then analysed by northern blot.

Figure 7 Nutlin-3 sensitizes MDA-MB-231 cells to ABT-737 and this combination up-regulates Noxa. (A and C) MDA-MB-231 cells were treated by ABT-737 2µM and Nutlin-3 10µM for 48h. Cell death was assayed by a trypan blue-staining (A) and western blot analysis of Noxa was performed (C)**.** (B) MDA-MB-231 cells were transfected with the indicated siRNA. 48h later, cells were treated by ABT-737 2µM and Nutlin-3 10µM for 48h. Western blot analysis of Noxa was performed and cell death was assayed by a trypan blue-staining.

Figure S1 E2F-1 induction sensitizes HCT116 $p53^{-/-}$ to ABT-737. HCT116 $p53^{-/-}$ cells were transfected with PcDNA3_E2F1_Flag or PcDNA3_Flag. 24h later, cells were treated by ABT-737 2µM for 24h. Cell death was assayed by a trypan blue-staining. Data presented are mean ± SEM of three independent experiments.

Figure S2 The BH3-only Noxa, but not Puma, is involved in cell death in response to ABT-737. U251 cells were transfected with the indicated siRNA. 48h later, cells were treated by ABT-737 2µM for 48h. Western blot analysis of Puma and Noxa was performed and cell death was assayed by a trypan blue-staining. Data are mean ± SEM of three independent experiments.

Figure 1

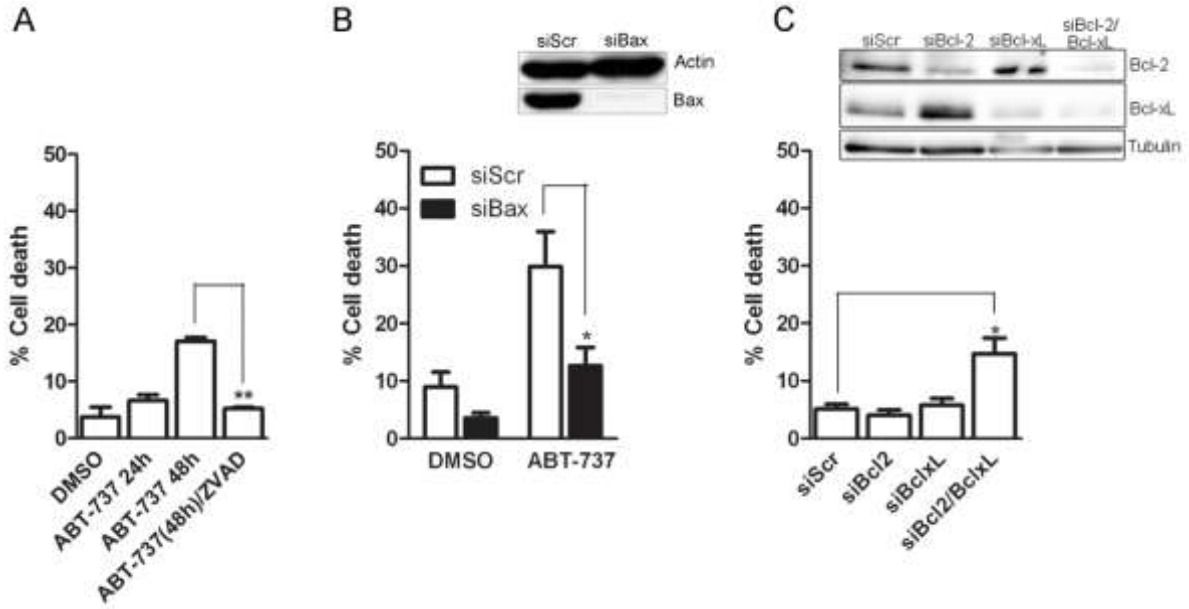

A
% Cell death
50
40
30
20
10
0
**
DMSO
ABT-737 24h
ABT-737 48h
ABT-737(48h)/ZVAD
B
siScr
siBax
Actin
Bax
% Cell death
siScr
siBax
*
DMSO
ABT-737
C
siScr
siBcl-2
siBcl-xL
siBcl-2/
Bcl-xL
Bcl-2
Bcl-xL
Tubulin
% Cell death
*
siScr
siBcl2
siBclxL
siBcl2/BclxL

Figure 2

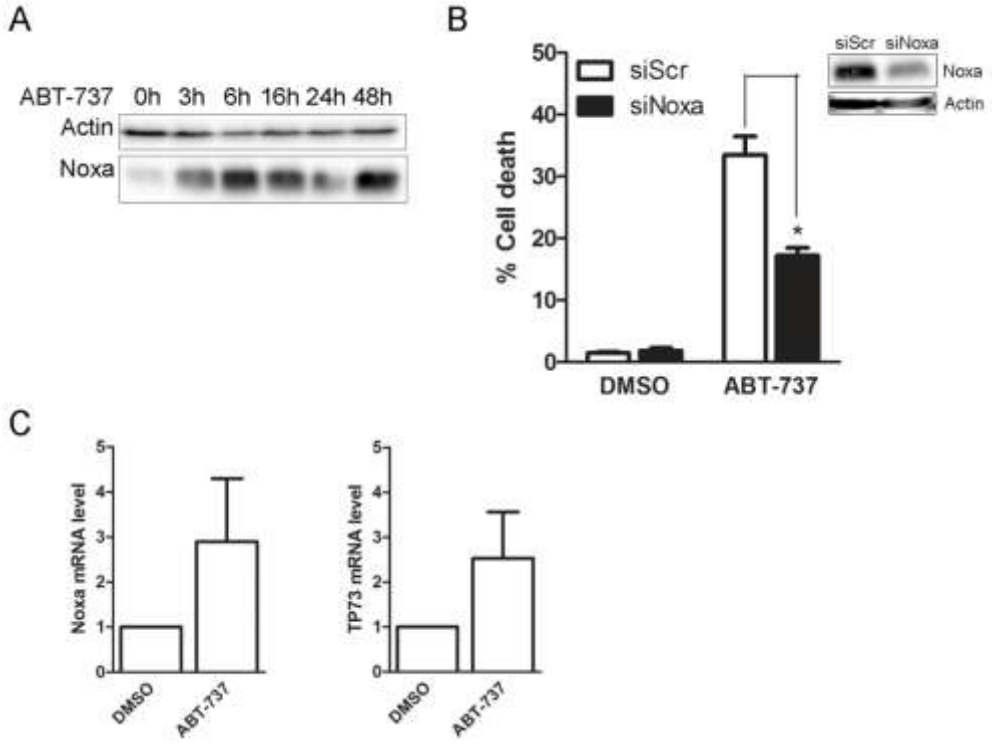

A
ABT-737 0h 3h 6h 16h 24h 48h
Actin
Noxa
B
siScr
siNoxa
% Cell death
50
40
30
20
10
0
DMSO
ABT-737
*
siScr siNoxa
Noxa
Actin
C
Noxa mRNA level
TP73 mRNA level
5
4
3
2
1
0
DMSO
ABT-737

Figure 3

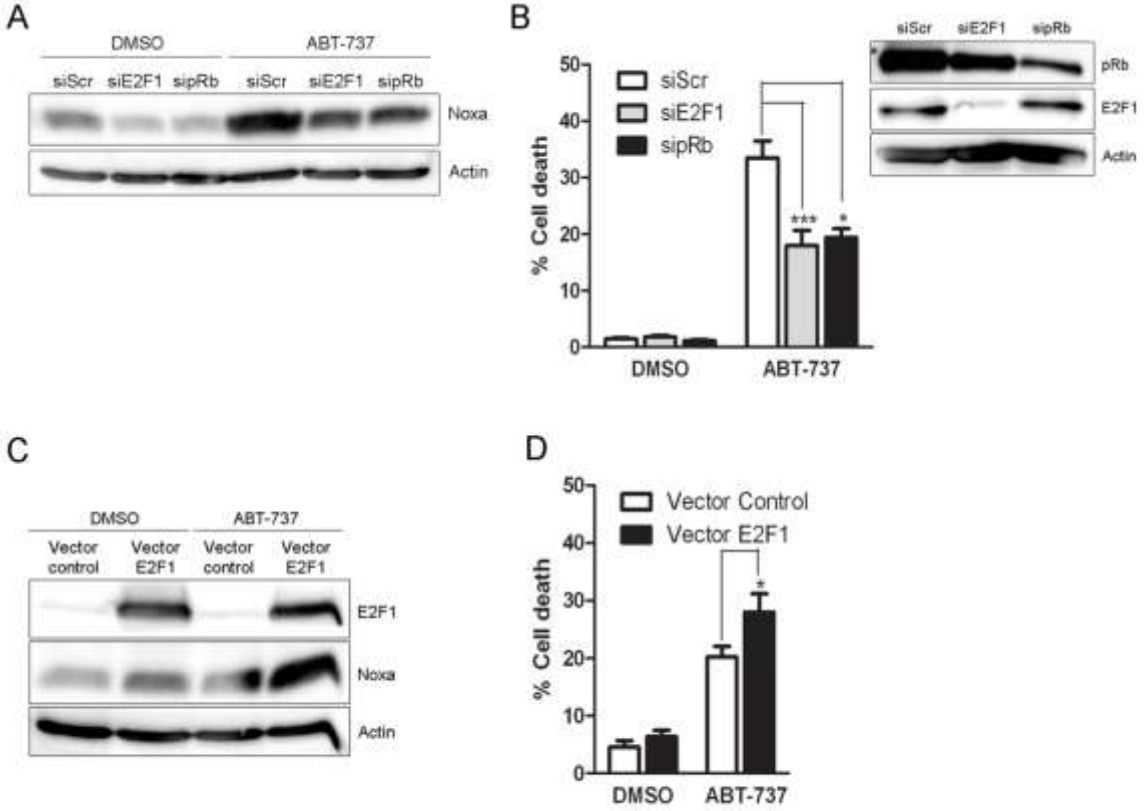

A
DMSO
ABT-737
siScr siE2F1 sipRb siScr siE2F1 sipRb
Noxa
Actin
B
siScr
siE2F1
sipRb
% Cell death
50
40
30
20
10
0
***
*
DMSO
ABT-737
siScr siE2F1 sipRb
pRb
E2F1
Actin
C
DMSO
ABT-737
Vector control
Vector E2F1
Vector control
Vector E2F1
E2F1
Noxa
Actin
D
Vector Control
Vector E2F1
% Cell death
50
40
30
20
10
0
*
DMSO
ABT-737

Figure 4

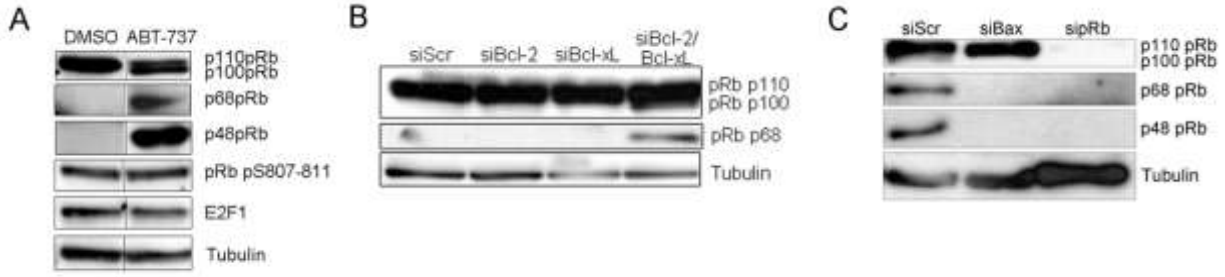

A
DMSO
ABT-737
p110pRb
p100pRb
p68pRb
p48pRb
pRb pS807-811
E2F1
Tubulin
B
siScr
siBcl-2
siBcl-xL
siBcl-2/
Bcl-xL
pRb p110
pRb p100
pRb p68
Tubulin
C
siScr
siBax
sipRb
p110 pRb
p100 pRb
p68 pRb
p48 pRb
Tubulin

Figure 5

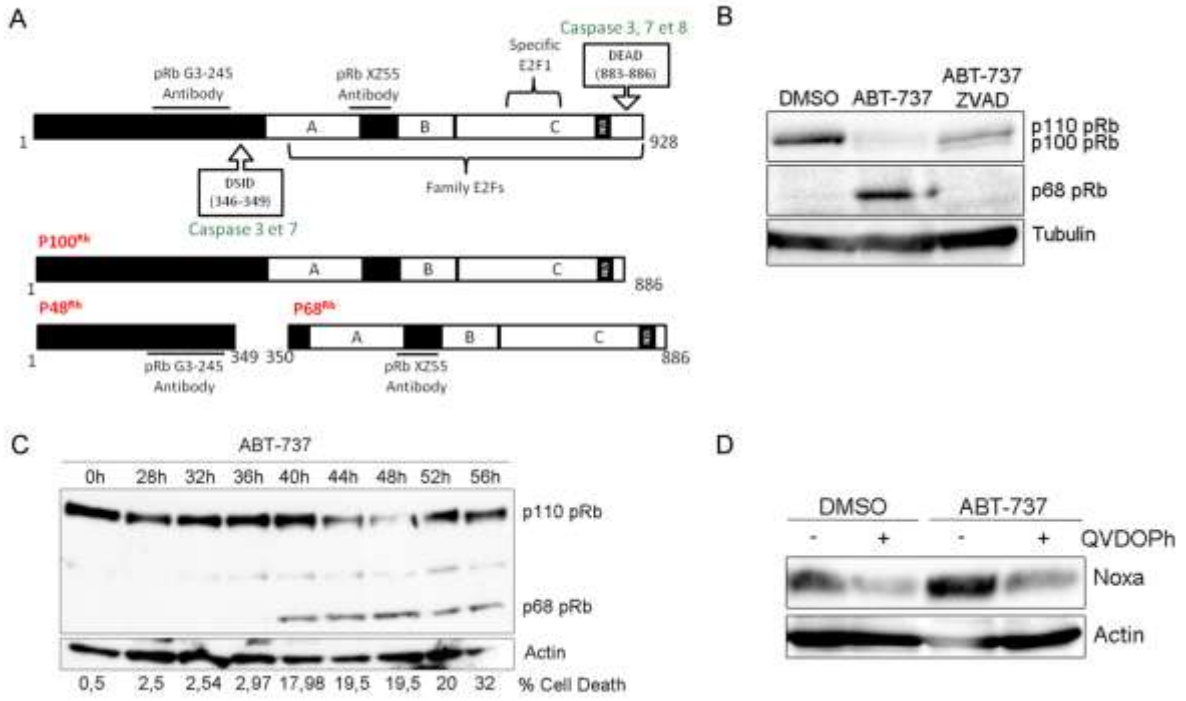

A
Caspase 3, 7 et 8
Specific E2F1
DEAD (883-886)
pRb G3-245 Antibody
pRb XZ55 Antibody
A
B
C
1
928
DSID (346-349)
Family E2Fs
Caspase 3 et 7
P100Rb
886
P48Rb
P68Rb
349 350
pRb G3-245 Antibody
pRb XZ55 Antibody
B
DMSO
ABT-737
ABT-737 ZVAD
p110 pRb
p100 pRb
p68 pRb
Tubulin
C
ABT-737
0h 28h 32h 36h 40h 44h 48h 52h 56h
p110 pRb
p68 pRb
Actin
0,5 2,5 2,54 2,97 17,98 19,5 19,5 20 32
% Cell Death
D
DMSO
ABT-737
- + - + QVDOPh
Noxa
Actin

Figure 6

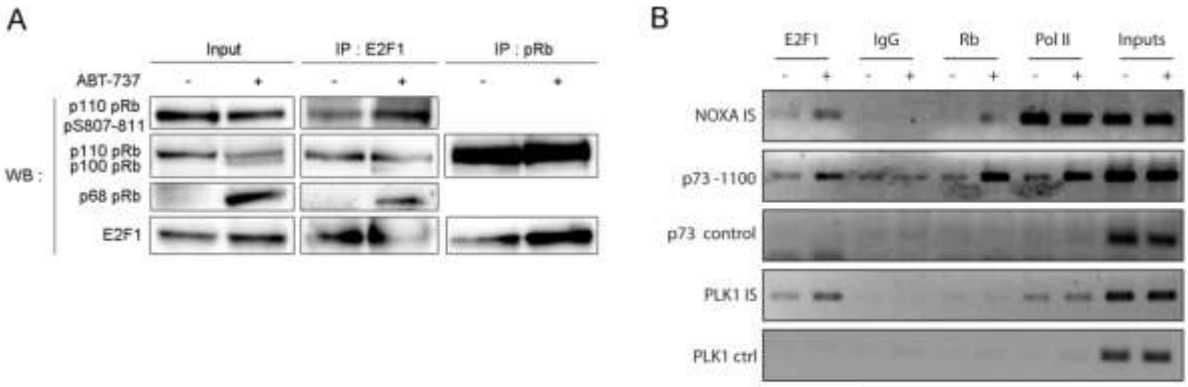

A
Input
IP : E2F1
IP : pRb
ABT-737
- + - + - +
WB :
p110 pRb pS807-811
p110 pRb p100 pRb
p68 pRb
E2F1
B
E2F1
IgG
Rb
Pol II
Inputs
- + - + - + - + - +
NOXA IS
p73 -1100
p73 control
PLK1 IS
PLK1 ctrl

Figure 7

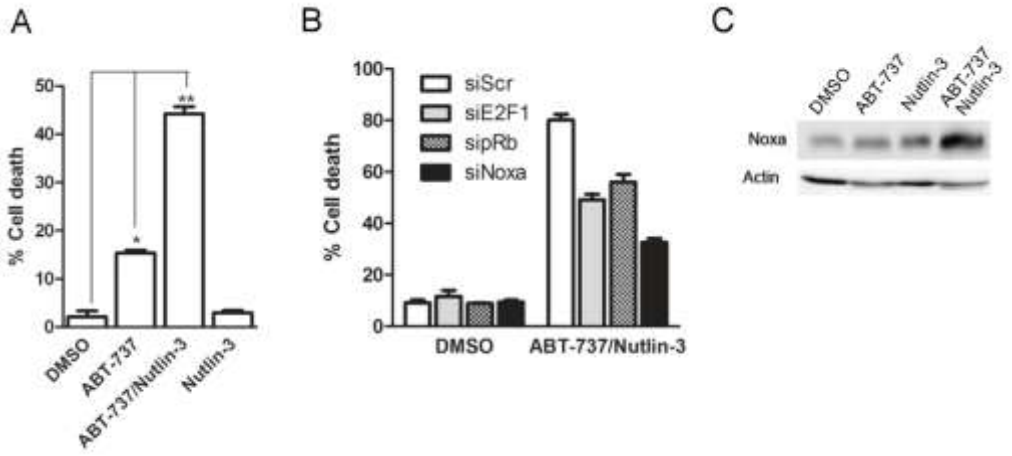

A
% Cell death
50
40
30
20
10
0
*
**
DMSO
ABT-737
ABT-737/Nutlin-3
Nutlin-3
B
% Cell death
100
80
60
40
20
0
siScr
siE2F1
sipRb
siNoxa
DMSO
ABT-737/Nutlin-3
C
DMSO
ABT-737
Nutlin-3
ABT-737
Nutlin-3
Noxa
Actin

Figure S1

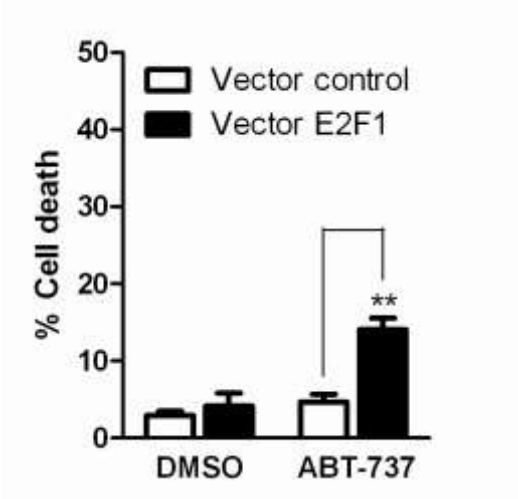
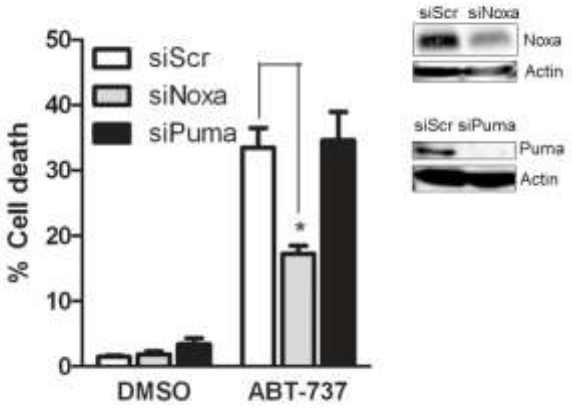

50
40
30
20
10
0
% Cell death
Vector control
Vector E2F1
**
DMSO
ABT-737

Figure S2


% Cell death
50
40
30
20
10
0
siScr
siNoxa
siPuma
*
DMSO
ABT-737
siScr siNoxa
Noxa
Actin
siScr siPuma
Puma
Actin

2- E2F1 peut se complexer avec Bcl-xL mais pas avec Bcl-2 ou Mcl-1 dans les cellules U251

E2F1, comme p53, est un facteur de transcription qui peut déclencher la mort en induisant la transcription de gènes pro-apoptotiques tels que Noxa ou Puma. Au-delà de son rôle transcriptionnel, p53 peut aussi avoir une fonction non transcriptionnelle au niveau cytoplasmique et interagir directement avec des protéines de la famille Bcl-2. Pour évaluer si E2F1 pourrait, comme p53, directement interagir avec des protéines de la famille Bcl-2, nous avons transfecté les cellules U251, traitées ou non par l'ABT-737, par les vecteurs exprimant les protéines Bcl-2, Bcl-xL ou Mcl-1 fusionnées avec l'étiquette Flag et nous avons effectué des co-immunoprécipitation entre ces trois protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et la protéine E2F1. Dans les cellules U251, E2F1 interagit avec Bcl-xL (figure 43) mais pas avec Bcl-2, ni avec Mcl-1 (données non présentées). L'interaction entre E2F1 et Bcl-xL est présente dans les cellules U251 traitées ou non par l'ABT-737 (figure 43). Ceci laisse à penser que Bcl-xL interagirait avec E2F1 mais pas au niveau de sa poche hydrophobe. Pour confirmer cette hypothèse, la même co-immunoprécipitation est reproduite mais, cette fois-ci, avec un mutant de Bcl-xL G138A. Le mutant Bcl-xL G138A perd sa capacité à lier Bax par sa poche hydrophobe en revanche il garde sa capacité à lier E2F1 (figure 43) confirmant que Bcl-xL se lierait à E2F1 par un autre domaine d'interaction que sa poche hydrophobe.

L'ensemble de ces données suggère qu'E2F1 a la capacité de lier directement Bcl-xL par un autre domaine que la poche hydrophobe mais qu'il n'est pas lié à Bcl-2 ni Mcl-1, autres protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

En conclusion, lors de traitement à l'ABT-737, des gènes pro-apoptotiques notamment Noxa et p73, sont induits par E2F1 mais également par sa protéine régulatrice pRb, clivée par les caspases. Les protéines pro-apoptotiques ainsi induites favoriseraient le déclenchement de l'apoptose par l'ABT-737. E2F1 et pRb serait alors des acteurs majeurs de la mort induite par l'ABT-737. En parallèle, E2F1, au-delà de son rôle transcriptionnel pourrait directement interagir avec des protéines impliquées dans la mort cellulaire et de nouveau favoriser l'apoptose.

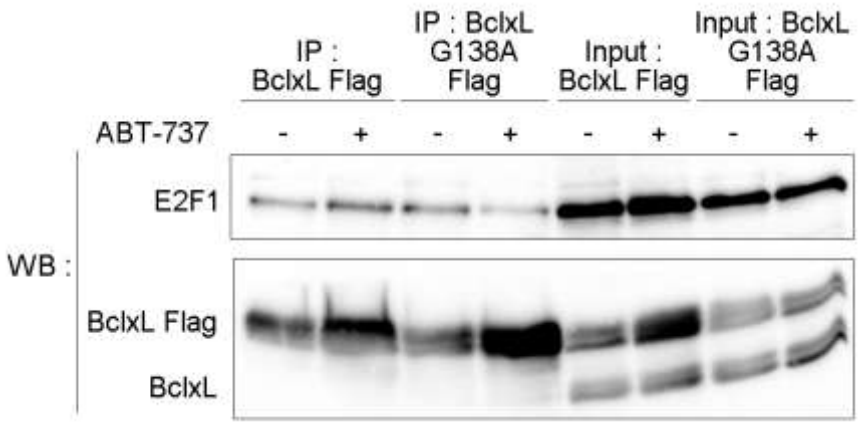


Figure 43 : Interaction des proteines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et E2F1. Les cellules U251 sont transfectées par les vecteurs Bcl-xL flag ou Bcl-xL G138A flag, puis traitées ou non par l'ABT-737 2µM pendant 48h. Ensuite le lysat cellulaire est immunoprécipité avec un anticorps anti-Flag et la présence d'E2F1 et Bcl-xL, dans la fraction immunoprécipitée est analysée par western blot.

B – p53, de manière non transcriptionnelle, favorise la mort cellulaire induite par l'ABT-737 dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$

Au laboratoire, Tristan Gallenne, a démontré que les cellules cancéreuses colorectales HCT116 p21$^{-/-}$ sont sensibles à l'ABT-737 et que l'apoptose induite par ce BH3 mimétique est dépendante de Puma et de Bax (Gallenne *et al.*, 2009) (figure 44). Dans la poursuite de cette étude, nous nous sommes demandé dans quelle mesure la voie pRb/E2F1 jouait un rôle dans l'induction de l'apoptose par l'ABT-737, dans une lignée cellulaire ayant un p53 sauvage. En parallèle, nous avons étudié l'impact de la voie p53, facteur de transcription, dans la mort induite par l'ABT-737. Pour cela, nous avons continué notre étude dans la lignée cellulaire issue du cancer du côlon HCT116 dont il existe plusieurs lignées isogéniques : HCT116 p21$^{-/-}$, HCT116 p21$^{-/-}$/Bax$^{-/-}$, HCT116 p21$^{-/-}$/Puma$^{-/-}$ et HCT116 p53$^{-/-}$.

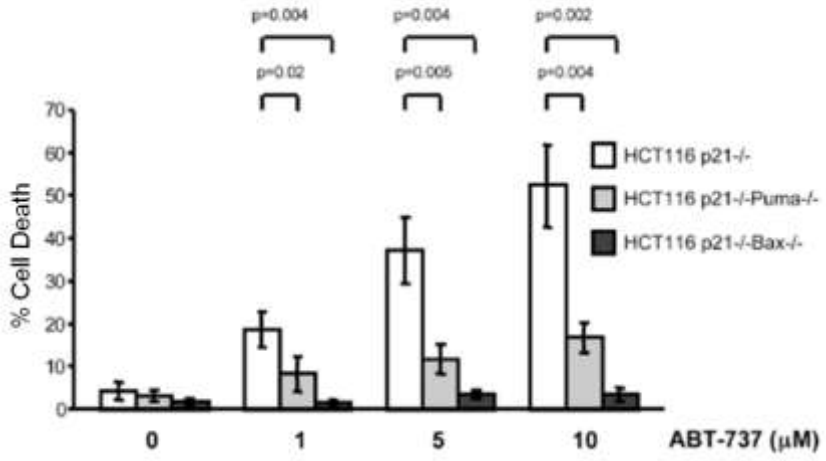


Figure 44 : La mort induite par l'ABT-737 dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ est dépendante de Bax et de Puma. Les cellules indiquées sur la figure sont traitées par l'ABT-737 aux différentes concentrations indiquées pendant 24h et la mort cellulaire est mesurée par comptage et marquage au trypan bleu. Les résultats présentés sont la moyenne de quatre expériences indépendantes (Gallenne *et al.*, 2009).

Dans un premier temps, nous avons démontré que p53, contrairement à E2F1, participe à l'induction de la mort par l'ABT-737 dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ ayant un p53 sauvage. De plus, la stabilisation de p53 par la Nutlin-3 (inhibiteur de MDM2) dans les cellules HCT116 ou l'introduction d'un p53 ectopique dans les cellules HCT116 p53$^{-/-}$, suffit à sensibiliser ces deux lignées cellulaires résistantes à l'ABT-737. L'ensemble de ces données nous permet d'avancer que p53 est un acteur majeur dans le déclenchement de la mort cellulaire par l'ABT-737. Nous nous sommes alors focalisés sur le rôle de p53 et nous avons montré que sa fonction transcriptionnelle n'était pas requise dans la mort cellulaire induite par l'ABT-737. Ces résultats suggèrent que l'activation des fonctions non-transcriptionnelles de p53 pourrait permettre de sensibiliser les cellules cancéreuses résistantes à ce BH3 mimétique.

1- p53, contrairement à E2F1, est un acteur majeur de l'apoptose induite par l'ABT-737, dans les cellules exprimant un p53 sauvage

1-1 p53 est impliqué dans la mort induite par l'ABT-737 mais pas E2F1 dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$

Nos résultats précédents indiquent que, dans les cellules U251, E2F1 est impliqué dans la mort induite par l'ABT-737 (cf à l'article). Nous avons alors déterminé si ce facteur de transcription pouvait être aussi impliqué dans l'apoptose déclenchée par l'ABT-737 dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$. Contrairement aux cellules U251, les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ possèdent un p53 sauvage fonctionnel. p53 pourrait jouer un rôle dans l'induction de la mort cellulaire par l'ABT-737. Pour tester ces hypothèses, nous avons diminué l'expression des protéines E2F1 et p53 avant traitement par l'ABT-737 dans les HCT116 p21$^{-/-}$ (figure 45). La transfection d'un siRNA p53 dans les HCT116 p21$^{-/-}$ diminue de 16% la mort cellulaire induite par l'ABT-737. En revanche, le siRNA E2F1 ne semble pas avoir d'effet dans ces conditions. La protéine p53 et non la protéine E2F1, pourrait donc être un acteur de la mort induite par l'ABT-737.

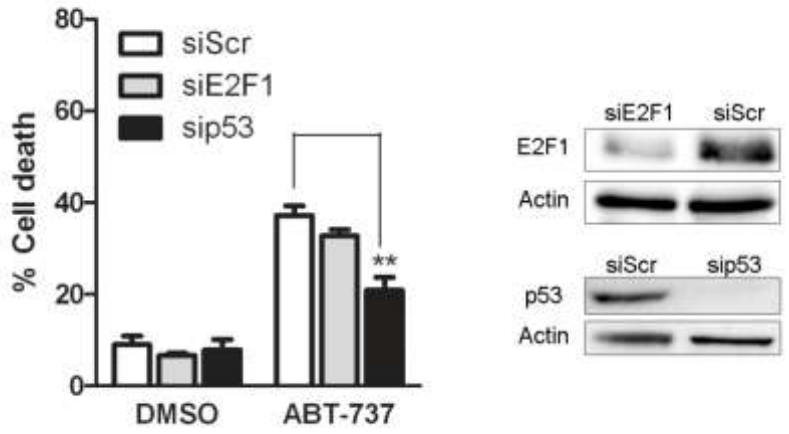


Figure 45 : p53, contrairement à E2F1, est impliqué dans la mort induite par l'ABT-737 dans les HCT116 p21$^{-/-}$. Les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ sont transfectées avec les siRNA indiqués. 48h plus tard, les cellules sont traitées par l'ABT-737 2µM ou par le DMSO pendant 24h. L'expression de p53 et E2F1 est analysée par western blot et la mort cellulaire par comptage et marquage au trypan bleu. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

1-2 La surexpression de p53 endogène dans les cellules HCT116 suffit à sensibiliser ces cellules à l'ABT-737

Le traitement des cellules HCT116 par l'ABT-737 n'a pas d'incidence sur la viabilité cellulaire contrairement aux cellules HCT116 p21$^{-/-}$ pour lesquelles on observe 50% de mortalité cellulaire (figure 46A). Nous nous sommes alors demandé si la surexpression de p53 pouvait permettre de sensibiliser ces cellules à l'ABT-737. Au préalable nous avons déterminé si la différence de sensibilité était due à la perte de la protéine p21 dans la lignée HCT116 p21$^{-/-}$. Pour évaluer l'implication de p21 dans la résistance des cellules à l'ABT-737, nous avons transfecté les cellules HCT116 par un siRNA p21 pendant 48h, avant de les traiter à l'ABT-737. La diminution de l'expression de la protéine p21 n'a pas d'effet sur la mort cellulaire induite par l'ABT-737 (figure 46B), suggérant que p21 n'est pas impliqué dans la résistance à la mort induite par l'ABT-737. les HCT116 p21$^{-/-}$, au-delà de la perte de la protéine p21, ont une expression de p53 beaucoup plus élevée que dans les HCT116. Cette augmentation d'expression a été montrée comme responsable de la plus forte sensibilité de ces cellules HCT116 p21$^{-/-}$ aux dommages à l'ADN (Ferrandiz *et al.*, 2009) (figure 46C). A noter que l'expression d'E2F1 est, en revanche, similaire entre les deux lignées. La surexpression de p53 dans la lignée cellulaire HCT116 p21$^{-/-}$ pourrait expliquer la sensibilité de ces cellules au traitement à l'ABT-737 supportant l'hypothèse que p53 serait un acteur majeur dans la mort induite par ce BH3 mimétique.

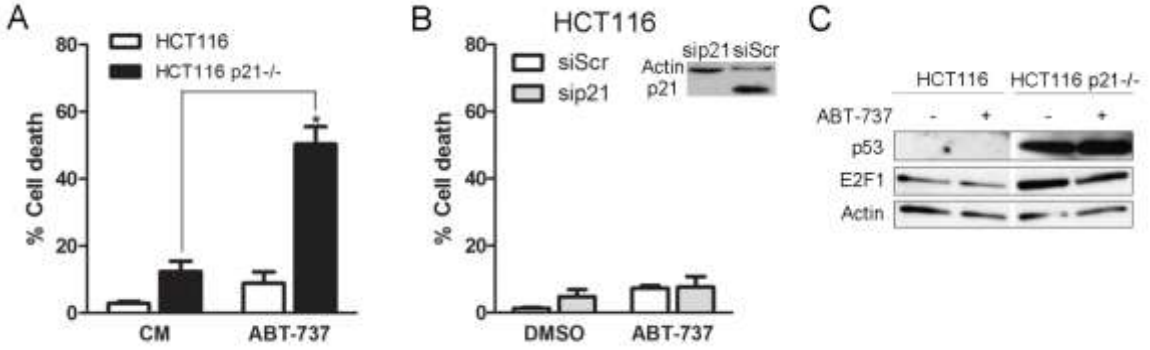


Figure 46 : La diminution de p21 dans les cellules HCT116 ne sensibilise pas celles-ci à l'ABT-737. (A) Les cellules HCT116 et HCT116 p21$^{-/-}$ sont traitées par l'ABT-737 2µM ou par le DMSO pendant 24h et la mort cellulaire est mesurée par comptage et marquage au trypan bleu. (B) Les cellules HCT116 sont transfectées avec les siRNA indiqués. 48h plus tard, les cellules sont traitées par l'ABT-737 2µM ou par le DMSO pendant 24h. L'expression de p21 est analysée par western blot et la mort cellulaire par comptage et marquage au trypan bleu. (C) Les cellules HCT116 et HCT116 p21$^{-/-}$ sont traitées par l'ABT-737 2µM ou le DMSO pendant 24h et l'expression de p53 et E2F1 est analysée par western blot.

Afin de déterminer l'implication de p53 dans la sensibilité des cellules cancéreuses à l'ABT-737, des expériences de surexpression de p53 endogène ont été réalisées dans les cellules HCT116 résistantes à l'ABT-737. Pour surexprimer la protéine p53 nous avons utilisé la Nutlin-3 qui est un inhibiteur de l'ubiquitine ligase MDM2 et qui va entrainer la stabilisation et donc l'accumulation de p53. Cette accumulation est vérifiée par western blot (figure 47A). Comme constaté précédemment, l'ABT-737 en traitement seul n'induit pas d'apoptose dans les cellules HCT116. En revanche, lorsqu'on traite simultanément les cellules à l'ABT-737 et à la Nutlin-3, on observe une mort cellulaire de 40% (figure 47B). A noter que des résultats préliminaires (non présentés ici) avaient montré que la Nutlin-3 n'induisait pas, à elle seule, de mort cellulaire dans ces cellules. Cette accumulation de p53, lors du traitement ABT-737/Nutlin-3, ne s'accompagne pas d'une augmentation de deux de ces cibles Puma et Bax impliqués dans la mort induite par l'ABT-737 (figure 47A). Ces résultats suggèrent qu'une augmentation de p53 est suffisante pour sensibiliser les HCT116 à l'ABT-737. La Nutlin-3 ne ciblant pas directement p53 mais étant un inhibiteur de MDM2, son activité n'est pas spécifiquement ciblée sur p53. Elle peut aussi, entre autres, activer E2F1. Ainsi pour confirmer le rôle de p53, les expériences sont reproduites après transfection de siRNA ciblé sur p53 (figure 47). La diminution de l'expression de p53 est vérifiée par western blot sous les différents traitements. Une protection significative contre la mortalité cellulaire induite par l'ABT-737 et la Nutlin-3 est observée lorsque l'expression de p53 est diminuée par RNA interférents, la mortalité étant alors réduite à 20%.

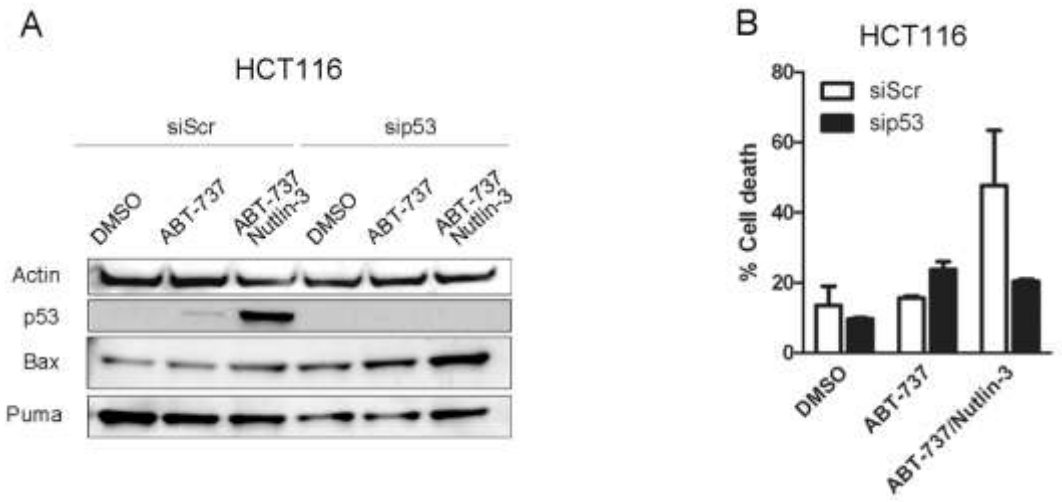


Figure 47 : La surexpression de p53 dans les cellules HCT116 sensibilise celles-ci à l'ABT-737. Les cellules HCT116 sont transfectées avec les siRNA indiqués. 48h plus tard, les cellules sont traitées par l'ABT-737 2µM, par le DMSO ou par la combinaison de l'ABT-737 2µM et la Nultin-3 10µM pendant 24h. L'expression de p53, Puma et Bax est analysée par western blot (A) et la mort cellulaire par comptage et marquage au trypan bleu (B).

Ces résultats confirment le rôle de p53 dans la sensibilisation à l'ABT-737 des HCT116 par la Nutlin-3. Ainsi l'augmentation de p53 dans les cellules HCT116 serait suffisante pour induire leur mort cellulaire en réponse à l'ABT-737.

1-3 La surexpression de p53 ectopique dans les cellules HCT116 p53$^{-/-}$ suffit à sensibiliser ces cellules à l'ABT-737

La lignée cellulaire isogénique HCT116 p53$^{-/-}$ n'est pas sensible au traitement à l'ABT-737 à 2µM pendant 24h, une mortalité de seulement 5% étant observée avec ou sans traitement (figure 48B). Cette résistance à l'ABT-737 pourrait être due à l'absence de p53 dans cette lignée cellulaire. Pour confirmer cette hypothèse, des expériences de complémentation sont effectuées à l'aide d'un vecteur exprimant la protéine p53, fusionnée à l'étiquette flag dans les cellules HCT116 p53$^{-/-}$ (figure 48). Les cellules transfectées par le vecteur d'expression de p53 ont une mortalité significativement augmentée sous ABT-737, atteignant 20% de mort cellulaire. L'introduction de p53 dans les cellules HCT116 p53$^{-/-}$ est suffisante pour sensibiliser ces cellules à l'ABT-737 confirmant ainsi le rôle essentiel de p53 dans la mort induite par l'ABT-737.

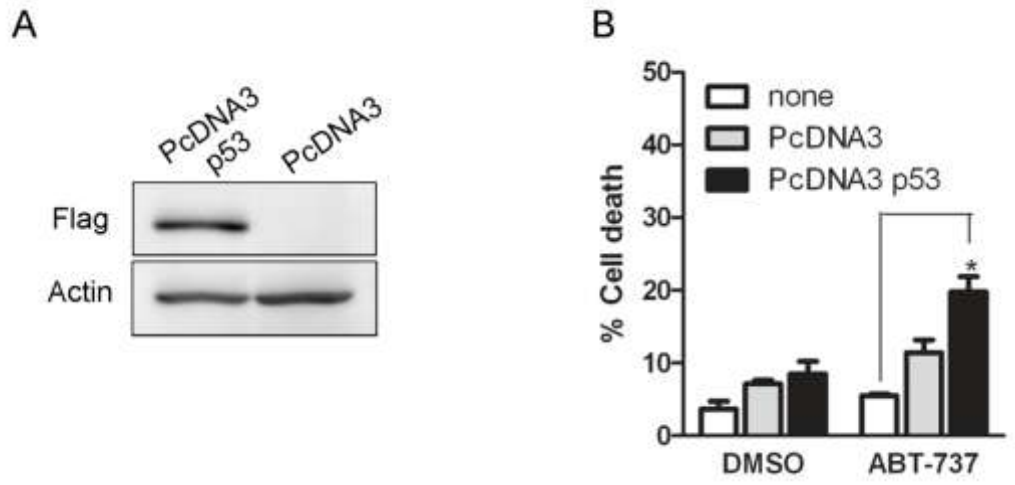


Figure 48 : La surexpression de p53 dans les cellules HCT116 p53$^{-/-}$ sensibilise celles-ci à l'ABT-737. (A) Les cellules HCT116 p53$^{-/-}$ sont transfectées par le vecteur contrôle PcDNA3 ou par le vecteur PcDNA3 p53 Flag pendant 4h. 24h plus tard, les cellules sont traitées par l'ABT-737 2µM ou le DMSO pendant 24h. L'expression de p53 est analysée par western blot (A) et la mort cellulaire par comptage et marquage au trypan bleu (B).

2- L'activité transcriptionnelle de p53 n'est pas requise dans les processus apoptotiques induits par l'ABT-737

Nous avons voulu déterminer si le rôle de p53 engage son activité, la plus étudiée, de facteur de transcription. En effet, l'apoptose induite par l'ABT-737 dans les HCT116 p21$^{-/-}$ est médiée par Bax et Puma, deux gènes cibles de p53 qui pourraient expliquer la sensibilisation au BH_3 mimétique (Gallenne *et al.*, 2009).

2-1 Bax et Puma ne sont pas induits sous ABT-737 dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$

Le traitement des cellules HCT116 par la Nutlin-3, stabilise p53 et sensibilise ces cellules à l'ABT-737 (figure 47). En revanche, par western blot, on n'observe aucune augmentation de Bax ou Puma pourtant impliqués dans la mort induite par l'ABT-737. De même une diminution de l'expression de p53 protège de la mort induite par l'ABT-737/Nutlin-3 mais ne diminue pas l'expression de Bax ou Puma (figure 47). Le rôle de p53 dans la mort induite par l'ABT-737 ne semble pas dû à la surexpression des protéines Bax et Puma. Pour confirmer cette hypothèse, des analyses protéiques par western blot ont été effectuées dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ et de nouveau, l'expression des protéines Bax et Puma n'est pas modifiée sous ABT-737 (figure 49A). Ainsi, la sensibilisation à l'ABT-737 ne passerait pas par une modification de l'expression de Bax et Puma, acteurs majeurs du processus apoptotique induit par le BH3 mimétique. Les résultats observés suggèrent alors, l'absence d'implication de la voie transcriptionnelle de p53, en réponse à l'ABT-737.

2-2 L'activité transcriptionnelle de p53 n'est pas induite sous ABT-737 dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$

Afin d'étudier la fonction transcriptionnelle de p53 sous ABT-737 de façon plus large, deux approches ont été effectuées. Une première approche consistait à des mesures d'activité du vecteur d'expression luciférase mis sous contrôle d'un promoteur p53RE (Panomics) contenant 5 boites d'élément de réponses consensus synthétiques à p53 et répondant au facteur de transcription. En parallèle de l'ABT-737, les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ ont été traitées à l'étoposide (inhibiteur de la topoisomérase II humaine) comme contrôle positif. En effet, l'apoptose, déclenchée par l'étoposide en réponse aux dommages à l'ADN, dépend de l'activité transcriptionnelle de p53. Les mêmes expériences ont aussi été réalisées dans les cellules HCT116 p53$^{-/-}$ comme contrôle négatif. Comme attendu, lorsqu'on traite les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ par l'étoposide, l'activité de la luciférase sous contrôle du promoteur p53RE est plus de 2.5 fois supérieure à celle observée lorsqu'on traite simplement avec du DMSO (figure 49B). En revanche, l'ABT-737 ne modifie pas l'activité luciférase dans les HCT116 p21$^{-/-}$ (figure 49B). Dans les cellules déficientes en p53, l'activité luciférase est nulle dans toutes les conditions, démontrant bien une spécificité du promoteur p53RE pour la protéine p53. Une deuxième approche pour l'étude de l'activité transcriptionnelle de p53, consistait à inhiber l'activité transcriptionnelle de p53 par l'utilisation d'un composé synthétique, la pifithrine α (Komarov *et al.*, 1999). La pifithrine α a été utilisée à 40µM, concentration qui permet d'inhiber l'expression de Puma dans les HCT116 p21$^{-/-}$ sous étoposide. Lorsqu'on traite conjointement à l'ABT-737 et à la pifithrine α, la mort cellulaire induite par l'ABT-737 demeure inchangée, malgré l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de p53 (figure 49C).

L'ensemble de ces données laisse à penser que l'activité transcriptionnelle de p53 ne serait pas requise dans les mécanismes de sensibilité à l'ABT-737 des HCT116. La protéine p53 est donc un acteur majeur de la mort cellulaire induite par l'ABT-737 mais son action, dans ces processus apoptotiques, serait non-transcriptionnelle.

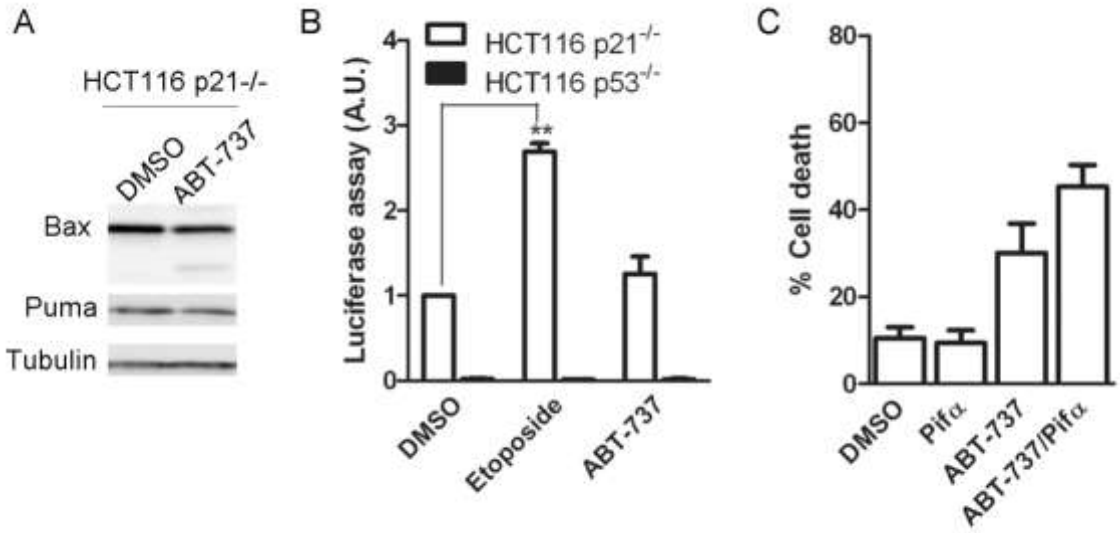


Figure 49 : L'activité transcriptionnelle de p53 n'est pas impliquée dans la mort cellulaire induite par l'ABT-737. (A) Les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ sont traitées par l'ABT-737 2µM ou par le DMSO pendant 24h et l'expression de Bax et Puma est analysée par western blot. (B) Les cellules HCT116 p53$^{-/-}$ et HCT116 p21$^{-/-}$ sont transfectées par le vecteur luciférase contrôlé par un promoteur contrôle ou par le promoteur p53RE pendant 4h. 24h plus tard, les cellules sont traitées par le DMSO, l'étoposide 50µM ou l'ABT-737 2µM pendant 24h. L'activité luciférase est ensuite mesurée et le rapport entre les résultats obtenus avec le promoteur contrôle et les résultats obtenus avec le promoteur p53RE est présenté. (C) Les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ sont traitées par le DMSO, la pifithrine α (pif α) 40µM, l'ABT-737 2µM, ou par la combinaison de l'ABT-737 2µM et la pifithrine α pendant 24h. La mort cellulaire est analysée par comptage et marquage au trypan bleu.

Discussion

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'implication de deux facteurs de transcription p53 et E2F1 dans la réponse à l'ABT-737 dans les cellules cancéreuses. p53 est un facteur de transcription présent à un faible niveau dans les cellules saines. Lors de signaux de stress associés à la majorité des cancers, notamment les dommages à l'ADN et l'activation d'oncogènes, p53 est activé (Giono and Manfredi, 2006). Une fois activé, p53 peut déclencher différentes réponses cellulaires telles que l'apoptose ou l'arrêt de prolifération. La famille E2F est une seconde famille de facteurs de transcription qui participe au devenir de la cellule en général et en particulier à la progression tumorale (Attwooll *et al.*, 2004). Cette famille de protéines, au-delà de leur activité dans le cycle cellulaire, participe à de nombreux processus biologiques et notamment l'apoptose pour E2F1.

Les voies de signalisation pRb/E2F1 et p53 sont dérégulées dans la majorité des cancers soulignant leur rôle crucial dans la progression du cycle cellulaire et dans la viabilité (Hollstein *et al.*, 1991; Arima *et al.*, 2008). De nombreuses interactions, en amont et aval de ces deux facteurs de transcription, existent, permettant ainsi une coordination et une complémentarité qui influencent le devenir de la cellule et marquent un frein dans le développement tumoral (Polager and Ginsberg, 2009). En amont, p53 et E2F1 peuvent être activés, via des régulateurs communs, par les mêmes stimuli (figure 50). Ainsi, lors de dommages à l'ADN, p53 et E2F1 sont tous les deux phosphorylés par ATM et par les kinases des points de contrôle du cycle cellulaire, Chk1 et Chk2, contribuant ainsi à leur stabilisation (Banin *et al.*, 1998; Chehab *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001; Stevens *et al.*, 2003). De même, comme décrit précédemment, MDM2 régule les deux voies pRb/E2F1 et p53. MDM2 favorise la dégradation de pRb et p53, en revanche, il stabilise E2F1 (Marine *et al.*, 2006; Sdek *et al.*, 2005; Uchida *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). De plus, E2F1 lors de dommages à l'ADN peut activer p53 grâce à la protéine $p14^{ARF}$, cible directe d'E2F1 (Bates *et al.*, 1998). $p14^{ARF}$ activé, stabilise p53 en inhibant son interaction avec MDM2. Enfin, en aval de p53 et E2F1 des protéines pro-apoptotiques codées par des gènes cibles de ces deux facteurs de transcription, coopèrent pour induire la mort cellulaire. C'est en particulier le cas pour les protéines de la famille Bcl-2 notamment Puma, Noxa, Bim et Bax (Hershko and Ginsberg, 2004; Miyashita and Reed, 1995; Nakano and Vousden, 2001; Oda *et al.*, 2000).

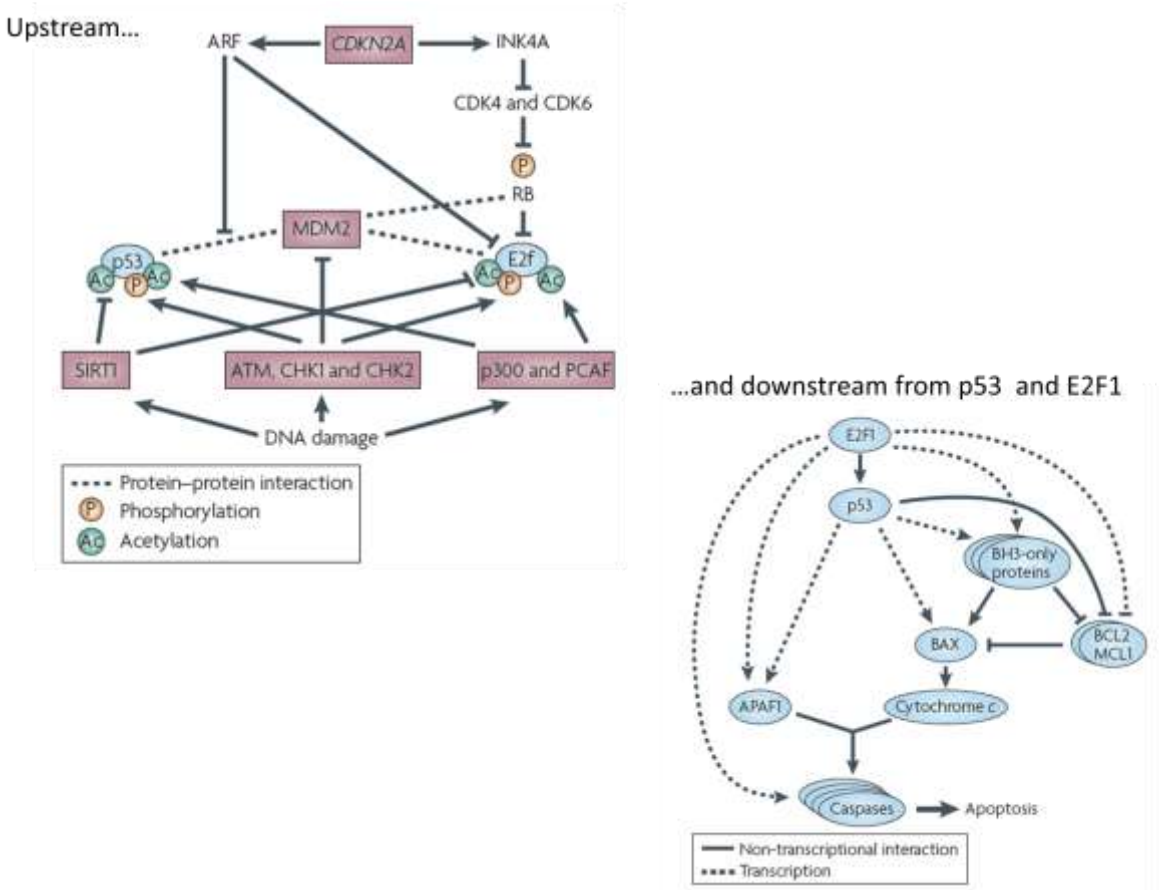


Figure 50 : Interconnexion des deux voies de signalisation p53 et pRb/E2F1 en amont et en aval des deux facteurs de transcription (Polager and Ginsberg, 2009)**.**

L'apoptose est souvent inhibée dans les cancers. Ceci est en partie dû à une surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bcl-2 ou Bcl-xL (Fesik, 2005; Warr and Shore, 2008). L'ABT-737 a été développé dans l'optique de déclencher l'apoptose dans les cellules cancéreuses, en inhibant l'activité pro-apoptotique de Bcl-2 et Bcl-xL (Oltersdorf *et al.*, 2005). Cependant, de nombreux cancers sont résistants à ce BH3 mimétique utilisé en agent simple. L'étude des voies de signalisation induites lors du traitement par l'ABT-737 est intéressante pour trouver au mieux les moyens d'augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses à l'ABT-737. Les BH3-seul ont un rôle majeur dans le déclenchement de la mort induite par l'ABT-737. En effet, l'ABT-737 va inhiber les complexes entre les BH3-seul et les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 au profit des complexes entre les BH3-seul et les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Chonghaile and Letai, 2008; Gallenne *et al.*, 2009). Ainsi, les voies de signalisation, régulant l'activité de pRb/E2F1 et p53, pourraient avoir un impact essentiel dans le traitement à l'ABT-737, en modulant l'expression de ces BH3-seul.

Partie I : Induction de Noxa dépendante de pRb et E2F1 sous ABT-737

Dans notre travail, nous montrons, pour la première fois que, sous ABT-737, la voie pRb/E2F1 est activée, induisant la surexpression de la protéine Noxa au niveau transcriptionnel, conduisant à une amplification de la mort cellulaire dépendante des caspases et médiée par Bax mais indépendamment de p53. Noxa serait alors un acteur clé de l'apoptose induite par l'ABT-737, la mise sous silence de celui-ci entrainant une diminution par un facteur deux de la mort cellulaire. Dans notre étude, lors de traitement à l'ABT-737, Puma n'est pas surexprimé et sa mise sous silence ne modifie pas la viabilité des cellules. Nos résultats précédents avaient démontré un rôle de Puma. Ainsi, dans un contexte p53 muté, ce serait Noxa et non Puma qui jouerait un rôle dans la mort induite par l'ABT-737. En accord avec nos résultats, deux récentes études décrivent l'augmentation de Noxa par les BH3 mimétiques (Albershardt *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2011).

Un des rôles essentiels de Noxa est d'inhiber Mcl-1. Noxa induit, se lie à Mcl-1 ce qui a pour conséquence d'inhiber celui-ci, mais aussi de favoriser sa dégradation par le protéasome (Czabotar *et al.*, 2007). L'ABT-737 ne cible pas Mcl-1 qui est un des freins majeurs de l'efficacité du BH3 mimétique. Un fort niveau de Mcl-1 corrèle avec une résistance des cellules cancéreuses à l'ABT-737 (van Delft *et al.*, 2006; Tagscherer *et al.*, 2008). L'induction de Noxa pourrait alors favoriser la mort cellulaire induite par l'ABT-737 en inhibant l'activité anti-apoptotique de Mcl-1, voir même en activant directement Bak/Bax (Du *et al.*, 2011). Ainsi, l'ABT-737 pourrait induire l'activation de l'apoptose par deux mécanismes. Une première action rapide et directe qui ciblerait Bcl-2 et Bcl-xL en inhibant leur activité anti-apoptotique et une deuxième action plus lente et indirecte qui inhiberait Mcl-1 via la protéine Noxa. À noter que de récentes études montrent que Noxa peut aussi se lier à Bcl-xL et inhiber celui-ci (Lopez *et al.*, 2010; Hagenbuchner *et al.*, 2010). Même si cette possibilité d'interaction entre Noxa et Bcl-xL doit être gardée en mémoire, il est peu probable que ce soit cette fonction de Noxa qui soit engagée dans la mort induite par l'ABT-737. En effet, l'ABT-737 se lie à Bcl-xL sur le même site d'interaction que Noxa pour inhiber son activité pro-apoptotique. Noxa peut donc difficilement se fixer à Bcl-xL en même temps que l'ABT-737. On pourrait cependant imaginer qu'il pourrait renforcer l'action inhibitrice de Bcl-2/Bcl-xL de l'ABT-737.

Pour poursuivre cette étude et vérifier si l'action pro-apoptotique de Noxa est due à sa capacité à lier Mcl-1 ou Bcl-xL, il serait intéressant d'étudier les possibles interactions entre Noxa et ces deux protéines anti-apoptotiques. De plus, nous pourrions évaluer l'impact d'une diminution de l'expression de Mcl-1 sur la sensibilité à l'ABT-737. En effet, si la fonction pro-apoptotique de Noxa consiste à diminuer Mcl-1, alors la mise sous silence de

Noxa et Mcl-1 devrait avoir un effet similaire sur la mort cellulaire que la mise sous silence de Noxa ou Mcl-1 seuls.

Nos résultats indiquent que cette surexpression de Noxa est médiée par E2F1, facteur de transcription qui a été identifié comme pouvant déclencher l'apoptose en activant des gènes cibles pro-apoptotiques, en particulier dans les cellules cancéreuses possédant un p53 muté (Hershko and Ginsberg, 2004; Hao *et al.*, 2007). Dans les cellules NIH3T3, E2F1 se fixe sur les promoteurs des gènes codant les BH3-seul Puma et Noxa et induit l'apoptose. L'inhibition de Noxa et Puma a un effet négatif sur l'apoptose induite par E2F1 (Hershko and Ginsberg, 2004). Dans notre étude, lorsqu'on surexprime E2F1, on sensibilise les cellules cancéreuses à l'ABT-737 avec une augmentation de l'expression de Noxa. En revanche, lorsqu'on diminue l'expression d'E2F1, l'induction de Noxa et la mort cellulaire sont inhibées. E2F1 serait alors nécessaire pour déclencher une surexpression de Noxa et aurait un rôle pro-apoptotique. Ce rôle pro-apoptotique d'E2F1 a été également décrit, lors de l'induction de la mort cellulaire par les inhibiteurs de HDAC. Dans les cellules HCT116 $p53^{-/-}$, traitées au SAHA ou TSA, E2F1 est présent sur le promoteur de Bim et responsable de l'induction transcriptionnelle de ce BH3-seul, permettant le déroulement de processus apoptotiques (Zhao *et al.*, 2005). Par ailleurs, E2F1 est aussi connu pour être un répresseur de Mcl-1 (Croxton *et al.*, 2002). Au-delà de son activité d'induction de Noxa, E2F1 pourrait aussi réprimer Mcl-1. Cependant, dans notre étude, nous n'observons pas de modification de l'expression de Mcl-1 suite à l'extinction d'E2F1 (résultats non présentés ici).

Ces résultats suggèrent que l'apoptose induite par l'ABT-737 engage la fonction transcriptionnelle d'E2F1. Nous avons, alors, choisi d'analyser l'expression de gènes cibles d'E2F1 par PCR quantitative. Une étude plus générale sur la fonction de facteur de transcription d'E2F1 avait été envisagée par des tests d'activité luciférase. Cependant, ceux-ci se sont avérés difficilement interprétables. En effet, l'outil à notre disposition est un vecteur d'expression de la luciférase, sous contrôle d'un promoteur E2F-RE (avec 5 boites d'élément de réponses consensus synthétiques aux E2Fs). Ce promoteur n'était donc pas uniquement reconnu par E2F1, mais par toutes les protéines de la famille E2F. On ne peut discriminer spécifiquement avec cet outil les fonctions d'E2F1. Les cellules proliférant toujours sous ABT-737, on aura une activité continuelle des facteurs de transcription E2Fs et donc potentiellement, une forte activité luciférase. Même si, sous ABT-737, E2F1 active des gènes pro-apoptotiques, cette activité serait masquée par la forte activité luciférase déjà enregistrée à cause de l'activité des E2Fs dans la prolifération. De plus, E2F1 peut induire, selon le contexte, deux processus biologiques qui peuvent sembler en contradiction, la prolifération et l'apoptose. Il peut donc être un oncogène ou un suppresseur de tumeur. Les gènes cibles impliqués dans la prolifération et ceux impliqués dans l'apoptose ne seront pas forcément induits au même moment et de la même façon. Il semble alors difficile d'étudier la fonction

de facteur de transcription d'E2F1 simplement avec un vecteur d'expression sous contrôle d'un promoteur contenant la séquence consensus reconnue par les E2Fs répétée cinq fois. Pour l'ensemble de ces raisons, l'approche générale de la fonction de facteur de transcription d'E2F1 a été abandonnée au profit d'une étude spécifique des gènes cibles pro-apoptotiques d'E2F1. Nous avons pu alors démontrer que Noxa, mais ni Puma ni la caspase 7, n'étaient activés lors de traitement à l'ABT-737. En parallèle, nous avons aussi étudié le niveau d'ARN de p73, cible pro-apoptotique majeure d'E2F1 qui peut lui aussi induire Noxa et le niveau d'ARN de la cycline A2, cible majeure d'E2F1 dans le cycle cellulaire. Lors de traitement à l'ABT-737, l'expression de la cycline A2 demeure inchangée. En revanche, p73 est surexprimé. Sous ABT-737, Noxa et p73 sont induits transcriptionnellement. Noxa pourrait être régulé directement par E2F1 ou indirectement via la voie de signalisation E2F1-p73-Noxa. Des expériences de ChIP, ont permis de montrer que, sous ABT-737, E2F1 était présent sur les promoteurs de Noxa et p73, confortant son implication dans la transcription de ces gènes. Ainsi, l'induction de l'expression de Noxa est, au moins en partie, due à une fixation directe d'E2F1 sur son promoteur.

L'action transcriptionnelle d'E2F1 nécessite sa libération de pRb (Black and Azizkhan-Clifford, 1999; Dick, 2007). L'activation d'E2F1 par l'ABT-737 pourrait être due à une phosphorylation de pRb conduisant à une libération d'E2F1 qui activerait l'apoptose. Dans notre étude, la phosphorylation de pRb ne semble pas modifiée sous ABT-737. À noter que le traitement par l'ABT-737 n'a pas non plus d'effet sur le cycle cellulaire, les cellules sont toujours en phase proliférative et pRb hyperphosphorylé. Cependant, cette étude s'est portée uniquement sur deux phosphorylations, les phosphorylations sur les sérines 807-811. Il se peut que, sous ABT-737, des modifications de phosphorylation de pRb apparaissent, mais sur des résidus différents, pRb possédant 21 sites possibles de phosphorylation. Une phosphorylation qu'il pourrait être particulièrement judicieux d'étudier est la phosphorylation sur la sérine 612. En effet, contrairement aux autres sites de phosphorylation qui sont majoritairement des cibles des CDK, cette sérine peut être phosphorylée par les kinases Chk1 et Chk2, lors de dommages à l'ADN, et provoquer un arrêt du cycle (Inoue *et al.*, 2007). Il n'existe pas d'anticorps commerciaux reconnaissant spécifiquement la forme pRb phosphorylée en sérine 612.

Par ailleurs, en accord avec de récentes publications, nous avons démontré que la forme phosphorylée de pRb était toujours capable d'interagir avec E2F1 (Cecchini and Dick, 2011; Ianari *et al.*, 2009). Ainsi, la phosphorylation de pRb qui a été décrite comme participant à la régulation du cycle cellulaire, jouerait aussi un rôle dans l'induction de la mort cellulaire, sans pour autant dissocier le complexe pRb/E2F1 (Dynlacht *et al.*, 1997; Ianari *et al.*, 2009). Sous dommages à l'ADN, lorsque pRb est hypophosphorylé, en phase G0-G1, il a été observé qu'il participait à la formation de complexes transcriptionnels inhibiteurs E2F1-

pRb-HDAC. Ceci induit une inhibition des gènes cibles d'E2F1 impliqués dans le cycle cellulaire favorisant un arrêt du cycle. En revanche, sous dommages à l'ADN, lorsque pRb est hyperphosphorylé, dans les cellules en prolifération, celui-ci va participer à la formation de complexes transcriptionnels actifs E2F1-pRb-P/CAF. Ceci induit une activation des gènes cibles d'E2F1 impliqués dans l'apoptose favorisant la mort cellulaire (Ianari *et al.*, 2009). La phosphorylation de pRb pourrait donc avoir un rôle dans l'induction de l'apoptose, mais celui-ci ne serait pas de dissocier pRb d'E2F1.

Une deuxième modification post-traductionnelle de pRb importante dans la mort cellulaire est son clivage par les caspases. Or, l'activation de Noxa par E2F1 est dépendante des caspases. Les caspases pourraient alors participer à activer E2F1 en clivant pRb et libérant ainsi E2F1. Dans notre étude, lors de traitement à l'ABT-737, pRb est clivé au niveau de deux sites sur les trois présents dans la protéine : le site DEAD en C-terminal et le site DSID vers le centre de la protéine. Ces clivages donnent naissance à trois formes tronquées $p100^{Rb}$, $p68^{Rb}$ et $p48^{Rb}$. Les deux sites de clivage, DEAD et DSID, sont décrits comme étant reconnus par les deux caspases 3 et 7 qui cliveraient de manière séquentielle au niveau du site DEAD d'abord puis au niveau du site DSID ensuite, donnant deux formes tronquées $p68^{Rb}$ et $p48^{Rb}$ (Fattman *et al.*, 2001). Le clivage de pRb par la caspase 3 a été précédemment décrit comme concomitant avec une induction de l'apoptose. L'hypothèse alors avancée, serait que les formes clivées de pRb libéreraient E2F1 qui pourrait ainsi induire l'apoptose (Boutillier *et al.*, 2000; Katsuda *et al.*, 2002). Cependant, aucune expérience étudiant l'interaction d'E2F1 avec la forme $p68^{Rb}$, telle que des immunoprécipitations, n'a été effectuée. De plus, la forme clivée $p68^{Rb}$ conserve les deux sites de liaison à E2F1, le site général et le site spécifique (Dick and Dyson, 2003). Lors de notre étude, nous avons pu démontrer que, sous ABT-737, la forme $p68^{Rb}$ était toujours capable de s'associer à E2F1. Cette dernière découverte soulève plusieurs questions. Tout d'abord, nous avons observé que, sous ABT-737, pRb était toujours hyperphosphorylé. Est-ce aussi le cas pour les formes tronquées ? Sont-elles aussi phosphorylées ? L'interaction observée entre E2F1 et $p68^{Rb}$ est-elle aussi observée avec d'autres protéines de la famille E2Fs, en particulier E2F2 et E2F3, très proche d'E2F1 dans leur fonction dans le cycle cellulaire, et quel type d'interaction est alors engagé ? Enfin, E2F1 peut interagir avec pRb au niveau du site général aux E2Fs ou au niveau de son site spécifique de liaison à pRb. Ces deux sites de liaison sont conservés dans la forme $p68^{Rb}$. E2F1 interagit-il avec la forme $p68^{Rb}$ de pRb au niveau des deux sites de liaison ou au niveau d'un seul et dans ce cas lequel ?

Les résultats indiquent que les formes clivées de pRb ne sont pas uniquement une conséquence de la mort cellulaire, mais auraient un rôle dans l'apoptose (Tan *et al.*, 1997; Chau *et al.*, 2002, 2004). Un autre site de clivage reconnu par la caspase 9, situé en N-

terminal, peut générer une forme tronquée de pRb, $p76^{Rb}$. Cette forme tronquée de pRb qui garde le site de liaison à E2F1, a été décrite comme protégeant les cellules de l'apoptose dépendante de p53 par un mécanisme inconnu (Le Floch *et al.*, 2010). Les formes $p68^{Rb}$ et $p48^{Rb}$ pourraient alors, de la même manière, avoir un rôle dans la mort cellulaire induite par l'ABT-737, en particulier, $p68^{Rb}$ qui pourrait participer à l'induction de Noxa, en association avec E2F1. Cette hypothèse est en accord avec le fait que l'induction de Noxa est dépendante des caspases et d'E2F1 et qu'E2F1 est complexé avec $p68^{Rb}$, sous ABT-737. Afin de déterminer si pRb total avait un rôle pro-apoptotique nous avons tenté de transfecter pRb fusionné à la GFP dans différentes lignées cellulaires sans résultats concluants. Il est possible que les formes tronquées soient plus facilement transfectables, mais, même si c'est le cas, cette transfection ne pourra pas être comparée à la transfection d'un pRb total. L'étude restera donc partielle. Il serait malgré tout intéressant de tenter de transfecter le forme tronquée $p68^{Rb}$. L'ensemble de ces résultats suggère que, malgré le clivage de pRb par les caspases, pRb reste complexé avec E2F1. Celui-ci pourrait alors participer avec E2F1 à activer l'apoptose et induire Noxa.

Pour étudier le possible rôle de pRb dans la mort induite par l'ABT-737 nous avons alors diminué son expression par ARN interférence. La diminution de l'expression de pRb affecte l'induction de Noxa et la mort cellulaire. pRb, avec E2F1, semble alors nécessaire pour déclencher une surexpression de Noxa, il aurait un rôle pro-apoptotique. Le fait que pRb puisse participer à des complexes transcriptionnels actifs a déjà été décrit. pRb a tout d'abord été montré comme interagissant avec des facteurs de transcription spécifiques de la différentiation et participant à l'activation de gènes cibles (Charles *et al.*, 2001; Gery *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2001). Plus récemment, pRb a été décrit comme pouvant avoir un rôle pro-apoptotique et que, dans ce cas, sa présence est indispensable à l'induction des cibles pro-apoptotiques d'E2F1 (Ianari *et al.*, 2009). La diminution de l'expression de pRb par shRNA, diminue la mortalité cellulaire, sous traitement à la doxorubicine. Cette diminution de la mortalité s'accompagne d'une diminution de l'expression des gènes cibles d'E2F1 notamment p73. Ainsi, la libération d'E2F1 par pRb, pour permettre l'induction de ces gènes cibles, ne serait pas toujours nécessaire. Au contraire, pRb pourrait participer à des complexes transcriptionnels actifs et favoriser ainsi l'apoptose. Cette hypothèse est en accord avec les résultats de ChIP obtenus lors de l'étude de la fixation de pRb et E2F1 sur les promoteurs Noxa et p73. En effet, la fixation d'E2F1 sur le promoteur de Noxa et p73, s'accompagne de la fixation de pRb. Ces résultats rejoignent les travaux d'A. Ianari et al concernant la participation de pRb aux complexes transcriptionnels actifs présents sur les gènes pro-apoptotiques, cibles d'E2F1 (Ianari *et al.*, 2009). La protéine pRb aurait donc un rôle essentiel dans l'induction des gènes cibles d'E2F1, sous ABT-737. En revanche, nous

ignorons si la fixation de pRb au promoteur de Noxa et p73, est dépendante ou non d'E2F1. Par ailleurs, le rôle de pRb dans la transcription semble spécifique à certains gènes seulement, en particulier les gènes pro-apoptotiques. Dans notre étude, l'occupation du promoteur du gène PLK1 cible d'E2F1 qui code pour une serine/thréonine kinase impliquée dans la transition G2/M, a aussi été étudiée. Sous ABT-737, nous retrouvons la présence d'E2F1, mais pas celle de pRb sur ce promoteur. En revanche, l'étude d'A. Ianari et al a mis en évidence non seulement, la présence de pRb sur les promoteurs des gènes pro-apoptotiques, mais aussi sur le promoteur de la cycline A2 impliquée dans le cycle cellulaire (Ianari *et al.*, 2009). Cependant, pour la cycline A2, sous doxorubicine, E2F1 et pRb semblent présents dans un complexe répressif. Cette différence entre les deux études peut s'expliquer par le fait que nous ne sommes pas dans les mêmes cellules et que nous n'utilisons pas le même traitement. De plus, selon le contexte, pRb n'est pas présent avec les mêmes modifications post-traductionnelles et celles-ci semblent avoir un fort impact sur la fonction transcriptionnelle de pRb (Ianari *et al.*, 2009). pRb est présent sur le promoteur de la cycline A2 lorsqu'il est sous forme hypophosphorylée. Dans notre cas, nous sommes en présence de pRb sous forme totale et tronquée, et hyperphosphorylé. Alors que l'importance de pRb dans l'induction des gènes pro-apoptotiques semble se confirmer, son rôle dans l'induction des gènes impliqués dans le cycle reste ambigu.

Par ailleurs, les anticorps à disposition pour l'étude de pRb peuvent reconnaître les différentes formes tronquées de pRb, en revanche, ils ne discriminent pas la forme sauvage des formes tronquées. Il est donc difficile d'étudier la localisation de $p68^{Rb}$ et $p48^{Rb}$ et de savoir si c'est la forme tronquée ou la forme sauvage qui est présente sur le promoteur de Noxa et de p73, sous ABT-737, lors des expériences de ChIP. Des expériences de gel retard sont, cependant, à envisager pour déterminer quelle forme de pRb est impliquée dans l'induction des gènes codant Noxa et p73. Enfin, E2F1 et pRb semblent participer à un complexe transcriptionnel actif et il est fort probable que d'autres protéines soient impliquées dans ce complexe, en particulier des acétylases tel que P/CAF, connu pour avoir un rôle critique dans l'induction des gènes pro-apoptotiques cibles d'E2F1, sous dommages à l'ADN (Ianari *et al.*, 2004; Pediconi *et al.*, 2003). Il serait donc particulièrement intéressant d'identifier les complexes impliqués dans l'induction de ces gènes et le rôle de pRb dans le choix et le recrutement des partenaires, plus précisément, d'identifier et de comparer les partenaires du complexe $p68^{Rb}$/E2F1 versus $p110^{Rb}$/E2F1. L'ensemble de nos données, nous permettent cependant déjà d'avancer l'hypothèse qu'E2F1 et pRb seraient des acteurs majeurs de la mort cellulaire induite par l'ABT-737, en participant à des complexes transcriptionnels actifs et en activant l'expression de gènes pro-apoptotiques dont Noxa et p73.

Nous avons démontré, lors de notre étude, qu'E2F1 agissait en tant que facteur de transcription pour induire l'apoptose, sous ABT-737, mais nos résultats laissent à penser qu'E2F1 pourrait aussi avoir un rôle non transcriptionnel en interagissant directement avec des protéines impliquées dans l'apoptose. En effet, nous avons démontré qu'E2F1 pouvait interagir spécifiquement avec Bcl-xL, protéine anti-apoptotique. Aucune interaction entre E2F1 et Bcl-2 ou Mcl-1 n'a pu être observée. Ce nouvel aspect d'E2F1 est tout nouveau et ouvre de nouvelles perspectives quant à son rôle dans l'apoptose. En effet, si E2F1 suit un modèle proche de p53, celui-ci pourrait induire la mort cellulaire de manière transcriptionnelle, via ses gènes cibles, et non transcriptionnelle, via son interaction avec des protéines impliquées dans l'apoptose, notamment Bcl-xL. L'utilisation d'un plasmide codant pour une protéine E2F1 modifiée qui a perdu sa fonction transcriptionnelle (E2F1 E132) pourrait dans ce cas être particulièrement utile pour séparer les activités transcriptionnelles et non transcriptionnelles d'E2F1 et déterminer si E2F1, au-delà de son induction de gènes pro-apoptotiques, pourrait avoir tout comme p53, un rôle non transcriptionnel, sous ABT-737. De plus, Il serait intéressant d'étudier l'interaction d'E2F1 avec Bcl-xL, en particulier sa localisation et sa fonction, et de déterminer quand celle-ci est induite. L'interaction E2F1/Bcl-xL pourrait, comme l'interaction p53/Bcl-xL favoriser l'interaction de Bcl-xL avec les BH3-seul (Hagn *et al.*, 2010). En effet, E2F1 interagit avec le mutant Bcl-xL G138A suggérant qu'E2F1 n'interagit pas avec la poche hydrophobe de Bcl-xL, comme les BH3-seul. On pourrait continuer l'étude de cette interaction par « epitope mapping » pour déterminer les résidus de Bcl-xL impliqués dans l'interaction avec E2F1. Enfin, au-delà de l'interaction E2F1/Bcl-xL, E2F1 pourrait aussi interagir avec des protéines pro-apoptotiques telles que Bax ou Bak pour induire l'apoptose. C'est effectivement le cas pour p53 qui déplacerait Bak de Mcl-1 et faciliterait l'apoptose (Leu *et al.*, 2004).

En conclusion, lors de traitement à l'ABT-737, des gènes pro-apoptotiques notamment Noxa et p73, sont induits et favorisent le déclenchement de l'apoptose. Pour la première fois, nous démontrons que cette induction de la transcription de Noxa passerait par la voie pRb/E2F1 dans un contexte p53 muté et serait dépendante des caspases. Lors de cette réponse pRb subirait d'importantes modifications post-traductionnelles, en particulier un clivage par les caspases et les deux formes, totale et clivée, resteraient complexées avec E2F1. On pourrait, alors, à partir de ces données, imaginer une boucle d'activation tardive de la réponse apoptotique impliquant les caspases, pRb/E2F1 et Noxa (figure 51). En parallèle, E2F1, au-delà de son rôle transcriptionnel pourrait directement interagir avec des protéines impliquées dans la mort cellulaire et de nouveau favoriser l'apoptose. L'activation de la voie pRb/E2F1 pourrait alors permettre de sensibiliser les cellules cancéreuses résistantes à ce BH3 mimétique. L'utilisation, en clinique, de combinaison composée de l'ABT-263

(équivalant oral de l'ABT-737) et de molécule activant la voie pRb/E2F1 telle que la Nutlin-3 pourrait s'avérer particulièrement efficace, en particulier dans un contexte p53 muté. D'ailleurs, le déclenchement de l'apoptose obtenu par les traitements conjoints de l'ABT-737 avec la Nutlin-3 dans les MDA-MB-231 vient conforter cette hypothèse.

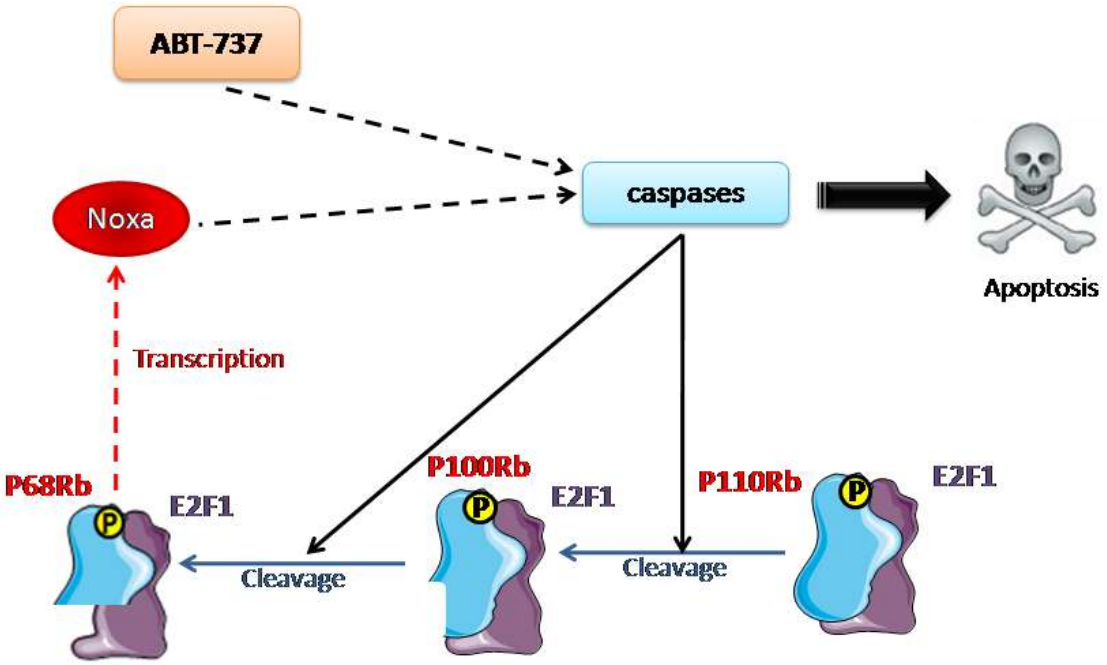


Figure 51 : Boucle d'activation tardive, amplificatrice de la réponse apoptotique à l'ABT-737 impliquant les caspases, pRb/E2F1 et Noxa. Lors de réponse tardive à l'ABT-737 les caspases vont cliver pRb ce qui va générer un nouveau complexe $p68^{Rb}$/E2F1 qui peut induire l'expression de Noxa qui pourra amplifier l'apoptose en activant les caspases.

Partie II : p53, acteur majeur de la mort cellulaire induite par l'ABT-737.

Lors de notre étude, il s'est avéré que, dans une lignée p53 sauvage, E2F1 ne semblait pas avoir de rôle décisif dans l'induction de la mort par l'ABT-737. En effet, la diminution de l'expression d'E2F1 n'entraîne pas de modification de la mort cellulaire déclenchée par l'ABT-737. Cette différence significative entre une lignée cellulaire p53 muté et une lignée p53 sauvage, suggère qu'en présence de p53 fonctionnel, ce serait p53 et non E2F1 qui serait un acteur clé de l'apoptose induite par l'ABT-737. Effectivement, nous avons observé que, dans les HCT116 p21$^{-/-}$, p53 endogène est le facteur de transcription majeur dans l'induction de la mort cellulaire, sous ABT-737. On pourrait donc penser que la voie pRb/E2F1 prendrait toute son importance plus particulièrement dans des contextes où p53 est non fonctionnel, pour pallier à la perte de cette voie de signalisation, frein majeur de la carcinogénèse. La voie pRb/E2F1, en particulier, en induisant p73, un homologue de p53, serait une voie de signalisation de secours lorsque la voie de p53 est déficiente, induisant l'apoptose, après dommages à l'ADN. Sous ABT-737, dans un contexte p53 sauvage, la voie pRb/E2F1 peut être active, mais masquée par la voie p53 ou alors même, inactivée par p53, les voies pRb/E2F1 et p53 se croisant en de nombreux points. Cependant, la lignée HCT116 p53$^{-/-}$, où p53 n'est pas exprimé, n'est pas sensible à l'ABT-737, suggérant qu'il ne suffit pas que p53 soit inactif pour activer la voie pRb/E2F1. En revanche, la surexpression d'E2F1 suffit à sensibiliser cette lignée à l'ABT-737. De même, la surexpression d'E2F1 sensibilise les cellules HCT116 p53$^{-/-}$ aux inhibiteurs des HDAC (Zhao *et al.*, 2005).

p53 a un rôle majeur dans la sensibilité des HCT116 p21$^{-/-}$ au BH3 mimétique. De plus la stabilisation de p53 endogène par la Nutlin-3 dans les HCT116 parentales, mais aussi dans une lignée du cancer du sein, Cal51 (résultats non présentés ici), ou l'introduction d'un p53 exogène dans les HCT116 p53$^{-/-}$, suffit à sensibiliser ces lignées cellulaires à l'ABT-737. De manière similaire, Ferrandiz *et al*. ont récemment démontré que la sensibilité aux dommages à l'ADN des HCT116 p21$^{-/-}$ n'était pas due, comme suspecté, à la déficience en p21, mais à l'expression élevée de p53 dans ces cellules (Ferrandiz *et al.*, 2009). Par ailleurs, une récente étude indique que la protéine p53 dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ acquière une structure très similaire à celle de certains mutants de conformation. Cette nouvelle structure modulerait alors son activité (Roger *et al.*, 2010). On peut donc se demander si la sensibilité des HCT116 p21$^{-/-}$ est liée à cette nouvelle forme de p53. Cependant, la sensibilisation à l'ABT-737 des HCT116 par la stabilisation de p53 endogène et des HCT116 p53$^{-/-}$ par l'introduction d'un p53 ectopique va à l'encontre de cette hypothèse. De même, l'étude précédente, dans les U251 possédant un p53 muté R273H,

démontre que p53 muté n'a pas de rôle dans la mort induite par l'ABT-737. Cependant, p53 muté R273H est un mutant de contact et non de conformation. Une étude complémentaire, introduisant un p53 mutant de conformation dans les HCT116 p53$^{-/-}$, pourrait être envisagée, afin de déterminer si ces mutants sont capables de sensibiliser cette lignée cellulaire à l'ABT-737. Un mutant p53 ΔNLS sera également généré pour déterminer si c'est un p53 nucléaire ou cytoplasmique qui serait impliqué dans la sensibilité à l'ABT-737. Il est d'autant plus intéressant de déterminer si un p53, dépourvu de sa séquence d'adressage au noyau, peut toujours induire l'apoptose que nos résultats suggèrent que la fonction transcriptionnelle de p53 ne serait pas impliquée dans la réponse à l'ABT-737.

Le traitement à l'ABT-737 n'induit pas de modification de l'expression de Bax et Puma, cibles transcriptionnelles de p53 et acteurs majeurs de l'apoptose induite par l'ABT-737 (Gallenne *et al.*, 2009). Le traitement à l'ABT-737 n'a pas d'effet sur l'activité du promoteur synthétique répondant à p53. L'absence d'effet de la pifhitrine α, inhibiteur de la fonction transcriptionnelle de p53, sur l'apoptose induite par l'ABT-737, dans les HCT116 p21$^{-/-}$, conforte l'hypothèse de l'absence de rôle transcriptionnel de p53 dans la sensibilité de traitement à l'ABT-737. Ces résultats nous amènent à la conclusion que p53 pourrait avoir un rôle non transcriptionnel dans la mort cellulaire dépendante de l'ABT-737. Des études ont démontré que p53 pouvait interagir directement, au niveau de la mitochondrie, avec les membres pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 via son domaine DBD et induire l'apoptose (Leu *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2006; Chipuk *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2010). Nous avons observé que p53, bien que majoritairement nucléaire, est retrouvé à la mitochondrie dans les HCT116 p21$^{-/-}$. En 2009, deux études différentes indiquent un rôle de l'acétylation de p53 dans sa fonction non transcriptionnelle, et sa localisation mitochondriale (Sykes *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009). Pour évaluer si l'ABT-737 favoriserait l'acétylation de p53 et donc son activité non transcriptionnelle, nous avons étudié par différentes méthodes l'acétylation de p53. Toutefois, nous n'avons pas mis en évidence d'acétylation de celui-ci dans les cellules HCT116 p21$^{-/-}$. En parallèle de cette étude, l'interaction de p53 avec les protéines de la famille Bcl-2 a été analysée par une approche candidate, dans le laboratoire. Cependant, nos analyses préliminaires n'ont pas encore permis de mettre en évidence des interactions de p53 avec les protéines de la famille Bcl-2, dans nos lignées. Une approche plus globale par protéomique est envisagée pour identifier les partenaires protéiques de p53, pouvant être impliqués dans la sensibilité à l'ABT-737. Cette approche aura l'intérêt de permettre une étude conjointe des partenaires protéiques et des modifications post-traductionnelles de p53.

De récentes expériences menées au laboratoire ont montré que, dans les HCT116, le traitement par l'ABT-737, entraîne une dissociation de Bcl-xL avec Bax et Puma, sans

entrainer d'apoptose, à moins d'une surexpression de p53. Ainsi, il ne suffit pas de libérer Bax et Puma de Bcl-xL pour induire l'apoptose. Ces nouvelles données mettent en avant un nouveau rôle de p53 dans le processus apoptotique. Une hypothèse serait que p53, en interagissant avec Bcl-xL, favoriserait sa liaison avec Bax et en même temps son activation. Les travaux de F. Gautier et al. ont, en effet, montré que l'interaction de Bax avec Bcl-xL favoriserait une conformation active de Bax (Gautier *et al.*, 2011). Dans un deuxième temps, l'ABT-737, provoquerait la dissociation de Bcl-xL et Bax et la libération de Bax actif. Enfin, il a été montré que lorsque p53 s'associe à une protéine anti-apoptotique telle que Bcl-xL, ceci entraine un changement de conformation de celle-ci au niveau des hélices 3 et 4. Cette nouvelle conformation, plus ouverte, augmente l'affinité de Bcl-xL pour les BH3-seul. De cette manière, p53 facilite la dissociation du complexe Bcl-xL/Bax par les BH3-seul (Hagn *et al.*, 2010). Dans notre cas, p53 pourrait faciliter la dissociation du complexe Bcl-xL/Bax par l'ABT-737.

Notre étude a permis de mettre en évidence l'importance de p53 dans l'induction de l'apoptose par l'ABT-737 dans la lignée cancéreuse colorectale HCT116. En revanche, son action, dans les processus apoptotiques, ne serait pas transcriptionnelle. Les interactions, au niveau mitochondrial, avec les protéines de la famille Bcl-2, et en particulier Bcl-xL pourraient expliquer son rôle lors du traitement à l'ABT-737. Ces interactions restent cependant difficiles à étudier en raison d'un réseau complexe engageant de nombreuses protéines potentiellement partenaires. Une étude plus poussée, avec peut être l'utilisation d'un modèle cellulaire vierge de p53 et de protéines de la famille Bcl-2, tel que la levure, devrait permettre de déterminer précisément, les rôles de chacun des acteurs dans l'induction de l'apoptose par l'ABT-737 (Oettinghaus *et al.*, 2011).

Conclusion générale

En conclusion, cette étude a permis de révéler que la régulation transcriptionnelle pouvait être induite par un traitement à l'ABT-737 et de caractériser les voies de signalisation mises en jeu dans cette régulation. Dans un contexte p53 muté, un traitement par l'ABT-737 entraine l'activation de la voie pRb/E2F1 et ces deux protéines vont induire l'expression de gènes cibles codant des protéines pro-apoptotiques, notamment Noxa.

Cette activation requiert les caspases qui vont cliver la protéine pRb. Le clivage de pRb donne trois formes tronquées $p100^{Rb}$, $p68^{Rb}$ et $p48^{Rb}$. L'apparition de ces trois formes est corrélée à la mort cellulaire induite par l'ABT-737. Nos résultats suggèrent que la forme $p68^{Rb}$ participerait avec E2F1 à induire Noxa et p73. Ainsi l'activation de la voie pRb/E2F1 constituerait une boucle d'amplification de la réponse à l'ABT-737 (figure 51).

D'autre part cette étude a montré l'importance de p53 dans la sensibilité à l'ABT-737 dans des lignées cellulaires p53 sauvage. La surexpression de p53 semble nécessaire à l'induction de l'apoptose par l'ABT-737 dans ce contexte. Le rôle de p53 n'est pas encore déterminé, mais nos résultats indiquent que sa fonction transcriptionnelle n'est pas requise.

En conclusion, l'utilisation, en clinique, en combinaison avec l'ABT-263 (équivalant oral de l'ABT-737), de drogues qui induisent les voies de signalisation pRb/E2F1 ou p53, telles que la Nutlin-3, permettrait de sensibiliser un plus grand nombre de cellules cancéreuses au BH3 mimétique. Ces types de combinaison favoriseraient la mort des cellules cancéreuses et deviendraient alors une stratégie thérapeutique gagnante.

Bibliographie

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

Adegbola O, and Pasternack GR. (2005). Phosphorylated retinoblastoma protein complexes with pp32 and inhibits pp32-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem* 280: 15497-15502.

Albershardt TC, Salerni BL, Soderquist RS, Bates DJP, Pletnev AA, Kisselev AF, *et al.* (2011). Multiple BH3 mimetics antagonize anti-apoptotic MCL1 by inducing the endoplasmic reticulum stress response and up-regulating BH3-only protein NOXA. *J Biol Chem* 286(28): 24882-95.

Alexander K, and Hinds PW. (2001). Requirement for p27(KIP1) in retinoblastoma protein-mediated senescence. *Mol. Cell. Biol* 21: 3616-3631.

Ambrosini G, Sambol EB, Carvajal D, Vassilev LT, Singer S, and Schwartz GK. (2007). Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene* 26: 3473-3481.

Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, and Fornace AJ Jr. (2000). An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res* 60: 6101-6110.

An B, and Dou QP. (1996). Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res.* 56: 438-442.

Arima Y, Inoue Y, Shibata T, Hayashi H, Nagano O, Saya H, *et al.* (2008). Rb depletion results in deregulation of E-cadherin and induction of cellular phenotypic changes that are characteristic of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res* 68: 5104-5112.

Attwooll C, Lazzerini Denchi E, and Helin K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J* 23: 4709-4716.

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, *et al.* (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217-221.

Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, *et al.* (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281: 1674-1677.

Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, *et al.* (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395: 124-125.

Black AR, and Azizkhan-Clifford J. (1999). Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene* 237: 281-302.

Bourdon J-C, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, *et al.* (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 19: 2122-2137.

Bourdon J-C. (2007). p53 and its isoforms in cancer. *Br. J. Cancer* 97: 277-282.

Boutillier AL, Trinh E, and Loeffler JP. (2000). Caspase-dependent cleavage of the retinoblastoma protein is an early step in neuronal apoptosis. *Oncogene* 19: 2171-2178.

Bracken AP, Ciro M, Cocito A, and Helin K. (2004). E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem. Sci* 29: 409-417.

Brosh R, and Rotter V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer* 9: 701-713.

de Bruin A, Maiti B, Jakoi L, Timmers C, Buerki R, and Leone G. (2003). Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem* 278: 42041-42049.

Bullock AN, and Fersht AR. (2001). Rescuing the function of mutant p53. *Nat. Rev. Cancer* 1: 68-76.

Buron N, Porceddu M, Brabant M, Desgué D, Racoeur C, Lassalle M, *et al.* (2010). Use of human cancer cell lines mitochondria to explore the mechanisms of BH3 peptides and ABT-737-induced mitochondrial membrane permeabilization. *PLoS ONE* 5: e9924.

Le Cam L, Linares LK, Paul C, Julien E, Lacroix M, Hatchi E, *et al.* (2006). E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation. *Cell* 127: 775-788.

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

Cecchini MJ, and Dick FA. (2011). The biochemical basis of CDK phosphorylation-independent regulation of E2F1 by the retinoblastoma protein. *Biochem. J* 434: 297-308.

Ceol CJ, and Horvitz HR. (2001). dpl-1 DP and efl-1 E2F act with lin-35 Rb to antagonize Ras signaling in C. elegans vulval development. *Mol. Cell* 7: 461-473.

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

Chan HM, Krstic-Demonacos M, Smith L, Demonacos C, and La Thangue NB. (2001). Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat. Cell Biol* 3: 667-674.

Charles A, Tang X, Crouch E, Brody JS, and Xiao ZX. (2001). Retinoblastoma protein complexes with C/EBP proteins and activates C/EBP-mediated transcription. *J. Cell. Biochem.* 83: 414-425.

Chau BN, Borges HL, Chen T-T, Masselli A, Hunton IC, and Wang JYJ. (2002). Signal-dependent protection from apoptosis in mice expressing caspase-resistant Rb. *Nat. Cell Biol* 4: 757-765.

Chau BN, Chen T-T, Wan YY, DeGregori J, and Wang JYJ. (2004). Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis requires p73 and c-ABL activation downstream of RB degradation. *Mol. Cell. Biol* 24: 4438-4447.

Chehab NH, Malikzay A, Appel M, and Halazonetis TD. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* 14: 278-288.

Chen CF, Chen Y, Dai K, Chen PL, Riley DJ, and Lee WH. (1996). A new member of the hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock. *Mol. Cell. Biol* 16: 4691-4699.

Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, *et al.* (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* 17: 393-403.

Chen WD, Otterson GA, Lipkowitz S, Khleif SN, Coxon AB, and Kaye FJ. (1997). Apoptosis is associated with cleavage of a 5 kDa fragment from RB which mimics dephosphorylation and modulates E2F binding. *Oncogene* 14: 1243-1248.

Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, *et al.* (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303: 1010-1014.

Chong J-L, Wenzel PL, Sáenz-Robles MT, Nair V, Ferrey A, Hagan JP, *et al.* (2009). E2f1-3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells. *Nature* 462: 930-934.

Chonghaile TN, and Letai A. (2008). Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene* 27 Suppl 1: S149-157.

Chou N-H, Chen H-C, Chou N-S, Hsu P-I, and Tseng H-H. (2006). Expression of altered retinoblastoma protein inversely correlates with tumor invasion in gastric carcinoma. *World J. Gastroenterol* 12: 7188-7191.

Classon M, and Dyson N. (2001). p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp. Cell Res* 264: 135-147.

Collado M, and Serrano M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat. Rev. Cancer* 10: 51-57.

Collado M, Blasco MA, and Serrano M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130: 223-233.

Cory S, Huang DCS, and Adams JM. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607.

Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, *et al.* (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126: 121-134.

Croxton R, Ma Y, Song L, Haura EB, and Cress WD. (2002). Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene* 21: 1359-1369.

Czabotar PE, Lee EF, van Delft MF, Day CL, Smith BJ, Huang DCS, *et al.* (2007). Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104: 6217-6222.

Danial NN, and Korsmeyer SJ. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205-219.

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

DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, and Old LJ. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 76: 2420-2424.

van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, *et al.* (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 10: 389-399.

Deng X, Gao F, Flagg T, Anderson J, and May WS. (2006). Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol. Cell. Biol* 26: 4421-4434.

Dick FA, and Dyson N. (2003). pRB contains an E2F1-specific binding domain that allows E2F1-induced apoptosis to be regulated separately from other E2F activities. *Mol. Cell* 12: 639-649.

Dick FA. (2007). Structure-function analysis of the retinoblastoma tumor suppressor protein - is the whole a sum of its parts? *Cell Div* 2: 26.

Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, *et al.* (1993). Gain of function mutations in p53. *Nat. Genet* 4: 42-46.

Doostzadeh-Cizeron J, Evans R, Yin S, and Goodrich DW. (1999). Apoptosis induced by the nuclear death domain protein p84N5 is inhibited by association with Rb protein. *Mol. Biol. Cell* 10: 3251-3261.

Dou QP, and An B. (1998). RB and apoptotic cell death. *Front. Biosci* 3: d419-430.

Du H, Wolf J, Schafer B, Moldoveanu T, Chipuk JE, and Kuwana T. (2011). BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *J. Biol. Chem.* 286: 491-501.

Dynlacht BD, Moberg K, Lees JA, Harlow E, and Zhu L. (1997). Specific regulation of E2F family members by cyclin-dependent kinases. *Mol. Cell. Biol* 17: 3867-3875.

Eischen CM, Packham G, Nip J, Fee BE, Hiebert SW, Zambetti GP, *et al.* (2001). Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. *Oncogene* 20: 6983-6993.

el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, and Vogelstein B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet* 1: 45-49.

Fajas L, Landsberg RL, Huss-Garcia Y, Sardet C, Lees JA, and Auwerx J. (2002). E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev. Cell* 3: 39-49.

De Falco G, Comes F, and Simone C. (2006). pRb: master of differentiation. Coupling irreversible cell cycle withdrawal with induction of muscle-specific transcription. *Oncogene* 25: 5244-5249.

Fattman CL, An B, and Dou QP. (1997). Characterization of interior cleavage of retinoblastoma protein in apoptosis. *J. Cell. Biochem* 67: 399-408.

Fattman CL, Delach SM, Dou QP, and Johnson DE. (2001). Sequential two-step cleavage of the retinoblastoma protein by caspase-3/-7 during etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* 20: 2918-2926.

Ferrandiz N, Martin-Perez J, Blanco R, Donertas D, Weber A, Eilers M, *et al.* (2009). HCT116 cells deficient in p21(Waf1) are hypersensitive to tyrosine kinase inhibitors and adriamycin through a mechanism unrelated to p21 and dependent on p53. *DNA Repair (Amst.)* 8: 390-399.

Fesik SW. (2005). Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Cancer* 5: 876-885.

Field SJ, Tsai FY, Kuo F, Zubiaga AM, Kaelin WG Jr, Livingston DM, *et al.* (1996). E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* 85: 549-561.

Fleck O, and Nielsen O. (2004). DNA repair. *J. Cell. Sci* 117: 515-517.

Flinterman M, Guelen L, Ezzati-Nik S, Killick R, Melino G, Tominaga K, *et al.* (2005). E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis. *J. Biol. Chem* 280: 5945-5959.

Le Floch N, Rincheval V, Ferecatu I, Ali-Boina R, Renaud F, Mignotte B, *et al.* (2010). The p76(Rb) and p100(Rb) truncated forms of the Rb protein exert antagonistic roles on cell death regulation in human cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 399: 173-178.

Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, and Prives C. (2001). A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol. Cell. Biol* 21: 1874-1887.

Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, and Letai A. (2007). Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J. Clin. Invest.* 117: 112-121.

Gallenne T, Gautier F, Oliver L, Hervouet E, Noël B, Hickman JA, *et al.* (2009). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J. Cell Biol* 185: 279-290.

Galluzzi L, and Kroemer G. (2008). Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* 135: 1161-1163.

Gaubatz S, Lindeman GJ, Ishida S, Jakoi L, Nevins JR, Livingston DM, *et al.* (2000). E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol. Cell* 6: 729-735.

Gauthier ML, Berman HK, Miller C, Kozakeiwicz K, Chew K, Moore D, *et al.* (2007). Abrogated response to cellular stress identifies DCIS associated with subsequent tumor events and defines basal-like breast tumors. *Cancer Cell* 12: 479-491.

Gautier F, Guillemin Y, Cartron PF, Gallenne T, Cauquil N, Le Diguarher T, *et al.* (2011). Bax activation by engagement with, then release from, the BH3 binding site of Bcl-xL. *Mol. Cell. Biol* 31: 832-844.

Gery S, Gombart AF, Fung YK, and Koeffler HP. (2004). C/EBPepsilon interacts with retinoblastoma and E2F1 during granulopoiesis. *Blood* 103: 828-835.

Giono LE, and Manfredi JJ. (2006). The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J. Cell. Physiol* 209: 13-20.

Göhler T, Jäger S, Warnecke G, Yasuda H, Kim E, and Deppert W. (2005). Mutant p53 proteins bind DNA in a DNA structure-selective mode. *Nucleic Acids Res* 33: 1087-1100.

Green DR, and Kroemer G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458: 1127-1130.

Greider C, Chattopadhyay A, Parkhurst C, and Yang E. (2002). BCL-x(L) and BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 21: 7765-7775.

Grivennikov SI, Greten FR, and Karin M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140: 883-899.

Grossman SR, Deato ME, Brignone C, Chan HM, Kung AL, Tagami H, *et al.* (2003). Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 300: 342-344.

Hagenbuchner J, Ausserlechner MJ, Porto V, David R, Meister B, Bodner M, *et al.* (2010). The anti-apoptotic protein BCL2L1/Bcl-xL is neutralized by pro-apoptotic PMAIP1/Noxa in neuroblastoma, thereby determining bortezomib sensitivity independent of prosurvival MCL1 expression. *J. Biol. Chem* 285: 6904-6912.

Hagn F, Klein C, Demmer O, Marchenko N, Vaseva A, Moll UM, *et al.* (2010). BclxL changes conformation upon binding to wild-type but not mutant p53 DNA binding domain. *J. Biol. Chem* 285: 3439-3450.

Hakem R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J* 27: 589-605.

Hallstrom TC, and Nevins JR. (2003). Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100: 10848-10853.

Hamel PA, Phillips RA, Muncaster M, and Gallie BL. (1993). Speculations on the roles of RB1 in tissue-specific differentiation, tumor initiation, and tumor progression. *FASEB J* 7: 846-854.

Han J, Goldstein LA, Hou W, Gastman BR, and Rabinowich H. (2010). Regulation of mitochondrial apoptotic events by p53-mediated disruption of complexes between antiapoptotic Bcl-2 members and Bim. *J. Biol. Chem* 285: 22473-22483.

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

Hanahan D, and Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

Hao H, Dong Y, Bowling MT, Gomez-Gutierrez JG, Zhou HS, and McMasters KM. (2007). E2F-1 induces melanoma cell apoptosis via PUMA up-regulation and Bax translocation. *BMC Cancer* 7: 24.

Harris SL, and Levine AJ. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24: 2899-2908.

Haupt Y, Rowan S, and Oren M. (1995). p53-mediated apoptosis in HeLa cells can be overcome by excess pRB. *Oncogene* 10: 1563-1571.

Hauser PJ, Agrawal D, Chu B, and Pledger WJ. (1997). p107 and p130 associated cyclin A has altered substrate specificity. *J. Biol. Chem* 272: 22954-22959.

Hengartner MO, and Horvitz HR. (1994). C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 76: 665-676.

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

van den Heuvel S, and Dyson NJ. (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 9: 713-724.

Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, *et al.* (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287: 1824-1827.

Hock A, and Vousden KH. (2010). Regulation of the p53 pathway by ubiquitin and related proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 42: 1618-1621.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, and Harris CC. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53.

Hou Y, Gao F, Wang Q, Zhao J, Flagg T, Zhang Y, *et al.* (2007). Bcl2 impedes DNA mismatch repair by directly regulating the hMSH2-hMSH6 heterodimeric complex. *J. Biol. Chem* 282: 9279-9287.

Huang X, Masselli A, Frisch SM, Hunton IC, Jiang Y, and Wang JYJ. (2007). Blockade of tumor necrosis factor-induced Bid cleavage by caspase-resistant Rb. *J. Biol. Chem* 282: 29401-29413.

Humbert PO, Rogers C, Ganiatsas S, Landsberg RL, Trimarchi JM, Dandapani S, *et al.* (2000). E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. *Mol. Cell* 6: 281-291.

Ianari A, Gallo R, Palma M, Alesse E, and Gulino A. (2004). Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *J. Biol. Chem* 279: 30830-30835.

Ianari A, Natale T, Calo E, Ferretti E, Alesse E, Screpanti I, *et al.* (2009). Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer Cell* 15: 184-194.

Iaquinta PJ, and Lees JA. (2007). Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol* 19: 649-657.

Ikawa S, Nakagawara A, and Ikawa Y. (1999). p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ* 6: 1154-1161.

Inoue Y, Kitagawa M, and Taya Y. (2007). Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. *EMBO J* 26: 2083-2093.

Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W, *et al.* (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 407: 645-648.

Itahana K, Campisi J, and Dimri GP. (2007). Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol. Biol* 371: 21-31.

Jamil S, Mojtabavi S, Hojabrpour P, Cheah S, and Duronio V. (2008). An essential role for MCL-1 in ATR-mediated CHK1 phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 19: 3212-3220.

Jamil S, Stoica C, Hackett T-L, and Duronio V. (2010). MCL-1 localizes to sites of DNA damage and regulates DNA damage response. *Cell Cycle* 9: 2843-2855.

Jänicke RU, Walker PA, Lin XY, and Porter AG. (1996). Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J* 15: 6969-6978.

Janumyan Y, Cui Q, Yan L, Sansam CG, Valentin M, and Yang E. (2008). G0 function of BCL2 and BCL-xL requires BAX, BAK, and p27 phosphorylation by Mirk, revealing a novel role of BAX and BAK in quiescence regulation. *J. Biol. Chem* 283: 34108-34120.

Jiang H, Martin V, Gomez-Manzano C, Johnson DG, Alonso M, White E, *et al.* (2010). The RB-E2F1 pathway regulates autophagy. *Cancer Res* 70: 7882-7893.

Jin Z, May WS, Gao F, Flagg T, and Deng X. (2006). Bcl2 suppresses DNA repair by enhancing c-Myc transcriptional activity. *J. Biol. Chem* 281: 14446-14456.

Joerger AC, and Fersht AR. (2010). The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000919.

Jones SN, Roe AE, Donehower LA, and Bradley A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378: 206-208.

Jost CA, Marin MC, and Kaelin WG Jr. (1997). p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389: 191-194.

Julian LM, Palander O, Seifried LA, Foster JEG, and Dick FA. (2008). Characterization of an E2F1-specific binding domain in pRB and its implications for apoptotic regulation. *Oncogene* 27: 1572-1579.

Katsuda K, Kataoka M, Uno F, Murakami T, Kondo T, Roth JA, *et al.* (2002). Activation of caspase-3 and cleavage of Rb are associated with p16-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 21: 2108-2113.

Kelly PN, and Strasser A. (2011). The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 18: 1414-1424.

Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.

Kim E, and Deppert W. (2004). Transcriptional activities of mutant p53: when mutations are more than a loss. *J. Cell. Biochem* 93: 878-886.

Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu H-C, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ-D, *et al.* (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat. Cell Biol* 8: 1348-1358.

Kim H, Tu H-C, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, *et al.* (2009). Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* 36: 487-499.

Kitagawa M, Lee SH, and McCormick F. (2008). Skp2 suppresses p53-dependent apoptosis by inhibiting p300. *Mol. Cell* 29: 217-231.

Kline MP, Rajkumar SV, Timm MM, Kimlinger TK, Haug JL, Lust JA, *et al.* (2007). ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells. *Leukemia* 21: 1549-1560.

Knights CD, Catania J, Di Giovanni S, Muratoglu S, Perez R, Swartzbeck A, *et al.* (2006). Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J. Cell Biol* 173: 533-544.

Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, *et al.* (1999). A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 285: 1733-1737.

Kontaki H, and Talianidis I. (2010). Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Mol. Cell* 39: 152-160.

Kovesdi I, Reichel R, and Nevins JR. (1986). Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* 45: 219-228.

Kowalik TF, DeGregori J, Schwarz JK, and Nevins JR. (1995). E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis. *J. Virol* 69: 2491-2500.

Kress M, May E, Cassingena R, and May P. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J. Virol* 31: 472-483.

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

Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA Jr, Booth CJ, Mehal WZ, *et al.* (2006). Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311: 847-851.

Lalier L, Cartron P-F, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B, *et al.* (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 12: 887-896.

Lane DP, and Crawford LV. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263.

Leduc C, Claverie P, Eymin B, Col E, Khochbin S, Brambilla E, *et al.* (2006). p14ARF promotes RB accumulation through inhibition of its Tip60-dependent acetylation. *Oncogene* 25: 4147-4154.

Lee EY, Chang CY, Hu N, Wang YC, Lai CC, Herrup K, *et al.* (1992). Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 359: 288-294.

Lee JO, Russo AA, and Pavletich NP. (1998). Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* 391: 859-865.

Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, and Lee EY. (1987). Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 235: 1394-1399.

Leone G, Nuckolls F, Ishida S, Adams M, Sears R, Jakoi L, *et al.* (2000). Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol. Cell. Biol* 20: 3626-3632.

Letai A. (2009). Puma strikes Bax. *J. Cell Biol* 185: 189-191.

Lettre G, and Hengartner MO. (2006). Developmental apoptosis in C. elegans: a complex CEDnario. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 7: 97-108.

Leu JI-J, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, and George DL. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol* 6: 443-450.

Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, and Gu W. (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 302: 1972-1975.

Lin WC, Lin FT, and Nevins JR. (2001). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev.* 15: 1833-1844.

Linzer DI, and Levine AJ. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52.

Liu X, Dai S, Zhu Y, Marrack P, and Kappler JW. (2003). The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity* 19: 341-352.

Lockshin RA, and Williams CM. (1965). Programmed cell death. IV. The influence of drugs on the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *J. Insect Physiol* 11: 803-809.

Lopez H, Zhang L, George NM, Liu X, Pang X, Evans JJD, *et al.* (2010). Perturbation of the Bcl-2 network and an induced Noxa/Bcl-xL interaction trigger mitochondrial dysfunction after DNA damage. *J. Biol. Chem* 285: 15016-15026.

Lowe SW, and Sherr CJ. (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr. Opin. Genet. Dev* 13: 77-83.

Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, *et al.* (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107: 137-148.

Magzoub M, and Miranker AD. (2011). Protein aggregation: p53 succumbs to peer pressure. *Nat. Chem. Biol* 7: 248-249.

Maiti B, Li J, de Bruin A, Gordon F, Timmers C, Opavsky R, *et al.* (2005). Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem* 280: 18211-18220.

Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain J-C, Gautier F, Juin P, *et al.* (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 26: 2527-2539.

Malik SA, Orhon I, Morselli E, Criollo A, Shen S, Mariño G, *et al.* (2011). BH3 mimetics activate multiple pro-autophagic pathways. *Oncogene* 30(37): 3918-29.

Malumbres M, and Barbacid M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* 9: 153-166.

Malumbres M, and Barbacid M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1: 222-231.

Mantovani F, Tocco F, Girardini J, Smith P, Gasco M, Lu X, *et al.* (2007). The prolyl isomerase Pin1 orchestrates p53 acetylation and dissociation from the apoptosis inhibitor iASPP. *Nat. Struct. Mol. Biol* 14: 912-920.

Marine J-C, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F, and Lozano G. (2006). Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ.* 13: 927-934.

Markham D, Munro S, Soloway J, O'Connor DP, and La Thangue NB. (2006). DNA-damage-responsive acetylation of pRb regulates binding to E2F-1. *EMBO Rep* 7: 192-198.

Martínez-Balbás MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, and Kouzarides T. (2000). Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* 19: 662-671.

Marzio G, Wagener C, Gutierrez MI, Cartwright P, Helin K, and Giacca M. (2000). E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *J. Biol. Chem* 275: 10887-10892.

Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen H-Y, *et al.* (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137: 1062-1075.

Meijer L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie* 5: 311-326.

Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, *et al.* (2004). p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J. Biol. Chem* 279: 8076-8083.

Melino G, De Laurenzi V, and Vousden KH. (2002). p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2: 605-615.

Metzstein MM, Stanfield GM, and Horvitz HR. (1998). Genetics of programmed cell death in C. elegans: past, present and future. *Trends Genet* 14: 410-416.

Milet C, Rincheval-Arnold A, Mignotte B, and Guénal I. (2010). The Drosophila retinoblastoma protein induces apoptosis in proliferating but not in post-mitotic cells. *Cell Cycle* 9: 97-103.

Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, and Bradley A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398: 708-713.

Miyashita T, and Reed JC. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80: 293-299.

Montes de Oca Luna R, Wagner DS, and Lozano G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378: 203-206.

Morselli E, Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Kepp O, Criollo A, *et al.* (2008). Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy. *Cell Cycle* 7: 3056-3061.

Munro S, Khaire N, Inche A, Carr S, and La Thangue NB. (2010). Lysine methylation regulates the pRb tumour suppressor protein. *Oncogene* 29: 2357-2367.

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

Narita M, Nũnez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, *et al.* (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113: 703-716.

Nguyen DX, Baglia LA, Huang S-M, Baker CM, and McCance DJ. (2004). Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein. *EMBO J* 23: 1609-1618.

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

Oettinghaus B, Frank S, and Scorrano L. (2011). Tonight, the same old, deadly programme: BH3-only proteins, mitochondria and yeast. *EMBO J.* 30: 2754-2756.

Ohtani K, and Nevins JR. (1994). Functional properties of a Drosophila homolog of the E2F1 gene. *Mol. Cell. Biol* 14: 1603-1612.

Okumura K, Huang S, and Sinicrope FA. (2008). Induction of Noxa sensitizes human colorectal cancer cells expressing Mcl-1 to the small-molecule Bcl-2/Bcl-xL inhibitor, ABT-737. *Clin. Cancer Res.* 14: 8132-8142.

Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, *et al.* (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435: 677-681.

Paik JC, Wang B, Liu K, Lue JK, and Lin W-C. (2010). Regulation of E2F1-induced apoptosis by the nucleolar protein RRP1B. *J. Biol. Chem* 285: 6348-6363.

Pardee AB. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 71: 1286-1290.

Pediconi N, Ianari A, Costanzo A, Belloni L, Gallo R, Cimino L, *et al.* (2003). Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol* 5: 552-558.

Peirce SK, and Findley HW. (2009). The MDM2 antagonist nutlin-3 sensitizes p53-null neuroblastoma cells to doxorubicin via E2F1 and TAp73. *Int. J. Oncol.* 34: 1395-1402.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, *et al.* (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat* 28: 622-629.

Petros AM, Nettesheim DG, Wang Y, Olejniczak ET, Meadows RP, Mack J, *et al.* (2000). Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci* 9: 2528-2534.

Petros AM, Olejniczak ET, and Fesik SW. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1644: 83-94.

Pickard A, Wong P-P, and McCance DJ. (2010). Acetylation of Rb by PCAF is required for nuclear localization and keratinocyte differentiation. *J. Cell. Sci* 123: 3718-3726.

Polager S, and Ginsberg D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. *Nat. Rev. Cancer* 9: 738-748.

Polager S, Ofir M, and Ginsberg D. (2008). E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene* 27: 4860-4864.

Quinn BA, Dash R, Azab B, Sarkar S, Das SK, Kumar S, *et al.* (2011). Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 10: 1397-411.

Ramírez-Parra E, Xie Q, Boniotti MB, and Gutierrez C. (1999). The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nucleic Acids Res* 27: 3527-3533.

Reed JC, and Pellecchia M. (2005). Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 106: 408-418.

Rinaldo C, Prodosmo A, Mancini F, Iacovelli S, Sacchi A, Moretti F, *et al.* (2007). MDM2-regulated degradation of HIPK2 prevents p53Ser46 phosphorylation and DNA damage-induced apoptosis. *Mol. Cell* 25: 739-750.

Roger L, Jullien L, Gire V, and Roux P. (2010). Gain of oncogenic function of p53 mutants regulates E-cadherin expression uncoupled from cell invasion in colon cancer cells. *J. Cell. Sci* 123: 1295-1305.

Rohaly G, Chemnitz J, Dehde S, Nunez AM, Heukeshoven J, Deppert W, *et al.* (2005). A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell* 122: 21-32.

Roy S, and Tenniswood M. (2007). Site-specific acetylation of p53 directs selective transcription complex assembly. *J. Biol. Chem* 282: 4765-4771.

Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, *et al.* (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275: 983-986.

Schertel C, and Conradt B. (2007). C. elegans orthologs of components of the RB tumor suppressor complex have distinct pro-apoptotic functions. *Development* 134: 3691-3701.

Schmitt E, Beauchemin M, and Bertrand R. (2007). Nuclear colocalization and interaction between bcl-xL and cdk1(cdc2) during G2/M cell-cycle checkpoint. *Oncogene* 26: 5851-5865.

Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, and Peter ME. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem* 254: 439-459.

Scorrano L, and Korsmeyer SJ. (2003). Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 304: 437-444.

Sdek P, Ying H, Chang DLF, Qiu W, Zheng H, Touitou R, *et al.* (2005). MDM2 Promotes Proteasome-Dependent Ubiquitin-Independent Degradation of Retinoblastoma Protein. *Molecular Cell* 20: 699-708.

Shaulsky G, Goldfinger N, and Rotter V. (1991). Alterations in tumor development in vivo mediated by expression of wild type or mutant p53 proteins. *Cancer Res* 51: 5232-5237.

Sherr CJ, and Roberts JM. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501-1512.

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, and Prives C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91: 325-334.

Shim J, Park HS, Kim MJ, Park J, Park E, Cho SG, *et al.* (2000). Rb protein down-regulates the stress-activated signals through inhibiting c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J. Biol. Chem* 275: 14107-14111.

Song JH, Kandasamy K, and Kraft AS. (2008). ABT-737 induces expression of the death receptor 5 and sensitizes human cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 283: 25003-25013.

Song JH, Kandasamy K, Zemskova M, Lin Y-W, and Kraft AS. (2011). The BH3 mimetic ABT-737 induces cancer cell senescence. *Cancer Res* 71: 506-515.

Stevaux O, and Dyson NJ. (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr. Opin. Cell Biol* 14: 684-691.

Stevens C, and La Thangue NB. (2004). The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst.)* 3: 1071-1079.

Stevens C, Smith L, and La Thangue NB. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol* 5: 401-409.

Stewart SA, and Weinberg RA. (2006). Telomeres: cancer to human aging. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 22: 531-557.

Stiewe T, and Pützer BM. (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat. Genet.* 26: 464-469.

Suzuki A, and Hemmati-Brivanlou A. (2000). Xenopus embryonic E2F is required for the formation of ventral and posterior cell fates during early embryogenesis. *Mol. Cell* 5: 217-229.

Sykes SM, Stanek TJ, Frank A, Murphy ME, and McMahon SB. (2009). Acetylation of the DNA binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53. *J. Biol. Chem* 284: 20197-20205.

Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz-Robles M, Lowe S, Jacks T, *et al.* (1994). p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 78: 703-711.

Tagscherer KE, Fassl A, Campos B, Farhadi M, Kraemer A, Böck BC, *et al.* (2008). Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 27: 6646-6656.

Tait SWG, Parsons MJ, Llambi F, Bouchier-Hayes L, Connell S, Muñoz-Pinedo C, *et al.* (2010). Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Dev. Cell* 18: 802-813.

Tan J, Zhuang L, Jiang X, Yang KK, Karuturi KM, and Yu Q. (2006). Apoptosis signal-regulating kinase 1 is a direct target of E2F1 and contributes to histone deacetylase

inhibitor-induced apoptosis through positive feedback regulation of E2F1 apoptotic activity. *J. Biol. Chem.* 281: 10508-10515.

Tan X, and Wang JY. (1998). The caspase-RB connection in cell death. *Trends Cell Biol* 8: 116-120.

Tan X, Martin SJ, Green DR, and Wang JY. (1997). Degradation of retinoblastoma protein in tumor necrosis factor- and CD95-induced cell death. *J. Biol. Chem* 272: 9613-9616.

Tang Y, Luo J, Zhang W, and Gu W. (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol. Cell* 24: 827-839.

Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, and Gu W. (2008). Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* 133: 612-626.

Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, *et al.* (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell Biol* 10: 676-687.

La Thangue NB, and Rigby PW. (1987). An adenovirus E1A-like transcription factor is regulated during the differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells. *Cell* 49: 507-513.

Thomas DM, Carty SA, Piscopo DM, Lee JS, Wang WF, Forrester WC, *et al.* (2001). The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Mol. Cell* 8: 303-316.

Thorburn A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cell. Signal* 16: 139-144.

Toledo F, Lee CJ, Krummel KA, Rodewald L-W, Liu C-W, and Wahl GM. (2007). Mouse mutants reveal that putative protein interaction sites in the p53 proline-rich domain are dispensable for tumor suppression. *Mol. Cell. Biol* 27: 1425-1432.

Trimarchi JM, Fairchild B, Wen J, and Lees JA. (2001). The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98: 1519-1524.

Trudel S, Stewart AK, Li Z, Shu Y, Liang S-B, Trieu Y, *et al.* (2007). The Bcl-2 family protein inhibitor, ABT-737, has substantial antimyeloma activity and shows synergistic effect with dexamethasone and melphalan. *Clin. Cancer Res* 13: 621-629.

Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, *et al.* (2008). ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 68: 3421-3428.

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

Uchida C, Miwa S, Isobe T, Kitagawa K, Hattori T, Oda T, *et al.* (2006). Effects of MdmX on Mdm2-mediated downregulation of pRB. *FEBS Lett* 580: 1753-1758.

Uchida C, Miwa S, Kitagawa K, Hattori T, Isobe T, Otani S, *et al.* (2005). Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J* 24: 160-169.

Vairo G, Soos TJ, Upton TM, Zalvide J, DeCaprio JA, Ewen ME, *et al.* (2000). Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol. Cell. Biol* 20: 4745-4753.

Vaux DL, Cory S, and Adams JM. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442.

Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ, *et al.* (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302: 1036-1038.

Vousden KH, and Prives C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137: 413-431.

Wade M, Rodewald LW, Espinosa JM, and Wahl GM. (2008). BH3 activation blocks Hdmx suppression of apoptosis and cooperates with Nutlin to induce cell death. *Cell Cycle* 7: 1973-1982.

Wahl GM. (2006). Mouse bites dogma: how mouse models are changing our views of how P53 is regulated in vivo. *Cell Death Differ* 13: 973-983.

Wang C, Chen L, Hou X, Li Z, Kabra N, Ma Y, *et al.* (2006). Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat. Cell Biol* 8: 1025-1031.

Wang JY, and Ki SW. (2001). Choosing between growth arrest and apoptosis through the retinoblastoma tumour suppressor protein, Abl and p73. *Biochem. Soc. Trans* 29: 666-673.

Wang Q, Gao F, May WS, Zhang Y, Flagg T, and Deng X. (2008). Bcl2 negatively regulates DNA double-strand-break repair through a nonhomologous end-joining pathway. *Mol. Cell* 29: 488-498.

Wang Z, and Sun Y. (2010). Targeting p53 for Novel Anticancer Therapy. *Transl Oncol* 3: 1-12.

Warr MR, and Shore GC. (2008). Unique biology of Mcl-1: therapeutic opportunities in cancer. *Curr. Mol. Med* 8: 138-147.

Weinberg RL, Veprintsev DB, Bycroft M, and Fersht AR. (2005). Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements. *J. Mol. Biol* 348: 589-596.

White E, and DiPaola RS. (2009). The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin. Cancer Res* 15: 5308-5316.

Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, *et al.* (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315: 856-859.

Wolf D, Harris N, and Rotter V. (1984). Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* 38: 119-126.

Wong S, and Weber JD. (2007). Deacetylation of the retinoblastoma tumour suppressor protein by SIRT1. *Biochem. J* 407: 451-460.

Wu Y, Mehew JW, Heckman CA, Arcinas M, and Boxer LM. (2001). Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 20: 240-251.

Xiao B, Spencer J, Clements A, Ali-Khan N, Mittnacht S, Broceño C, *et al.* (2003). Crystal structure of the retinoblastoma tumor suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100: 2363-2368.

Xie Q, Bai Y, Wu J, Sun Y, Wang Y, Zhang Y, *et al.* (2011). Methylation-mediated regulation of E2F1 in DNA damage-induced cell death. *J. Recept. Signal Transduct. Res* 31: 139-146.

Xu H, Tai J, Ye H, Kang CB, and Yoon HS. (2006). The N-terminal domain of tumor suppressor p53 is involved in the molecular interaction with the anti-apoptotic protein Bcl-Xl. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 341: 938-944.

Xu J, Reumers J, Couceiro JR, De Smet F, Gallardo R, Rudyak S, *et al.* (2011). Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat. Chem. Biol* 7: 285-295.

Yamaguchi H, Woods NT, Piluso LG, Lee H-H, Chen J, Bhalla KN, *et al.* (2009). p53 acetylation is crucial for its transcription-independent proapoptotic functions. *J. Biol. Chem* 284: 11171-11183.

Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, *et al.* (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* 2: 305-316.

Yang H, Williams BO, Hinds PW, Shih TS, Jacks T, Bronson RT, *et al.* (2002). Tumor suppression by a severely truncated species of retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol* 22: 3103-3110.

Yee AS, Reichel R, Kovesdi I, and Nevins JR. (1987). Promoter interaction of the E1A-inducible factor E2F and its potential role in the formation of a multi-component complex. *EMBO J* 6: 2061-2068.

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

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

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, and Horvitz HR. (1993). The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75: 641-652.

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.

Zhang L, Lopez H, George NM, Liu X, Pang X, and Luo X. (2011). Selective involvement of BH3-only proteins and differential targets of Noxa in diverse apoptotic pathways. *Cell Death Differ.* 18: 864-873.

Zhang Y, and Xiong Y. (2001). A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 292: 1910-1915.

Zhang Z, Wang H, Li M, Rayburn ER, Agrawal S, and Zhang R. (2005). Stabilization of E2F1 protein by MDM2 through the E2F1 ubiquitination pathway. *Oncogene* 24: 7238-7247.

Zhao J, Gao F, Zhang Y, Wei K, Liu Y, and Deng X. (2008). Bcl2 inhibits abasic site repair by down-regulating APE1 endonuclease activity. *J. Biol. Chem* 283: 9925-9932.

Zhao Y, Tan J, Zhuang L, Jiang X, Liu ET, and Yu Q. (2005). Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102: 16090-16095.

Annexes

Annexe 1 : Matériels et Méthodes

Lignées cellulaires et traitements

Les cellules de lignée HCT116, issues du cancer colorectal, ont été fournies par le Dr Volgenstein (John Hopkins University, Baltimore). Ces cellules adhérentes sont cultivées en monocouche dans un milieu complet Mc Coy's 5A (Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (PAA), de 100 unités/mL de Glutamine (Invitrogen), et de 100 unités/mL d'un mélange pénicilline-streptomycine (Invitrogen), à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO_2. Différentes lignées isogéniques sont utilisées les cellules HCT116 parentales, les cellules HCT116 p21$^{-/-}$ déficientes en protéines p21 et les cellules HCT116 p53$^{-/-}$ déficientes en protéines p53. Les cellules de lignée U251, issues de glioblastome, ont été obtenues à l'ATCC. Les cellules MDA-MB-231, issues du cancer du sein, ont été aussi obtenues à l'ATCC (HTB-26). Ces deux lignées cellulaires sont cultivées en monocouche dans un milieu complet DMEM (Gibco) supplémenté de 5% de sérum de veau fœtal, de 100 unités/mL de Glutamine, et de 100 unités/mL d'un mélange pénicilline-streptomycine, à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO_2. Lors des traitements des lignées cellulaires, les drogues sont ajoutées dans le milieu complet à 2µM pour l'ABT-737 (Abbott), 10µM pour la Nutlin-3 (Sigma), 50µM pour l'étoposide (Sigma) et 40µM pour la pifithrine α (Sigma). Deux inhibiteurs de caspases ont été utilisés le Z-VAD-FMK (Promega) à 50µM et le Q-VD-OPh (R&D Systems) à 10µM. L'inhibiteur de caspase est ajouté au milieu, une heure avant le traitement à l'ABT-737.

Anticorps

Les anticorps primaires utilisés sont dirigés contre les protéines suivantes :

Anticorps	Origine	Numéro	Fournisseur
Actine	anticorps monoclonal de souris	MAB1501R	Millipore
β-Tubuline	anticorps monoclonal de souris	T0198	Sigma-Aldrich
Bax	anticorps polyclonal de lapin	A3533	Dako
Noxa	anticorps monoclonal de souris	ALX-804-408	Enzo Life Science
Puma	anticorps polyclonal de lapin	4743	Sigma-Aldrich
Bcl-2	anticorps monoclonal de souris	1017-1	Epitomics
Bcl-xL	anticorps polyclonal de lapin	1018-1	Epitomics
E2F1 C-20	anticorps polyclonal de lapin	sc-193	Santa Cruz
E2F1	anticorps polyclonal de lapin	3742	Cell Signaling
pRb XZ55	anticorps monoclonal de souris	554144	BD Pharmingen
pRb G3-245	anticorps monoclonal de souris	554136	BD Pharmingen
pRb 4H1	anticorps monoclonal de souris	9309	Cell Signaling

phospho-pRb (807-811)	anticorps monoclonal de souris	558389	BD Pharmingen
Flag	anticorps monoclonal de souris	F1804	Santa Cruz
p53	anticorps monoclonal de souris	554294	BD Pharmingen
RNA Polymérase II	anticorps polyclonal de lapin	sc-899	Santa Cruz

Analyse de la mortalité cellulaire

Le pourcentage de mortalité des cellules en culture a été évalué par comptage au bleu de trypan. Les cellules sont rincées au PBS 1X, trypsinées (0,05% trypsine-EDTA, Gibco), puis centrifugées 5min à 1000rpm. Les culots cellulaires sont repris dans du PBS/Bleu de trypan (50/50) et les cellules mortes, dont la membrane lésée est perméable au colorant bleu, sont directement comptées sur lame de comptage (Kova Glasstic Hycor).

Transfection de siRNA et de plasmide

Les siRNA sont transfectés dans les cellules HCT116 à l'aide du Hi Perfect (Qiagen) à une concentration de 20pmole. Le mélange de siRNA et de Hi Perfect est préparé dans du milieu Mc Coy's 5A dépourvu en serum selon les indications du fabriquant. Le mélange est ensuite ajouté sur les cellules en culture dans du milieu complet frais. Une diminution optimale de la protéine ciblée est observée au bout de 48h. Les siRNA sont transfectés, dans les cellules U251 et MDA-MB-231 à l'aide de la lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) à une concentration de 20pmole. Le mélange de siRNA et de lipofectamine RNAi Max est préparé dans du milieu Opti-MEM (Gibco). Le mélange est ensuite ajouté sur les cellules en culture dans du milieu DMEM complet. 4h après transfection, les cellules sont lavées au PBS 1X et remise dans du milieu DMEM complet. Une diminution optimale de la protéine ciblée est observée au bout de 48h. Les siRNA utilisés sont dirigés contre les ARN codant pour les protéines suivantes (en parallèle, les cellules sont toujours transfectées par un siRNA contrôle) :

siRNA	Numéro	Fournisseur
Bcl-2	HSC.RNAI.N000633.6.1	IDT
Bcl-xL	BCL2L1 Human ON-TARGETplus L-003458-00	Thermo Scientific
Puma	ON-TARGETplus smart pool t-004380-00-0005	Thermo Scientific
Bax	HSC.RNAI.N138761.10.1	IDT
Noxa	AC2Z4U4	Ambion
pRb	sc-29468	Santa Cruz
E2F1	HSC.RNAI.N005225.10.3	IDT
p53	AM51331	Ambion
Scr (contrôle)	sc-44230	Santa Cruz

La transfection plasmidique dans les trois lignées cellulaires s'effectue à l'aide de la Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). Le mélange de plasmide et de Lipofectamine™ 2000 est préparé, selon les instructions du fabricant, dans du milieu Mc Coy's 5A dépourvu en serum pour les HCT116 et dans du milieu Opti-MEM pour les U251 et les MDA-MB-231. Le mélange est ensuite ajouté sur les cellules en culture dans du milieu complet frais. Après 4h d'incubation, les cultures sont reprises dans du milieu complet, et incubées 24h avant traitements éventuels. Les vecteurs transfectés sont les suivants :

- pcDNA3 flag p53 (Addgene Plasmid 10838)
- pcDNA3 flag E2F1 (Pour la construction de ce plasmide, E2F1 a été isolé à partir du plasmide pSG5L HA E2F1 (Addgene Plasmid 10736) par digestion BamHI et XbaI et inséré dans ces mêmes sites en phase avec le Flag dans le plasmide pcDNA3 flag p53 (Addgene Plasmid 10838))
- px3 Flag Bcl-xL (Servier)
- px3 Flag Bcl-xL G138A (Servier)

Western Blot

L'analyse par Western blot est réalisée sur des lysats protéiques. Les cellules sont lavées au PBS 1X, trypsinées et centrifugées 5min à 1000rpm. Les culots secs de cellules ainsi obtenus sont ensuite lysés par addition de tampon de lyse ChIP (SDS: 1% ; EDTA: 10mM ; Tris-Hcl ph 8,1: 50mM ; inhibiteurs de protéases Na3VO4 1mM, NaF 100x), et subissent jusqu'à trois séries de sonication aux ultrasons successives de 10 à 15 minutes sur glace. Les protéines sont ensuite isolées par électrophorèse sur gel SDS/polyacrylamide et transférées sur membrane PVDF (Polyvinyldifluoridène) activée par transfert liquide. Les protéines sont ensuite détectées en utilisant un anticorps primaire suivi d'un anticorps secondaire couplé à la HRP (Horse Radish Peroxydase). Le complexe antigène/anticorps ainsi formé est mis en évidence par l'addition d'un substrat de la HRP, donnant un produit chemoluminescent (BM Chemiluminescence Blotting substrate, Roche). L'acquisition numérique est réalisée avec un appareil Fusion Fx7 (Fisher Scientific). Les western-blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Co-Immunoprécipitation

Les extraits protéiques des cellules, préalablement transfectées par les vecteurs flag-Bcl-xL, flag-Bcl-2 et flag-Mcl-1 sont immunoprécipités en utilisant le kit Anti Flag M2 affinity Gel (Sigma), à raison de 500µg de protéines totales selon les instructions du fabricant. L'éluat est repris en totalité avec 5% de β-mercapto-éthanol, avant dénaturation par chauffage 5 minutes à 95°C, et dépôt sur gel SDS/polyacrylamide pour le western blot. Des

immunoprécipitations sont également réalisées directement avec des anticorps dirigés contre les protéines endogènes E2F1 et pRb. Les culots cellulaires sont repris dans du tampon de lyse Chaps (HEPES 10mM ; NaCl 150mM ; 1% CHAPS ; pH7.4 ; cocktail d'inhibiteurs de protéases) auquel on a rajouté 0.5% de NP40 pendant 10 à 15 minutes sur glace. Le lysat est centrifugé 5min à 4°C à 12000 rpm et le surnageant est récupéré. Le surnageant est ensuite incubé pendant 1 heure à 4°C sous agitation avec 20 µL des billes de protéines G-agarose puis centrifugé 3min à 6000rpm. Le surnageant est alors incubé sur la nuit avec les anticorps spécifiques ou une IgG contrôle sous agitation à 4°C. Le lendemain, 25µL de billes de protéines G-agarose sont ajoutées pendant 1h à 4°C sous agitation. Le culot est ensuite lavé deux fois avec du tampon Chaps après centrifugation 2min à 3000rpm. Les protéines sont dissociées des billes par ajout du tampon d'élution (Tris-EDTA 10mM, 1mM pH 7.6) et dénaturées par ajout de 5% de β-mercapto-éthanol.

Extraction d'ARN et qPCR

Les cellules sont cultivées en flasque et traitées avec 2µM d'ABT-737 pendant différents temps. L'ARN total est isolé à l'aide du kit RNAeasy mini kit (Qiagen). La qualité des ARN est évaluée par analyse du ratio des ARN ribosomiques 28S:18S à l'aide du RNA 6000 Nano Assay kit et de l'Agilent Bioanalyser (Agilent Biotechnologies). La rétrotranscription (RT) est réalisée sur 1 µg d'ARN totaux auxquels sont ajoutés 1µL d'amorces hexamèriques aléatoires à 100µM dans un volume de 12µl. L'ensemble est incubé 10min à 70°C puis à 4°C. Ensuite, dNTPs (10mM), *Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen), Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) et le tampon réactionnel (Buffer 5X, Invitrogen) sont ajoutés à la réaction et l'ensemble réactionnel (20µl) est incubé 10min à 25°C, 1h à 50°C et 10min à 75°C. Les ADNc sont stockés à -20 °C. Un témoin de RT sans ARNs et une rétrotranscription à partir d'ARN universel servant de gamme étalon pour la PCR sont réalisés. Les amplifications d'ADNc des gènes étudiés sont réalisées par PCR en présence de SYBR Green avec l'appareil Stratagene Mx 3005P (Agilent Technologies). La PCR est réalisée dans un volume réactionnel de 25µl final, comprenant 2 µl d'ADNc de nos échantillons ou d'ADNc universel pour la gamme étalon, 2 µL d'amorces à 2,5µM, 12,5µL de Mix Taq SYBR Green (Stratagene) et 0,375µL de ROS au 1/500eme. En parallèle, la réaction PCR est réalisée à partir ADNc universel à différentes concentrations : 20, 10, 1, 0,1 et 0,01 µg. Le programme de PCR comporte 3 étapes : Une dénaturation initiale de 10min à 95°C, un programme d'amplification de 40 cycles (30s à 95°C, 30s à 60°C, 30s à 72°C), avec une lecture unique de la fluorescence du SYBR green en fin de chaque élongation, et un programme de courbe de fusion. La quantification relative de l'expression génique est réalisée par la méthode de

comparaison des CT (cycle seuil). L'analyse des résultats se fait à l'aide du logiciel Mx Pro et le niveau d'expression des gènes est normalisé avec les gènes de ménage endogènes RPLPO et β_2-microglobulin. Les amorces ont été choisies avec le logiciel Amplifix :

Gènes	Amorces sens	Amorces antisens
Noxa	GCTGGAAGTCGAGTGTGCTA	CCTGAGCAGAAGAGTTTGGA
p73	CTTCAACGAAGGACAGTCTG	AAGTTGTACAGGATGGTGGT
RPLPO	GATGACCAGCCCAAAGGAGA	GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT
β_2-microglobulin	GGCATCTTCAAACCTCCATGATG	TTCACCCCCACTGAAAAAGATGA

ChIP

Les cellules sont fixées avec du paraformaldehyde 1% directement ajouté dans le milieu pendant 8min à température ambiante. La réaction est stoppée par ajout de 10mL de solution de Glycine à 125mM. Les cellules sont ensuite lavées deux fois au PBS 1X froid, lysées dans 500µL de tampon de lyse (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1, 1 mM PMSF, 5 mM NaF, 5 mM Na3VO4, 2 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pestatin), et soniquées six fois pendant 20 secondes. Le surnageant est récupéré par centrifugation à 12000 rpm pendant 10min à 4°C et dilué, volume à volume, dans du tampon de dilution (1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.1). Le surnageant est ensuite incubé une heure à 4°C sous agitation en présence de 2 µg d'ADN de sperme de saumon et de 20 µL de protéines G-agarose recouverte d'ADN de sperme de saumon (Millipore). L'immunoprécipitation est effectuée sur la nuit avec les anticorps spécifiques ou une IgG contrôle sous agitation à 4°C. Le lendemain, 2µg d'ADN de sperme de saumon et 20 µL de protéines G-agarose recouverte d'ADN de sperme de saumon (Millipore) sont ajoutés pendant 1h à 4°C sous agitation. L'immunoprécipitat est lavé de manière séquentielle pendant 10min à chaque fois dans du TSE I (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 150 mM NaCl), TSE II (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 500 mM NaCl), et TSE III (250 mM LiCl, 1% NP-40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.1). Les billes précipitées sont lavées une fois avec du tampon TE et éluées une fois avec du tampon d'élution (1% SDS, 100 mM NaHCO3). Les éluats sont incubés à 65 °C pendant 6 heures pour reverser les liaisons formées par le paraformaldéhyde. L'ADN est ensuite précipité par procédure classique et amplifié par PCR. L'ADN obtenu est migré sur gel d'agarose 2%. Pour l'amplification par PCR, les amorces suivantes ont été utilisées :

Gènes	Amorces sens	Amorces antisens
Noxa IS	CGTCTAGTTTCCCTACGTC	AGATGCCAACTACACACG
p73 -1100	TGAGCCATGAAGATGTGC	GCTGCTTATGGTCTGATGCTTATG
p73 contrôle	CAATTGTCCCCCTCTTCTGA	GTGGCAGAAGGGTGCTTAAA
PLK1 IS	GTTTTCCCCGGCTGGGTCCG	AAGCTGCGCTGCAGACCTCG
PLK1 contrôle	TGTGCAGGTGGGTGTAGTTG	CCAGGCACAAGGCTAAGAGT

Activités luciférases

Les cellules sont transfectées par un vecteur d'expression de la β-galactosidase, contrôle de la transfection, et un vecteur d'expression de la luciférase, sous contrôle d'un promoteur p53RE (avec 5 boites d'élément de réponses consensus synthétiques à p53, Panomics), ou d'un promoteur minimal contrôle (Panomics), puis traitée 24h avec 2µM d'ABT-737 ou 50µM d'étoposide. Les cellules sont ensuite lysées par un tampon de lyse passif (PLB 1X, Promega), sous une forte agitation pendant 15min. L'activité de l'enzyme bio-luminescente luciférase est mesurée en luminomètre via le kit Dual-Luciferase® Reporter assay system (Promega), selon les instructions du fabricant. Cette activité est rapportée à l'activité avec le promoteur contrôle, et à l'activité β-galactosidase, comme contrôle de l'efficacité de transfection. L'activité β-galactosidase est mesurée en ajoutant à 50µL de lysat cellulaire, 50µL d'assay reporter 2X (Promega, contenant l'ONPG orthonitrophényl-β-D-galactopyrannoside, substrat de la β-galactosidase clivé en orthonitrophénol de couleur jaune). Dès l'apparition d'une coloration, la réaction est arrêtée par l'ajout de 150µL de sodium carbonate 1M, avant lecture de l'absorbance à 420nm.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont à chaque fois des tests t de student réalisés à l'aide du logiciel Prism. Une étoile * correspond à une probabilité de $p<0.05$, deux étoiles ** à $p<0.01$ et trois étoiles *** à $p<0.001$.

Annexe 2 : « Serum-Nutrient Starvation Induces Cell Death Mediated by Bax and Puma That Is Counteracted by p21 and Unmasked by Bcl-x(L) Inhibition »

Braun, Frédérique, Joséphine Bertin-Ciftci, Anne-Sophie Gallouet, Julie Millour, et Philippe Juin. 2011.

PloS One 6 (8): e23577. doi:10.1371/journal.pone.0023577.

p21$^{CIP/WAF1}$ est un membre de la famille des Cip/Kip, inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CDKi), impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et dans la survie. p21 est une protéine multifonctionnelle, particulièrement connue comme cible de p53 et médiateur principal de l'arrêt du cycle dépendant de p53 déclenché en réponse aux agents endommageant de l'ADN ou aux stress oncogéniques. Lors de dommages à l'ADN, p21 inhibe l'activité des CDK qui ne pourront plus phosphoryler leurs cibles, en particulier pRb/E2F1 ce qui entrainera un arrêt du cycle en G1. D'autres études ont montré que p21 pouvait avoir d'autres fonctions, en particulier, c'est un inhibiteur de l'apoptose induite lors de dommages à l'ADN. Les mécanismes par lesquels p21 favorise la survie cellulaire, ne sont pas encore totalement résolus. On peut cependant indiquer que la localisation de p21 dans la cellule semble participer à ces mécanismes. En effet, tout comme p53, p21 peut être nucléaire ou cytosolique. Dans le noyau, p21 peut inhiber l'apoptose en bloquant l'activité des CDK. Dans le cytoplasme, p21 peut se lier et inhiber la caspase 3. Cependant p21 pourrait aussi agir à d'autres niveaux de la machinerie apoptotique, en particulier, en interférant avec les protéines de la famille Bcl-2. Dans cette étude, nous analysons le rôle de p21, dans la mort cellulaire induite par la carence nutritive.

Résumé en français

L'ABT-737 est un analogue fonctionnel de l'ABT-263 (Navitoclax), un agent anticancéreux inhibiteur de différentes protéines de la famille Bcl-2, pour lequel une cytotoxicité a été enregistrée, dans certains contextes, lorsqu'il est utilisé en agent simple. L'ABT-737 en mimant la structure du domaine BH3 de Bad, inhibe la formation des complexes entre les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pour favoriser l'apoptose.

Dans notre étude, nous avons identifié un mécanisme additionnel, dépendant de la transcription, qui contribue à la sensibilité à l'ABT-737. Dans des cellules cancéreuses ayant un p53 non fonctionnel, on observe une induction de Noxa, protéine BH3-seul, dépendante des caspases, sous traitement à l'ABT-737. Cette induction est dépendante du facteur de transcription E2F1, présent sur le promoteur de Noxa, et, plus surprenant, de la protéine régulatrice d'E2F1, pRb, clivé par les caspases, lors du traitement à l'ABT-737.

De plus, nous avons montré que, dans des cellules cancéreuses ayant un p53 sauvage, la sensibilité à l'ABT-737 était dépendante de p53 et non d'E2F1. Dans ce cas, le rôle de p53, dans l'induction de l'apoptose par l'ABT-737, n'engage pas sa fonction transcriptionnelle.

Nous concluons que des facteurs de transcription, notamment p53 et E2F1, favorisent la sensibilité des cellules cancéreuses à l'ABT-737. L'utilisation, en clinique, de combinaisons composées de l'ABT-263 et de molécule activant les voies pRb/E2F1 ou p53, telle que la Nutlin-3, pourrait s'avérer particulièrement prometteuse.

Mots-clés : Apoptose, E2F1, pRb, p53, famille Bcl-2

Impact of pRb/E2F1 and p53 in ABT-737 treatment in cancer cells

Résumé en anglais

ABT-737 is a functional analogue of ABT-263 (Navitoclax), an anticancer agent inhibitor of some Bcl-2 homologues, for which monotherapy cytotoxicity has been reported in certain instances. ABT-737 by mimicking the BH3 domain structure of the BH3-only Bad, inhibits the formation of complexes between pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family members to trigger apoptosis.

In our study, we identify an additional, transcription dependent, mechanism that contributes to sensitivity to ABT-737. In cancer cells lacking functional p53, we observe a caspase dependent induction of Noxa, a BH3-only protein, upon treatment with ABT-737. This induction is dependent upon the transcription factor E2F-1 that occupied of the Noxa promoter and, strikingly, upon the E2F-1 regulatory protein pRb, cleaved by caspases upon ABT-737 treatment.

Moreover, we have shown that, in cancer cells with functional p53, the sensitivity to ABT-737 is dependent upon p53 and no upon E2F1. In this case, the role of p53, in apoptosis induction by ABT-737, does not require its transcriptional function.

Our data suggest that transcription factors, as p53 and E2F1, may allow to sensitive cancer cells to ABT-737. Thus, the use of drug that induced the pRb/E2F1 or p53 pathway, as Nutlin-3a, may have clinical utility in treatment of patient when combined with orally bioavailable compound ABT-263.

Key words: Apoptosis, E2F1, pRb, p53, Bcl-2 family