



# Remerciements

Il est coutume de dire que le parcours de la thèse est un chemin long et ardu, parsemé de doutes et d'incertitudes. D'un point de vue personnel, cela a été mon cas. Néanmoins, une chose dont j'ai toujours été sûr était que j'avais la chance de bénéficier d'un encadrement exceptionnel. Pour cela, j'aimerais remercier en premier lieu le Docteur Sophie Barillé-Nion, ma directrice de thèse, et le Docteur Philippe Juin, notre chef d'équipe.

Sophie, au cours de ces trois années (quatre si l'on compte de le master 2), tu as su manier un dosage subtil entre encadrement et liberté, apportant tes connaissances, ton expérience, tes idées d'un côté, me laissant toute la liberté de tester les miennes, et de développer mes compétences de l'autre. Tu m'as permis de progresser en prenant le temps d'analyser mes erreurs, et en partageant ta vision de la recherche. Merci Sophie pour ta patience. Philippe, le mélange entre cohésion, ambiance, rigueur scientifique, et stimulation intellectuelle que tu arrives à maintenir dans notre équipe est quelque chose que j'aurai, à mon avis, du mal à retrouver. J'ai également énormément appris à tes côtés, au labo comme en dehors, et, plus près du sol, tu m'as apporté les conditions matérielles nécessaires aux développements de nos idées et de mes compétences. Je pourrais continuer, mais vais en laisser un petit peu pour les doctorants à venir... Une grand merci donc à Sophie et Philippe, pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre soutien. Je serais très heureux de réussir à toucher du doigt les personnes que vous êtes, professionnellement et humainement.

Mes plus sincères remerciements sont adressés aux bénévoles de la ligue contre le cancer. C'est grâce à leur travail que j'ai pu effectuer ces trois années de thèse.

Je remercie les Docteurs Jacek Kubiak et Laurent Poulain, non seulement pour avoir été mes rapporteurs (ça n'a pas du être facile), mais aussi pour avoir pris le temps de m'expliquer précisément leurs remarques et autres corrections : une vraie preuve de considération et de générosité, mais aussi une bonne surprise de fin de thèse. Je remercie également le Professeur Régis Bataille, et le Docteur Olivier Gavet, pour avoir accepté d'être examinateur. Vous solliciter pour évaluer mon travail s'est imposé très naturellement, merci à tous d'avoir accepté.

Je tiens à remercier les Docteurs François Paris et Claude Prigent pour avoir bien voulu faire partie de mon comité de suivi. Un remerciement de plus à Claude Prigent pour avoir organisé un excellent congrès sur le cycle cellulaire (Saint-Malo, 2011), auquel j'ai eu la chance d'assister.

Tous mes respects à Philippe Hulin pour m'avoir tant appris. Merci Philippe pour m'avoir permis, non sans humour, de réaliser mon travail.

Toute ma gratitude au Docteur Anthony Letai, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Dans le même laboratoire, je remercie également Jeremy Ryan et Joan Montero.

Je n'oublie pas le Docteur François Valette, qui originellement m'a accueilli dans son équipe lorsque je suis arrivé à Nantes. Merci François pour avoir partagé vos connaissances et votre expérience, dans le domaine de la science mais pas que, et aussi pour votre franchise et vos analyses toujours sans concession.

Je remercie les deux personnes qui m'ont fait entrer dans le milieu de la recherche : le Professeur Olivier Coqueret, et aussi Soph (si si) ; le Professeur Olivier Coqueret pour m'avoir donné la chance d'intégrer son équipe en master 1, et Soph... d'abord parce que SDCTDC, aussi parce que tu m'as enseigné de bons réflexes de travail (j'espère les avoir gardé), mais surtout parce que la passion que tu mets dans ton boulot est ultra-contagieuse (je crois que l'OMS est sur le coup).

Dans notre équipe, j'adresse un ÉNORME merci à Fabien, pas seulement parce que, comme moi, tu es angevin, surtout parce que tu m'a permis de réfléchir sur ce qui m'intéressait vraiment, mais aussi pour tout le reste. Tout pareil à Céline, même si tu n'es pas angevine... mais ça se soigne ☺. Plus sérieusement, merci Céline, tu m'as énormément aidé pendant ces quatre ans, que ce soit pour faire marcher des manipes, ou me remonter le moral quand elles ne marchaient pas. Remerciements tout particuliers à Cécile, dire que ta présence dans l'équipe me manque résume bien la situation, il y a vraiment eu un avant et un après ton arrivée. Merci à Fred et Fred, une à remplacer l'autre, et je cherche toujours à déterminer qui est la plus cool des deux. Fred B, c'était vraiment sympa de travailler avec toi. Merci à Laurent, d'abord parce que tu poses les bonnes questions (déstabilisant au départ mais très profitable au final), et ensuite parce que, maintenant, grâce à toi, je suis certain que je m'appelle nouridine et pas nouredine. Je remercie aussi Céline, tu fais un boulot énorme, et c'est super stimulant pour les gens qui t'entourent ; j'ai vraiment hâte de voir le résultat des deux années à venir. Concernant notre équipe, quoi de plus agréable que de terminer par Éloïse, Janic et Jessie : ensemble bien supérieur à la simple

somme des parties ; je ne détaille pas individuellement, mais peut-être arriverai-je, un jour, à vous faire comprendre à quel point cela a été un plaisir de passer du temps avec vous.

Parmi les anciens membres de l'équipe, je remercie CG (prononcé sidji), Grégoire, Joséphine et Yan-nis, des personnes qui, même si elles n'en avaient pas conscience, m'ont beaucoup influencé.

Remerciement spécial à mon poto Quentin Sexy Séry, ma meilleure surprise de l'année 2009, même si j'ai l'impression de le connaître depuis toujours. Tout autant à Vincent Mignardture, même s'il est arrivé un peu plus tard. Un grand merci à vous les gars, ça aurait été triste sans vous, j'espère qu'on vivra encore beaucoup de choses ensemble.

Merci aux minorités visibles : Arulraj (héhé), Fella, Kamel et Mazène.

Une petite pensée pour l'équipe 9. Merci à Jean Menanteau et PEF pour les pots du vendredi midi. Merci aussi à Lisa, Claire, Betty, Mathilde, Romain et Christelle.

Dans l'équipe 10, je remercie Christelle, Géraldine, Sophie (oui une autre), Patricia, et bien sûr une grosse bise à Charole +1,55 avec quelques kg de plus.

Merci aussi à l'équipe 14 : Audrey, Denis, Rym, Sophia et Vincent.

Big up à Martine, Nathalie, et Stéphane, je n'oublie pas que c'était vous qui me prêtiez vos clés lorsque j'arrivais à 7 h en master 2.

Spéciale dédicace à Victor et Pierre, Juju, Yaumegui, Yves-Pierre, Jojo, Raillon, les familles Cosson et Latron, Dédé, et Lisa.

Pour finir, je remercie mes parents, sans qui je ne serais pas là (très drôle!), toute ma famille (ça fait du monde), et bien évidemment mon petit frère.

# Introduction générale

Le cancer du sein est le type de cancer le plus fréquent chez la femme, mais aussi un des types de cancer les plus hétérogènes [1]. De cette hétérogénéité découle une prise en charge des patients de plus en plus personnalisée, qui a pour objectif d'améliorer la réponse au traitement. Les progrès effectués jusqu'à présent font du cancer du sein une maladie relativement bien traitée, avec un taux de survie des patients entre 80 et 90 % après 5 ans, et un traitement associé à une qualité de vie acceptable. Brièvement, la prise en charge thérapeutique du cancer du sein place la chirurgie, et la radiothérapie, en première ligne de défense. Ces actions sont suivies par des traitements systémiques, basés sur l'hormonothérapie, ou sur l'utilisation du trastuzumab (anticorps humanisé ciblant l'oncogène HER-2), pour les patients éligibles, accompagnés d'un « renforcement » par une chimiothérapie classique. Les patients non éligibles, et les patients atteints de métastases, reçoivent, eux, exclusivement une chimiothérapie systémique. La chimiothérapie classique est également utilisée, dans certains cas, avant la chirurgie et la radiothérapie afin de diminuer le volume tumorale avant intervention. Cependant l'apparition de rechutes, et résistances, est fréquemment observée suite au traitement. Ceci, associé à l'induction d'une toxicité, représente une sérieuse limitation à l'utilisation de la chimiothérapie. L'opposition entre la place importante de la chimiothérapie dans le traitement du cancer du sein, et les différents problèmes qu'elle pose, illustre la nécessité de comprendre et améliorer ses mécanismes d'action.

Les taxanes, et son représentant le plus connu, le paclitaxel, sont des composés très fréquemment utilisés en chimiothérapie dans le cas du cancer du sein, mais aussi pour beaucoup d'autres types de cancer. Ces composés sont des « poisons des microtubules », qui se lient à ces derniers, et perturbent leur équilibre dynamique d'allongement et raccourcissement [2]. L'importance des microtubules, pour la séparation du matériel génétique en mitose, fait que le traitement par les taxanes provoque un arrêt en mitose des cellules, et induit la mort. D'un point de vue moléculaire, l'arrêt mitotique est du à la présence d'un mécanisme cellulaire physiologique : le point de contrôle mitotique, qui s'assure de la séparation équitable du matériel génétique. Plus précisément, le point de contrôle mitotique inhibe la dégradation de la cycline B, ce qui maintient l'activité de Cdk1, et empêche la sortie de mitose. Un des mécanismes de résistance connu repose sur la circonvolution du point de contrôle mitotique, permettant l'échappement des cellules à cet arrêt mitotique. Ce processus d'échappement aboutit à une sortie

de mitose sans division cellulaire, et produit des cellules polyploïdes. De récentes études ont présenté un modèle rendant compte de la survenue, ou non, de l'échappement à l'arrêt mitotique [3]. Ce modèle, nommé « modèle des réseaux compétitifs », propose que la survenue de l'échappement à l'arrêt mitotique est déterminé par la compétition entre deux types de signaux :

- des signaux de mort cellulaire générés au cours de l'arrêt mitotique ;
- des signaux d'échappement à l'arrêt mitotique reposant sur la dégradation de la cycline B.

L'atteinte, par ces signaux, de leur seuil d'induction respectif provoquera la mort ou l'échappement de manière exclusive.

L'apoptose est un mécanisme de suicide cellulaire indispensable à la vie, et dérégulé dans de nombreuses pathologies, comme le cancer. La survenue de l'apoptose est déterminée par une balance entre des signaux de survie cellulaire, et des signaux de mort. Certains des régulateurs majeurs de cette balance sont représentés par les protéines de la famille de Bcl-2, qui constituent un centre décisionnel de l'induction de l'apoptose [4]. La source de l'accumulation de signaux de mort au cours de l'arrêt mitotique, ainsi que la nature de ces signaux, sont jusqu'à présent incomplètement comprises. La question de l'implication des protéines de cette famille dans la mort qui suit l'arrêt mitotique se pose alors naturellement.

Les travaux présentés ici montrent qu'une amélioration du traitement par les taxanes, peut passer par le ciblage des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Au cours de la première partie d'introduction, nous présenterons successivement :

1. le concept de point de contrôle mitotique, et son implication dans le traitement par les taxanes ;
2. les grandes lignes de la pathologie du cancer du sein, et surtout l'importance des taxanes dans le traitement de cette maladie ;
3. les protéines de la famille de Bcl-2, et précisément le rôle que ces dernières sont en mesure de jouer au cours de l'arrêt mitotique.

Cette première partie d'introduction sera classiquement suivie de la présentation des techniques utilisées, de celle des résultats obtenus, et enfin de la discussion de ces résultats.

# Table des matières

<b>I Introduction</b>	<b>2</b>
<b>1 Le point de contrôle mitotique</b>	<b>3</b>
1.1 La régulation de l'entrée en mitose . . . . .	3
1.1.1 Régulation du cycle cellulaire par les couples cyclines-Cdk . . . . .	3
1.1.2 Importance des cyclines et Cdk mitotiques . . . . .	5
1.1.2.1 Cdk1 : maître régulateur du cycle cellulaire . . . . .	5
1.1.2.2 Les cyclines de type A et B . . . . .	6
1.1.3 Les mécanismes d'entrée en mitose . . . . .	7
1.1.3.1 Activation de Cdk1 . . . . .	7
1.1.3.2 Relocalisation du complexe cycline B1-Cdk1 . . . . .	7
1.2 Les différentes phases de la mitose . . . . .	9
1.3 Contrôle de l'initiation de l'anaphase par le point de contrôle mitotique . . . . .	10
1.3.1 L'initiation de l'anaphase est induite par l'APC/C . . . . .	12
1.3.2 Cdc20 est le coactivateur de l'APC/C pendant la mitose . . . . .	12
1.3.3 Formation du complexe du point de contrôle mitotique . . . . .	13
1.3.4 Composants additionnels du point de contrôle mitotique . . . . .	15
1.4 Importance des microtubules pour la mitose . . . . .	17
1.4.1 L'appareil mitotique se compose de microtubules . . . . .	18
1.4.2 Le kinétochore aide au transport des chromosomes . . . . .	19
1.4.3 Les centrosomes dirigent la mitose . . . . .	19
1.4.4 Protéines motrices et dynamique des microtubules . . . . .	20
1.5 Poisons des microtubules et modèle des réseaux compétitifs . . . . .	21
1.5.1 Poisons des microtubules . . . . .	21
1.5.2 Mécanismes de résistance aux taxanes . . . . .	22
1.5.2.1 La MDR comme mécanisme de résistance . . . . .	22
1.5.2.2 Résistance associée à des altérations du système tubuline/microtubule . . . . .	23
1.5.2.3 Résistance associée au statut de p53 . . . . .	23

1.5.3	Le paclitaxel induit l'arrêt mitotique . . . . .	24
1.5.4	Le paclitaxel induit plusieurs devenir cellulaires . . . . .	24
1.5.5	Le modèle des réseaux compétitifs . . . . .	26
1.5.6	Caractéristiques de la mort post-échappement et de la mort mitotique . . . . .	27
<b>2</b>	<b>Le cancer du sein</b>	<b>30</b>
2.1	Physiologie et développement du sein . . . . .	30
2.1.1	Physiologie des glandes mammaires . . . . .	30
2.1.2	Développement du sein . . . . .	31
2.2	Régulation de la croissance du cancer sein . . . . .	34
2.3	Classification des cancers du sein . . . . .	38
2.3.1	Sous-types histologiques . . . . .	38
2.3.2	Classification moléculaire . . . . .	40
2.3.3	Place des cellules souches cancéreuses dans la classification . . . . .	42
2.3.4	Limite de la classification : cas du cancer du sein triple négatif . . . . .	42
2.4	Stades et grades du cancer du sein . . . . .	43
2.4.1	Les stades cliniques du cancer du sein . . . . .	43
2.4.2	Les grades anatomopathologiques du cancer du sein . . . . .	45
2.5	Aspects pathologiques du cancer du sein . . . . .	45
2.5.1	Épidémiologie du cancer du sein . . . . .	45
2.5.2	Facteurs de risque . . . . .	46
2.6	Chimiothérapie utilisée dans le traitement du cancer du sein . . . . .	47
2.6.1	Modes d'action . . . . .	47
2.6.2	Importance du paclitaxel . . . . .	49
2.7	Le paclitaxel dans le cancer du sein métastatique . . . . .	49
2.7.1	Le paclitaxel en agent simple . . . . .	51
2.7.2	Le paclitaxel en combinaison avec d'autres agents . . . . .	52
2.8	Le paclitaxel dans les stades précoces du cancer du sein . . . . .	53
2.8.1	Le paclitaxel en tant que traitement adjuvant . . . . .	53
2.8.2	Le paclitaxel en tant que traitement néoadjuvant . . . . .	53
<b>3</b>	<b>Les protéines de la famille de Bcl-2</b>	<b>54</b>
3.1	Régulation de l'apoptose par les protéines de la famille de Bcl-2 . . . . .	54
3.2	Interactions des protéines de la famille de Bcl-2 et significativité fonctionnelle . . . . .	56
3.2.1	Interactions parmi les protéines de la famille de Bcl-2 . . . . .	56
3.2.2	Importance des domaines BH dans les interactions protéiques . . . . .	58

3.2.3	Interactions entre les protéines de la famille de Bcl-2 et d'autres molécules . . . . .	60
3.2.3.1	Régulation des protéines de la famille de Bcl-2 par des protéines étrangères à la famille . . . . .	60
3.2.3.2	Participation des protéines de la famille de Bcl-2 à de multiples fonctions via des liaisons à d'autres protéines . . . . .	60
3.3	Régulation des protéines de la famille de Bcl-2 . . . . .	61
3.3.1	Régulation de l'expression transcriptionnelle . . . . .	61
3.3.2	Régulation de l'épissage alternatif . . . . .	61
3.3.3	Régulation par des modifications post-traductionnelles . . . . .	61
3.3.3.1	Changements de localisations subcellulaires résultant de modifications post- traductionnelles . . . . .	62
3.3.3.2	Changements de fonction résultant de modifications post-traductionnelles	63
3.4	Mécanismes moléculaires du contrôle de l'activation de Bax et Bak à la mitochondrie . . .	63
3.5	Rôles physiologiques des protéines de la famille de Bcl-2 . . . . .	66
3.5.1	Rôle dans la régulation de l'apoptose . . . . .	66
3.5.2	Rôle dans la régulation du cycle cellulaire . . . . .	67
3.6	Rôle des protéines de la famille de Bcl-2 dans la biologie du cancer et le développement des stratégies thérapeutiques basées sur les BH3 . . . . .	68
3.7	Rôle des protéines de la famille de Bcl-2 dans la résistance au paclitaxel . . . . .	69
3.8	Rôle des protéines de la famille de Bcl-2 durant l'arrêt mitotique et l'échappement à l'arrêt mitotique . . . . .	70
<b>4</b>	<b>Justification du sujet</b>	<b>74</b>
<b>II</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>76</b>
<b>1</b>	<b>Culture cellulaire et traitements</b>	<b>77</b>
<b>2</b>	<b>ARN interférence</b>	<b>79</b>
<b>3</b>	<b>« Reverse transcription quantitative polymerisation chain reaction »</b>	<b>81</b>
3.1	« Reverse Transcription » . . . . .	81
3.2	qPCR . . . . .	82
<b>4</b>	<b>Immunoblot</b>	<b>84</b>
<b>5</b>	<b>Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux</b>	<b>86</b>

<b>6</b>	<b>Analyse de l'apoptose par cytométrie en flux</b>	<b>87</b>
6.1	Simple marquage APO2.7 . . . . .	87
6.2	Double marquage annexine V-iodure de propidium . . . . .	87
<b>7</b>	<b>Profilage BH3</b>	<b>88</b>
7.1	Exposition aux peptides BH3 . . . . .	88
7.2	Marquage du cytochrome <i>c</i> . . . . .	88
7.3	Contrôles et calcul de la libération de cytochrome <i>c</i> . . . . .	88
<b>8</b>	<b>Analyse par vidéomicroscopie</b>	<b>90</b>
8.1	Analyse dynamique du devenir cellulaire par vidéomicroscopie . . . . .	90
8.1.1	Infection . . . . .	90
8.1.2	Acquisition . . . . .	90
8.2	Analyse dynamique de la perméabilisation mitochondriale par vidéomicroscopie confocale	91
8.2.1	Infection et ensemencement . . . . .	91
8.2.2	Acquisition . . . . .	91
<b>9</b>	<b>Analyse d'interactions par « Bioluminescence Resonance Energy Transfer »</b>	<b>92</b>
<b>III Résultats</b>		<b>93</b>
<b>1</b>	<b>Arrêt mitotique et induction de mort par l'extinction de Cdc20 ou le traitement au paclitaxel</b>	<b>94</b>
1.1	Détection quantitative de l'arrêt mitotique . . . . .	94
1.2	L'extinction de Cdc20 induit un arrêt mitotique soutenu et le paclitaxel un arrêt mitotique transitoire . . . . .	97
1.3	L'arrêt mitotique induit par Cdc20 aboutit à la mort cellulaire partielle . . . . .	100
1.4	L'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 provoque une mort indépendante des caspases . . . . .	101
<b>2</b>	<b>Implication des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 dans l'arrêt mitotique</b>	<b>104</b>
2.1	L'arrêt mitotique module l'amorçage cellulaire et révèle une dépendance à Bcl-x <sub>L</sub> . . . . .	104
2.2	Dans un contexte d'arrêt mitotique, les extinctions de Bcl-x <sub>L</sub> ou Mcl-1 convertissent la mort en apoptose classique (« switch ») . . . . .	108
<b>3</b>	<b>Bcl-x<sub>L</sub> protège la mort mitotique et de la mort post-échappement</b>	<b>118</b>
3.1	Observation de la mort mitotique et de l'échappement à l'arrêt mitotique par vidéomicroscopie . . . . .	118
3.2	L'extinction de Bcl-x <sub>L</sub> induit la mort mitotique suite à l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel	120

3.3	Bcl-x <sub>L</sub> protège de la mort mitotique et de l'échappement à l'arrêt mitotique induits par le paclitaxel . . . . .	124
3.4	Bcl-x <sub>L</sub> prolonge l'activité de Cdk1 . . . . .	125
3.5	Bcl-x <sub>L</sub> bloque les cellules MCF-7 en interphase . . . . .	128
3.6	Bcl-2, Bcl-2 ou Bcl-w sont nécessaires à la survie des cellules tétraploïdes . . . . .	130
<b>4</b>	<b>Modifications post-traductionnelles des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2</b>	<b>133</b>
4.1	L'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 provoque des modifications post-traductionnelles de Bcl-2, Bcl-x <sub>L</sub> et Mcl-1 . . . . .	133
4.2	L'arrêt mitotique induit par le paclitaxel provoque des modifications post-traductionnelles de Bcl-2, Bcl-x <sub>L</sub> et Mcl-1 . . . . .	134
4.3	L'arrêt mitotique induit la phosphorylation de Bcl-x <sub>L</sub> sur la sérine 62 . . . . .	135
<b>5</b>	<b>Protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 impliquées dans la mort mitotique</b>	<b>137</b>
5.1	Bax est nécessaire à la mort mitotique induite par l'inhibition de Bcl-x <sub>L</sub> . . . . .	137
5.2	La phosphorylation de Bcl-x <sub>L</sub> sur la sérine 62 influe sur son interaction avec Bax . . . . .	140
5.3	La mort induite par le paclitaxel n'est pas dépendante de Bim . . . . .	141
5.4	Le paclitaxel induit l'expression de Noxa . . . . .	143
<b>6</b>	<b>Perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie</b>	<b>146</b>
6.1	Observation de la perméabilisation mitochondriale . . . . .	146
6.2	Automatisation de l'analyse par l'utilisation de la technologie Cytoo® . . . . .	148
<b>7</b>	<b>Six1 comme facteur de résistance au paclitaxel ?</b>	<b>150</b>
7.1	Six1 favorise le maintien de l'arrêt mitotique . . . . .	150
7.2	Six1 protège de la mort induite par le paclitaxel . . . . .	151
<b>IV</b>	<b>Article</b>	<b>154</b>
<b>V</b>	<b>Discussion</b>	<b>155</b>
<b>VI</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>169</b>

# Liste des abbréviations

ABC .....	ATP- <b>b</b> inding cassette
ABT-263.....	Composé <b>263</b> des laboratoires <b>Abott</b>
ABT-737.....	Composé <b>737</b> des laboratoires <b>Abott</b>
ABT-199.....	Composé <b>199</b> des laboratoires <b>Abott</b>
ACTB1 .....	<b>Actin <math>\beta</math>1</b>
ADN.....	<b>Acide désoxyribonucléique</b>
ADNC .....	<b>Acide désoxyribonucléique complémentaire</b>
APAF-1 .....	<b>Adaptater molecule apoptosis protease acivating factor 1</b>
APC/C .....	<b>Anaphase-promoting complex/cyclosome</b>
APC1 .....	<b>Anaphase-promoting complex subunit 1</b>
ARN .....	<b>Acide ribonucléique</b>
ARNM.....	<b>ARN messenger</b>
ATCC.....	<b>American type culture collection</b>
A1 .....	<b>Bcl-2-related protein A1</b>
AURORA B ....	<b>Aurora kinase B</b>
AZD1152.....	<b>Astrazeneca drug 1152</b>
BAD.....	<b>Bcl-2 associated d</b>
BAK.....	<b>Bcl-2 associated k</b>
BAR .....	<b>Bifunctional apoptosis regulator</b>
BAX.....	<b>Bcl-2 associated x</b>
BCL-B .....	<b>Bcl-2 protein B</b>
BCL-2.....	<b>B cell lymphoma 2</b>
BCL-W.....	<b>B cell lymphoma w</b>
BCL-X <sub>L</sub> .....	<b>B cell lymphoma extra large</b>

BCL-X <sub>S</sub> .....	<b>B</b> cell lymphoma extra small
BCRP.....	<b>B</b> reast <b>c</b> ancer <b>r</b> esistance <b>p</b> rotein
BH.....	<b>B</b> cl-2 <b>h</b> omology
BH2.....	<b>B</b> cl-2 <b>h</b> omology <b>2</b>
BH4.....	<b>B</b> cl-2 <b>h</b> omology <b>4</b>
BH3.....	<b>B</b> cl-2 <b>h</b> omology <b>3</b>
BH3-ONLY....	<b>B</b> cl-2 <b>h</b> omology <b>3</b> - <b>o</b> nly
BH1.....	<b>B</b> cl-2 <b>h</b> omology <b>1</b>
BID.....	<b>B</b> H3-interacting domain <b>d</b> eath agonist
BIF-1.....	<b>B</b> ax-interacting <b>f</b> actor <b>1</b>
BIK.....	<b>B</b> cl-2-interacting <b>k</b> iller
BIM.....	<b>B</b> cl2-interacting <b>m</b> ediator of cell death
BIM <sub>EL</sub> .....	<b>B</b> im <b>e</b> xtra-long
BIM <sub>L</sub> .....	<b>B</b> im <b>l</b> ong
BIM <sub>S</sub> .....	<b>B</b> im <b>s</b> hort
BMF.....	<b>B</b> cl-2- <b>m</b> odifying <b>f</b> actor
BOK.....	<b>B</b> cl-2-related <b>o</b> varian <b>k</b> iller
BRCA2.....	<b>B</b> reast <b>c</b> ancer type <b>2</b> susceptibility protein
BRCA1.....	<b>B</b> reast <b>c</b> ancer type <b>1</b> susceptibility protein
BRET.....	<b>B</b> ioluminescence <b>r</b> esonance <b>e</b> nergy <b>t</b> ransfer
BSA.....	<b>B</b> ovine <b>s</b> erum <b>a</b> lbumine
BUBR1.....	<b>B</b> udding <b>u</b> ninhibited by <b>b</b> enzimidazoles <b>r</b> elated <b>1</b>
BUB3.....	<b>B</b> udding <b>u</b> ninhibited by <b>b</b> enzimidazoles <b>3</b>
BUB1.....	<b>B</b> udding <b>u</b> ninhibited by <b>b</b> enzimidazoles <b>1</b>
CAD.....	<b>C</b> aspase- <b>a</b> ctivated <b>D</b> Nase
CAL-51.....	<b>C</b> entre <b>A</b> ntoine <b>L</b> acassagne <b>51</b>
CASPASE-2....	<b>C</b> ysteine <b>p</b> rotease <b>c</b> leaving <b>a</b> fter <b>a</b> sp <b>2</b>
CASPASE-8....	<b>C</b> ysteine <b>p</b> rotease <b>c</b> leaving <b>a</b> fter <b>a</b> sp <b>8</b>
CASPASE-9....	<b>C</b> ysteine <b>p</b> rotease <b>c</b> leaving <b>a</b> fter <b>a</b> sp <b>9</b>
CASPASE-7....	<b>C</b> ysteine <b>p</b> rotease <b>c</b> leaving <b>a</b> fter <b>a</b> sp <b>7</b>

CASPASE-3 . . . . .	<b>Cysteine protease cleaving after asp 3</b>
CDC20 . . . . .	<b>Cell-division-cycle 20</b> homologue
CDC25C . . . . .	<b>Cell division cycle 25 c</b>
CDC20 . . . . .	<b>Cell-division-cycle 20</b> homologue gene
CD24 . . . . .	<b>Cluster of differentiation 24</b>
CDH1 . . . . .	<b>Cdc20 homolog 1</b>
CDK . . . . .	<b>Cyclin-dependant kinases</b>
CDK2 . . . . .	<b>Cyclin-dependant kinase 2</b>
CDK11 . . . . .	<b>Cyclin-dependant kinase 11</b>
CDK4 . . . . .	<b>Cyclin-dependant kinase 4</b>
CDK7 . . . . .	<b>Cyclin-dependant kinase 7</b>
CDK6 . . . . .	<b>Cyclin-dependant kinase 6</b>
CDK1 . . . . .	<b>Cyclin-dependant kinase 1</b>
CD44 . . . . .	<b>Cluster of differentiation 44</b>
CENP-A . . . . .	<b>Centromere protein-A</b>
CENP-E . . . . .	<b>Centromere protein-E</b>
CHIP . . . . .	<b>Chromatin immunoprecipitation</b>
C-MAD2 . . . . .	<b>Closed-MAD2</b>
C-MYC . . . . .	<b>cellular-Myelocytose</b>
CRM1 . . . . .	<b>Chromosome region maintenance 1</b> protein homolog
C-TERMINALE	<b>Carboxy-terminale</b>
DAP5 . . . . .	<b>Death-associated protein 5</b>
DAPI . . . . .	<b>4',6'-diamidino-2-phénylindole</b>
D-BOX . . . . .	<b>Destruction-box</b> motif
DLD-1 . . . . .	<b>D. L. Dexter 1</b>
DMEM . . . . .	<b>Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium</b>
DMSO . . . . .	<b>Diméthylsulfoxyde</b>
dNTP . . . . .	<b>Deoxyribonucleotide triphosphate</b>
DTEB . . . . .	<b>Derived from trehalose experimental buffer</b>
E2F . . . . .	<b>E2 promoter binding factor</b>

E2F-1 .....	<b>E2</b> promoter binding factor <b>1</b>
EDTA.....	Acide <b>éthylène diamine tétraacétique</b>
KIF11 .....	<b>Kinesin family member 11</b>
EGF .....	Epidermal <b>growth factor</b>
EGFR.....	Epidermal <b>growth factor receptor</b>
EGTA.....	Acide <b>éthylène glycol tétraacétique</b>
ER .....	Estrogen <b>receptor</b>
ERK .....	Extracellular signal <b>regulated kinase</b>
EYA2 .....	<b>Eyes absent homolog 2</b>
FAS.....	Apoptosis <b>stimulating fragment</b>
FBW7.....	<b>F-box/WD repeat-containing protein 7</b>
FGF.....	Fibroblast <b>growth factor</b>
FITC.....	Fluorescein <b>isothiocyanate</b>
GATA-3.....	<b>Guanosine-adenosine-thymidine-adenosine binding protein 3</b>
G <sub>2</sub> .....	<b>Gap 2</b>
GFP .....	<b>Green fluorescent protein</b>
GM-130 .....	<b>Golgi matrix protein 130</b>
GM-CSF .....	<b>Granulocyte macrophage CSF</b>
GTP .....	<b>Guanosine triphosphate</b>
G <sub>1</sub> .....	<b>Gap 1</b>
G <sub>0</sub> .....	<b>Gap 0</b>
HCT116.....	<b>Human colon tumor 116</b>
HELA.....	<b>Henrietta Lacks</b>
HEPES .....	Acide 4-(2- <b>hydroxyéthyl</b> )-1- <b>pipérazine éthane sulfonique</b>
HER-2.....	<b>Human epidermal growth factor receptor-2</b>
ERBB2 .....	V- <b>erb-b2</b> avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog <b>2</b>
HPRT1 .....	<b>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</b>
HRK.....	<b>Harakiri</b>
HRP .....	<b>Horseradish peroxidase</b>
HT29 .....	<b>Human tumor 29</b>

IAP .....	Inhibitor of <b>ap</b> optosis
ICAD .....	Inhibitor of <b>CAD</b>
IC <sub>50</sub> .....	Median ( <b>50</b> %) inhibition concentration
IGF-2.....	Insulin-like <b>g</b> rowth factor <b>2</b>
IGF-1.....	Insulin-like <b>g</b> rowth factor <b>1</b>
INCENP.....	<b>I</b> nner <b>cent</b> romere <b>p</b> rotein
IP .....	Iodure de <b>p</b> ropidium
IRES .....	<b>I</b> nternal <b>ribosome e</b> entry <b>s</b> ite
JNK.....	<b>J</b> anuns <b>k</b> inase
KEN-BOX.....	Lysine( <b>K</b> )-glutamic acid( <b>E</b> )-asparagine( <b>N</b> )- <b>box</b>
K.O. ....	<b>K</b> nock <b>o</b> ut
M.....	<b>M</b> itosis
MAD2.....	<b>M</b> itotic <b>arrest d</b> eficient homologue <b>2</b>
MAD1 .....	<b>M</b> itotic <b>arrest d</b> eficient homologue <b>1</b>
MAP.....	<b>M</b> icrotubule <b>a</b> ssociated <b>p</b> rotein
MAPK.....	<b>M</b> itogen- <b>a</b> ctivated <b>p</b> rotein <b>k</b> inase
MAP4 .....	<b>M</b> icrotubule- <b>a</b> ssociated <b>p</b> rotein <b>4</b>
MCAK.....	<b>M</b> itotic <b>cent</b> romere- <b>a</b> ssociated <b>k</b> inesin
MCF-7 .....	<b>M</b> ichigan <b>c</b> ancer <b>f</b> oundation- <b>7</b>
MCHERRY.....	<b>M</b> onomeric <b>cherry</b>
MCL-1 .....	<b>M</b> yeloid <b>c</b> ell <b>l</b> eukemia- <b>1</b>
MCL-1L .....	<b>Mcl-1</b> long
MCL-1S.....	<b>Mcl-1</b> short
MCM21 .....	<b>M</b> inichromosome <b>m</b> aintenance protein <b>21</b>
MDA-MB-231	<b>M.D.</b> Anderson <b>met</b> astatic <b>b</b> reast <b>231</b>
MDR .....	<b>M</b> ultidrug <b>r</b> esistance
MDR-1.....	<b>M</b> ultidrug <b>r</b> esistance protein <b>1</b>
MFN2 .....	<b>M</b> itofusin <b>2</b>
MFN1 .....	<b>M</b> itofusin <b>1</b>
MOI .....	<b>M</b> ultiplicity <b>o</b> f <b>i</b> nfection

MOMP .....	Mitochondrial <b>o</b> uter- <b>m</b> embrane <b>p</b> ermeabilization
MPM-2.....	Mitotic <b>p</b> rotein <b>m</b> onoclonal <b>2</b>
MPS1.....	Monopolar <b>s</b> pindle <b>1</b>
MRP1 .....	Multidrug resistance <b>p</b> rotein <b>1</b>
MTS .....	Mitochondrial <b>t</b> argeting <b>s</b> equence
NOXA .....	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 ( <b>noxa</b> pour « dommage » en latin)
NOXA.....	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 ( <b>noxa</b> pour « dommage » en latin) gene
N-TERMINALE	Amino( <b>N</b> )- <b>t</b> erminale
OLIGO(DT) <sub>18</sub> .	Oligo <b>d</b> eoxythymine ( <b>18</b> )
O-MAD2 .....	Open- <b>MAD2</b>
HTRA2/OMI ..	High temperature requirement protein <b>A2</b> /Omi
PBS.....	Phosphate <b>b</b> uffered <b>s</b> aline
P53 .....	Protein <b>53</b> kDa
P21 .....	protein <b>21</b>
PDGF .....	Platelet- <b>d</b> erived <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
P-GP.....	<b>P</b> -glycoprotein
PH .....	Potentiel <b>h</b> ydrogène
PH2AX.....	Phosphorylated <b>h</b> istone <b>2AX</b>
PI3K.....	Phosphoinositide <b>3</b> kinase
PLK3 .....	Polo <b>k</b> inase <b>3</b>
PLK1 .....	Polo <b>k</b> inase <b>1</b>
PMSF.....	phenyl <b>m</b> ethylsulfonyl fluoride
PP2A .....	Protein <b>p</b> hosphatase <b>2 A</b>
PP1 .....	Protein <b>p</b> hosphatase <b>1</b>
PR .....	Progesterone <b>r</b> eceptor
PRB .....	Retinoblastoma <b>p</b> rotein
P73 .....	Protein <b>73</b> kDa
P38 .....	Protein <b>38</b> kDa

PUMA .....	<b>p53 upregulated modulator of apoptosis</b>
PVDF .....	<b>Polyvinylidene fluoride</b>
QPCR .....	<b>Quantitative polymerisation chain reaction</b>
14-3-3 .....	<b>14th fraction, positions 3 and 3</b>
Q-VD-OPH...	<b>Quinoline-ValineV-Asparatate(D)-O-phenoxy</b>
RAF .....	<b>Rapidly accelerated fibrosarcoma</b>
RAS .....	<b>Rat sarcoma</b>
RB1 .....	<b>Retinoblastoma 1</b>
RFP .....	<b>Red fluorescent protein</b>
RLUC .....	<b><i>Renilla reniformis</i> luciferase</b>
RMN .....	<b>Résonance magnétique nucléaire</b>
RNA .....	<b>Ribonucleic acid</b>
RPE-1 .....	<b>Retinal pigment epithelial 1</b>
RPLP0 .....	<b>Ribosomal protein large P0</b>
RPMI .....	<b>Roswell park memorial institute medium</b>
RT .....	<b>Reverse transcription</b>
RT-QPCR .....	<b>Reverse transcription quantitative polymerisation chain reaction</b>
RZZ .....	<b>Rod-Zw10-Zwilch</b>
S .....	<b>Synthesis</b>
SCC1 .....	<b>Sister chromatid cohesion 1 protein 1</b>
SDS .....	<b>Sodium dodecyl sulfate</b>
SH .....	<b>Small hairpin</b>
SHRNA .....	<b>Small hairpin RNA</b>
SI .....	<b>Small iinterfering</b>
SIRNA .....	<b>Small interfering RNA</b>
SIX1 .....	<b>Sine oculis homeobox homolog 1</b>
SIX1 .....	<b>Sine oculis homeobox homolog 1 gene</b>
SMAC .....	<b>Second mitochondria-derived activator of caspases</b>
SVF .....	<b>Sérum de veau fétal</b>
TBCL-2 .....	<b>truncated Bcl-2</b>

TBCL-X <sub>L</sub> . . . . .	truncated <b>Bcl-x<sub>L</sub></b>
TBID . . . . .	truncated <b>BH3-interacting domain death agonist</b>
TBS . . . . .	<b>Tris buffered saline</b>
TGF- $\alpha$ . . . . .	<b>Transforming growth factor <math>\alpha</math></b>
TGF- $\beta$ . . . . .	<b>Transforming growth factor <math>\beta</math></b>
TNM . . . . .	<b>Tumor node metastasis</b>
TUNEL . . . . .	<b>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</b>
UBCH10 . . . . .	<b>Ubiquitin-conjugating enzyme H10</b>
U2OS . . . . .	<b>U2 osteosarcoma</b>
USP9X . . . . .	<b>Ubiquitin specific peptidase 9 x-linked</b>
USP44 . . . . .	<b>Ubiquitin specific peptidase 44</b>
UV . . . . .	<b>Ultra-violet</b>
VDAC2 . . . . .	<b>Voltage-dependent anion-selective channel protein 2</b>
VEGF . . . . .	<b>Vascular endothelial growth factor</b>
WD40 . . . . .	<b>Tryptophan(W)-aspartic acid(D 40)</b>
WT . . . . .	<b>Wild type</b>
XIAP . . . . .	<b>X chromosome-linked IAP</b>
YFP . . . . .	<b>Yellow fluorescent protein</b>

# Table des figures

1.1	Les phases du cycle cellulaire dans les cellules eucaryotes . . . . .	4
1.2	Mécanismes d'activation de Cdk1 pour l'entrée en mitose . . . . .	8
1.3	Mécanismes moléculaires de la levée du point de contrôle mitotique . . . . .	11
1.4	Formation du complexe du point de contrôle mitotique . . . . .	15
1.5	La région centromère-kinétochore . . . . .	16
1.6	Structure de l'appareil mitotique . . . . .	18
1.7	Devenirs cellulaires en réponse à un traitement par les poisons des microtubules . . . . .	25
1.8	Le modèle des réseaux compétitifs . . . . .	26
2.1	Anatomie et histologie de la glande mammaire . . . . .	31
	(a) Anatomie de la glande mammaire . . . . .	31
	(b) Coupe d'une glande mammaire au repos . . . . .	31
	(c) Coupe d'une glande mammaire active . . . . .	31
2.2	Développement prénatal du sein . . . . .	32
	(a) Bourgeon mammaire . . . . .	32
	(b) Expression de Bcl-2 . . . . .	32
2.3	Unités lobulo-canalaires terminales . . . . .	33
2.4	Populations cellulaires de l'acinus . . . . .	34
2.5	Régulation de la croissance du cancer du sein par les facteurs de croissance, oncogènes et suppresseurs de tumeurs . . . . .	36
2.6	Classification histologique des sous-types de cancer du sein . . . . .	39
2.7	Classification moléculaire du cancer du sein . . . . .	40
2.8	Stratification des tumeurs triples-négatives . . . . .	43
2.9	Fréquence d'utilisation des composés de chimiothérapie dans le traitement du cancer du sein métastatique, et en thérapie adjuvante ou néo-adjuvante . . . . .	50
3.1	Régulation de l'apoptose par les protéines de la famille de Bcl-2 . . . . .	55
3.2	Caractéristiques structurales des membres représentatifs de la famille de Bcl-2 . . . . .	59

3.3	Modèles pour l'activation des pro-apoptotiques multi-domaines de la la famille de Bcl-2 .	65
3.4	Modifications post-traductionnelles régulant les niveaux d'expression de Mcl-1 pendant l'arrêt mitotique . . . . .	71
3.5	Régulation des membres de la famille de Bcl-2 pendant l'arrêt mitotique . . . . .	72
1.1	Extinction de Cdc20 par ARN interférence . . . . .	95
	(a) Extinction de Cdc20 dans la lignée MDA-MB-231 . . . . .	95
	(b) Extinction de Cdc20 dans la lignée CAL-51 . . . . .	95
1.2	L'extinction de Cdc20 induit une accumulation des cellules en arrêt mitotique dans les lignées MDA-MB-231, CAL-51 et MCF-7 . . . . .	96
1.3	Détermination d'une concentration minimale de paclitaxel . . . . .	97
1.4	L'extinction de Cdc20 provoque un arrêt mitotique plus durable que le traitement par le paclitaxel . . . . .	98
	(a) Analyse de l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 dans la lignée MDA-MB-231 . . . . .	98
1.4	L'extinction de Cdc20 provoque un arrêt mitotique plus durable que le traitement par le paclitaxel . . . . .	99
	(b) Analyse de l'arrêt mitotique induit par le traitement au paclitaxel . . . . .	99
1.5	L'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 aboutit à la mort cellulaire . . . . .	101
1.6	L'arrêt mitotique induit une mort indépendante des caspases . . . . .	102
	(a) Analyse de l'activation des caspases suite à l'extinction de Cdc20 . . . . .	102
	(b) Analyse de l'expression de p <sub>H2AX</sub> suite à l'extinction de Cdc20 . . . . .	102
	(c) Analyse de l'influence des caspases sur la mort induite par l'extinction de Cdc20 . . .	102
2.1	Technique du profilage BH3 . . . . .	106
	(a) Perméabilisation et mise en contact avec les peptides BH3 . . . . .	106
	(b) Marquage du cytochrome <i>c</i> et fixation . . . . .	106
2.1	Technique du profilage BH3 . . . . .	107
	(c) Lavage . . . . .	107
	(d) Positivité : absence d'amorçage . . . . .	107
	(e) Négativité : amorçage . . . . .	107
2.2	L'arrêt mitotique promeut l'amorçage des cellules MDA-MB-231 . . . . .	109
	(a) Profilage BH3 des cellules MDA-MB-231 suite à l'extinction de siCdc20 . . . . .	109
2.2	L'arrêt mitotique promeut l'amorçage des cellules MDA-MB-231 . . . . .	110
	(b) Profilage BH3 des cellules MDA-MB-231 suite au traitement par le paclitaxel . . . . .	110
2.3	Extinction de Bcl-2, Bcl-x <sub>L</sub> et Mcl-1 par ARN interférence . . . . .	111

(a)	Extinction de Bcl-2 . . . . .	111
(b)	Extinction de Bcl-x <sub>L</sub> . . . . .	111
(c)	Extinction de Mcl-1 . . . . .	111
2.4	Les extinctions de Bcl-x <sub>L</sub> et Mcl-1 sensibilisent les cellules à la mort induite par l'extinction de Cdc20 . . . . .	111
(a)	Analyse de l'influence des anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 sur la mort induite par l'extinction de Cdc20, dans les cellules MDA-MB-231 . . . . .	111
2.4	Les extinctions de Bcl-x <sub>L</sub> et Mcl-1 sensibilisent les cellules à la mort induite par l'extinction de Cdc20 . . . . .	112
(b)	Analyse de l'influence des anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 sur la mort induite par l'extinction de Cdc20, dans les cellules CAL-51 . . . . .	112
2.5	Les extinctions de Bcl-x <sub>L</sub> et Mcl-1 sensibilisent les cellules à la mort induite par le paclitaxel	113
(a)	Analyse de l'influence des anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 sur la mort induite par le paclitaxel, dans les cellules MDA-MB-231 . . . . .	113
2.5	Les extinctions de Bcl-x <sub>L</sub> et Mcl-1 sensibilisent les cellules à la mort induite par le paclitaxel	114
(b)	Analyse de l'influence des anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 sur la mort induite par le paclitaxel, dans les cellules CAL-51 et HeLa . . . . .	114
2.6	L'ABT-737 mime les effets de l'extinction de Bcl-x <sub>L</sub> dans les cellules MDA-MB-231 . . . . .	116
(a)	Analyse de l'effet de l'ABT-737 sur la mort cellulaire induite par l'extinction de Cdc20	116
2.6	L'ABT-737 mime les effets de l'extinction de Bcl-x <sub>L</sub> dans les cellules MDA-MB-231 . . . . .	117
(b)	Analyse de l'effet de l'ABT-737 sur la mort cellulaire induite par le paclitaxel . . . . .	117
3.1	Analyse du devenir cellulaire par vidéomicroscopie . . . . .	118
(a)	Double infection des cellules par des lentivecteurs : H2B-RFP et shRNA/GFP . . . . .	118
3.1	Analyse du devenir cellulaire par vidéomicroscopie . . . . .	119
(b)	Caractéristiques visuelles des différents devenirs cellulaires . . . . .	119
3.2	Les cellules MDA-MB-231 échappent à l'arrêt mitotique alors que les cellules HeLa meurent en mitose suite à un traitement par le paclitaxel . . . . .	121
3.3	La déplétion de Bcl-x <sub>L</sub> induit la mort mitotique en condition d'arrêt mitotique dans les cellules MDA-MB-231 . . . . .	122
(a)	Analyse, par vidéomicroscopie, des devenirs des cellules MDA-MB-231 suite au traitement par le paclitaxel et à l'extinction de Bcl-x <sub>L</sub> . . . . .	122
3.3	La déplétion de Bcl-x <sub>L</sub> induit la mort mitotique en condition d'arrêt mitotique dans les cellules MDA-MB-231 . . . . .	123

(b)	Analyse, par vidéomicroscopie, des devenir des cellules MDA-MB-231 suite au traitement par le paclitaxel et à l'ABT-737 . . . . .	123
3.4	La mort mitotique survient plus rapidement que l'échappement à l'arrêt mitotique . . . . .	124
3.5	La surexpression de Bcl-x <sub>L</sub> protège de la mort induite par le paclitaxel dans les cellules MCF-7 . . . . .	125
(a)	Surexpression de Bcl-x <sub>L</sub> -YFP dans les cellules MCF-7 . . . . .	125
3.5	La surexpression de Bcl-x <sub>L</sub> protège de la mort induite par le paclitaxel dans les cellules MCF-7 . . . . .	126
(b)	Analyse, par vidéomicroscopie, des devenir des cellules MCF-7 suite au traitement par le paclitaxel et à la surexpression de Bcl-x <sub>L</sub> . . . . .	126
3.6	Bcl-x <sub>L</sub> prolonge l'activité de l'activité de Cdk1 . . . . .	127
(a)	Analyse de l'influence de Bcl-x <sub>L</sub> sur la durée de l'échappement à l'arrêt mitotique . . . . .	127
3.6	Bcl-x <sub>L</sub> prolonge l'activité de l'activité de Cdk1 . . . . .	128
(b)	Analyse de l'influence de Bcl-x <sub>L</sub> sur l'apparition de MPM-2 . . . . .	128
3.7	La surexpression de Bcl-x <sub>L</sub> bloque les cellules en interphase . . . . .	129
3.8	Bcl-x <sub>L</sub> ou Bcl-2 sont nécessaires à la survie des cellules à l'état tétraploïde . . . . .	131
(a)	Analyse du cycle cellulaire suite au traitement à l'AZD1152 et à l'ABT-737 . . . . .	131
3.8	Bcl-x <sub>L</sub> ou Bcl-2 sont nécessaires à la survie des cellules à l'état tétraploïde . . . . .	132
(b)	Analyse de la mort cellulaire induite par le traitement à l'AZD1152 et à l'ABT-737 . . . . .	132
4.1	Les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 subissent des modifications post-traductionnelles pendant l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 . . . . .	134
(a)	MDA-MB-231 . . . . .	134
(b)	CAL-51, MCF-7 et HeLa . . . . .	134
4.2	Les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 subissent des modifications post-traductionnelles pendant l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel . . . . .	134
(a)	MDA-MB-231 . . . . .	134
(b)	CAL-51 . . . . .	134
(c)	MCF-7 . . . . .	134
4.3	Importance de la phosphorylation de Bcl-x <sub>L</sub> sur la sérine 62 pour la survie pendant l'arrêt mitotique . . . . .	136
(a)	Phosphorylation de Bcl-x <sub>L</sub> sur la sérine 62 . . . . .	136
(b)	Analyse de l'influence de la sérine 62 de Bcl-x <sub>L</sub> dans la mort induite par le paclitaxel . . . . .	136
5.1	Bax est nécessaire à la mort cellulaire induite par l'ABT-737, suite à l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 ou le paclitaxel . . . . .	137

(a)	Analyse, par immunoblot, de l'expression de Bax suite au traitement par le paclitaxel et l'ABT-737 . . . . .	137
(b)	Extinction de Bax et Bak . . . . .	137
5.1	Bax est nécessaire à la mort cellulaire induite par l'ABT-737, suite à l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 ou le paclitaxel . . . . .	138
(c)	Analyse de l'influence de Bax et Bak dans la mort induite par l'extinction de Cdc20 et l'ABT-737 . . . . .	138
5.1	Bax est nécessaire à la mort cellulaire induite par l'ABT-737, suite à l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 ou le paclitaxel . . . . .	139
(d)	Analyse de l'influence de Bax et Bak dans la mort induite par le paclitaxel et l'ABT-737 . . . . .	139
5.2	La phosphorylation de la sérine 62 de Bcl-x <sub>L</sub> déstabilise son interaction avec Bax . . . . .	141
(a)	Analyse BRET . . . . .	141
(b)	Dose-réponse . . . . .	141
5.3	La mort induite par l'arrêt mitotique n'est pas dépendante de Bim dans les cellules MDA-MB-231 . . . . .	142
(a)	Extinction de Bim . . . . .	142
(b)	Analyse de l'influence de Bim sur la mort induite par l'extinction de Cdc20 . . . . .	142
(c)	Analyse de l'influence de Bim sur la mort induite par le paclitaxel . . . . .	142
5.4	La mort induite par l'extinction de Cdc20 ou la paclitaxel n'est pas dépendante de Noxa . . . . .	144
(a)	Extinction de Noxa . . . . .	144
(b)	Analyse de l'influence de Noxa sur la mort induite par l'extinction de Cdc20 . . . . .	144
(c)	Analyse de l'influence de Noxa sur la mort induite par le paclitaxel . . . . .	144
5.5	Le paclitaxel et ABT-737 induisent l'expression de Noxa . . . . .	145
(a)	Analyse, par RT-qPCR, de l'expression de Noxa suite à 24h et 48h de traitement au paclitaxel . . . . .	145
(b)	Analyse, par immunoblot, de l'expression de Noxa suite au traitement par le paclitaxel et l'ABT-737 . . . . .	145
6.1	Observation de la perméabilisation mitochondriale de cellules MDA-MB-231 exprimant MTSHTra2/Omi-mCherry . . . . .	147
6.2	Observation de l'adhérence de cellules MDA-MB-231 exprimant MTSHTra2/Omi-mCherry sur différents motifs de fibronectine . . . . .	149
(a)	Motif « Y » (x40) . . . . .	149
(b)	Motif « I » (x40) . . . . .	149
(c)	Motif « arbalète » (x40) . . . . .	149

(d) Motif « Y » (x20) . . . . .	149
(e) Motif « I » (x20) . . . . .	149
(f) Motif « arbalète » (x20) . . . . .	149
7.1 Extinction et surexpression de Six1 dans les cellules MDA-MB-231 et HeLa . . . . .	151
(a) Extinction de Six1 . . . . .	151
(b) Surexpression de Six1 . . . . .	151
7.2 Six1 favorise le maintien de l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel dans les cellules MDA-MB-231 . . . . .	152
(a) Analyse de l'influence de l'extinction de Six1 sur le cycle cellulaire . . . . .	152
(b) Analyse de l'influence de la surexpression de Six1 sur le cycle cellulaire . . . . .	152
7.3 Six1 inhibe la mort cellulaire induite par le paclitaxel . . . . .	153
(a) Analyse de l'influence de l'extinction de Six1 sur la mort induite par le paclitaxel . . . . .	153
(b) Analyse de l'influence de la surexpression de Six1 sur la mort induite par le paclitaxel . . . . .	153
(c) Analyse de l'influence de l'inhibition de Six1 sur la mort induite par le paclitaxel . . . . .	153

# Liste des tableaux

3.1	Interactions entre les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2	57
1.1	Produits pour la culture cellulaire . . . . .	77
1.2	Molécules chimiques utilisées pour les traitement . . . . .	78
2.1	siRNA utilisés . . . . .	80
4.1	Anticorps utilisés pour les immunoblots . . . . .	85
2.1	Réseau d'interactions entre les peptides BH3 et les protéines de la famille de Bcl-2 . . . . .	108

# **Première partie**

## **Introduction**

# Chapitre 1

## Le point de contrôle mitotique

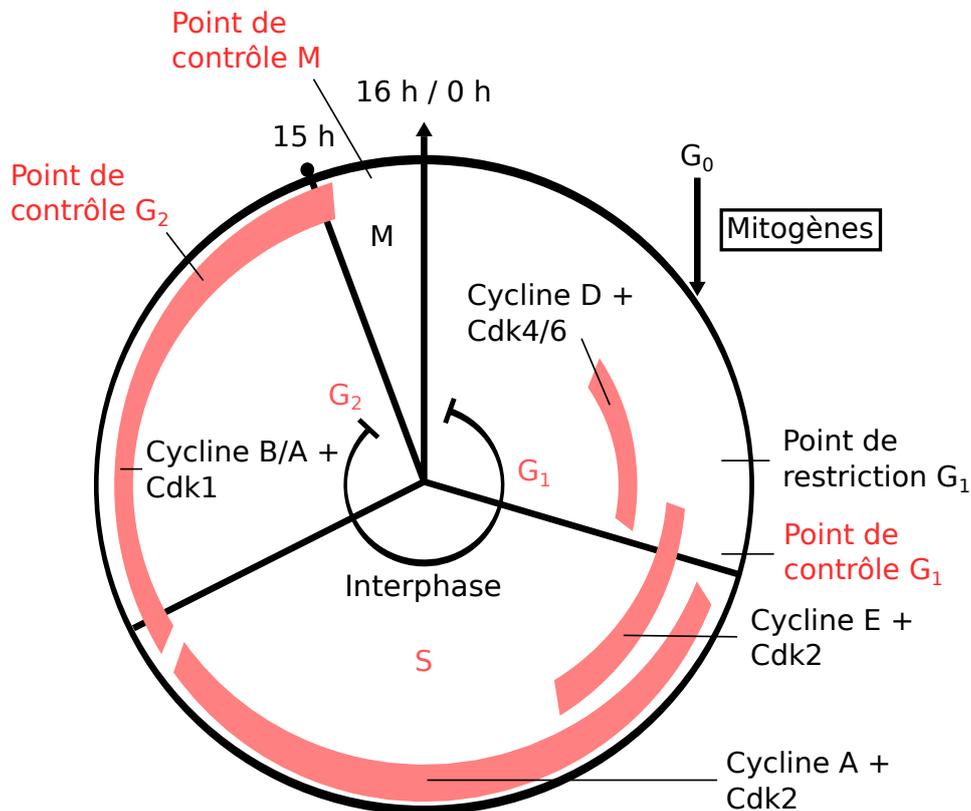
Chez les eucaryotes, la division cellulaire s'accomplit par deux moyens différents : la mitose et la méiose [5]. Durant la mitose, une cellule somatique (ou une cellule eucaryote unicellulaire) se divise pour produire deux cellules filles génétiquement identiques. En contraste avec cela, durant la méiose, une cellule subit deux phases de division cellulaire, donnant ainsi quatre cellules haploïdes, ou gamètes, chacune d'entre elles ne possédant à l'arrivée qu'une seule version chromatidienne. Nous nous focaliserons sur les mécanismes de contrôle de la transition mitotique.

### 1.1 La régulation de l'entrée en mitose

#### 1.1.1 Régulation du cycle cellulaire par les couples cyclines-Cdk

La durée moyenne du cycle cellulaire est 16 heures (15 heures pour l'interphase et 1 heure pour la mitose), cependant cela varie en fonction du type cellulaire [5]. Les cellules en interphase peuvent être distinguées en microscopie des cellules en mitose, car les chromosomes ne sont pas visibles en interphase et peuvent seulement être observés pendant la mitose grâce à la condensation chromosomique.

En partant du début de la phase  $G_1$  (**Gap 1**), nous avons illustré la progression du cycle cellulaire dans le sens horaire. La plupart des cellules d'un adulte ne sont pas dans le processus de division. Elles sont **quiescentes**, et entrent dans une période inactive appelée  $G_0$  (**Gap 0**), une phase en dehors du cycle cellulaire [6]. Des mitogènes et des facteurs de croissance peuvent, cependant, pousser une cellule à entrer dans le cycle cellulaire, et passer un point de contrôle appelé le **point de restriction**  $G_1$ . Avant le passage du point de restriction, la progression dans le cycle cellulaire est dépendante des mitogènes, après quoi les cellules sont destinées à progresser de manière irréversible dans le cycle cellulaire sans le besoin de facteurs de croissance. Le passage de la cellule à travers les différentes phases du cycle cellulaire est coordonné, et régulé, par une famille de protéines appelées cyclines et leurs Cdk (**Cyclin-dépendant kinases**)



**FIGURE 1.1 – Les phases du cycle cellulaire dans les cellules eucaryotes. L'interphase, composée des phases G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub>, est suivie par la phase M, composée de la mitose et la cytokinèse. La phase G<sub>0</sub> fait référence à la quiescence, située en dehors du cycle cellulaire et dont la sortie est dépendante des mitogènes. Sont également représentés, les points de contrôles, ainsi que les activités des couples cycline-Cdk mises en jeu dans la progression du cycle.**

associées. Les cyclines sont nommées ainsi à cause des variations cycliques de leur concentration, qui se produisent au cours d'une division cellulaire. La concentration d'une cycline est dépendante de la transcription de son gène, et de la régulation de sa dégradation faisant suite à son expression. L'**appariement** des cyclines avec les Cdk est hautement spécifique. Les cyclines sont les unités régulatrices de leur Cdk. Suite à la liaison d'une cycline à son partenaire Cdk, la cycline induit un changement conformationnel dans la sous-unité catalytique de la Cdk, révélant son site actif. La concentration des Cdk ne fluctue, elle, pas durant le cycle cellulaire.

Différents complexes cycline-Cdk sont présents à des points spécifiques au sein du cycle cellulaire, et sont d'importants **régulateurs des transitions irréversibles** entre les phases. Par exemple, le gène de la cycline D est une des cibles finales de la signalisation de l'EGF (**E**pidermal **g**rowth **f**actor) [7]. C'est un important lien moléculaire entre les facteurs de croissance et la manière dont ils stimulent la prolifération cellulaire. La cycline D est la première cycline à être synthétisée au cours du cycle cellulaire, et, avec les Cdk 4 et 6, mène la progression à travers la phase G<sub>1</sub>. La cycline D joue un rôle dans la régulation de l'expression du gène de la cycline E, dont le produit est important pour la transition de la phase G<sub>1</sub> vers

la phase S (Synthesis) [8]. Le complexe cycline A-Cdk2 (Cyclin-**d**ependant **k**inase **2**) est important pour la progression en phase S. Les cyclines A et B, avec Cdk1 (Cyclin-**d**ependant **k**inase **1**) dirigent la phase G<sub>2</sub> (G**a**p **2**) ainsi que la transition de la phase G<sub>2</sub> vers la phase M (M**i**tosis).

Les complexes cycline-Cdk exercent leur effet par **phosphorylation** de leurs protéines cibles. La phosphorylation est un mécanisme important pour la régulation de l'activité des protéines. Les cibles sont des protéines diverses, telles que des régulateurs transcriptionnels, des protéines du cytosquelette, des protéines de l'enveloppe et des pores nucléaires, et des histones. Nous pouvons citer par exemple les condensines, les lamines nucléaires, le GM-130 (G**o**lgi **m**atrix protein **130**) de l'appareil de Golgi, le régulateur transcriptionnel pRb (R**e**tinob**l**astoma **p**rotein), et le facteur de transcription E2F (E**2** promoter binding factor) [6]. Les événements principaux du cycle cellulaire sont ainsi la condensation chromosomique, le désassemblage de l'enveloppe nucléaire, la fragmentation de l'appareil de Golgi, la régulation de l'expression génique, et l'assemblage du fuseau mitotique. La déphosphorylation est aussi un mécanisme important afin de restaurer la cellule pour un nouveau cycle de division.

Les points de contrôle du cycle cellulaire, des séries de voies de signalisation biochimiques qui surveillent, et induisent une réponse cellulaire aux dommages de l'ADN (Acide **d**ésoxyribonucléique), sont importants pour le maintien de l'intégrité du génome [6]. Le **point de contrôle G<sub>1</sub>** mène à un arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN, assurant ainsi que les dommages de l'ADN ne soient pas répliqués durant la phase S. Le **point de contrôle de la phase G<sub>2</sub>** mène à un arrêt du cycle cellulaire en réponse à de l'ADN endommagé, et/ou non répliqué, pour laisser le temps aux mécanismes de réparation d'agir. Le **point de contrôle M** mène à un arrêt de la ségrégation chromosomique en réponse à un mauvais alignement sur le fuseau mitotique. Les composants des points de contrôle sont des protéines qui agissent en tant que senseurs des dommages de l'ADN, transducteurs de signal, ou effecteurs. L'abolition des points de contrôle mène à de l'instabilité génétique, et peut donc participer à la carcinogénèse.

## 1.1.2 Importance des cyclines et Cdk mitotiques

### 1.1.2.1 Cdk1 : maître régulateur du cycle cellulaire

Un *distingo* est généralement fait entre Cdk2, Cdk4 (Cyclin-**d**ependant **k**inase **4**) et Cdk6 (Cyclin-**d**ependant **k**inase **6**), regroupés sous le terme de « Cdk interphasiques », et Cdk1 dit « Cdk mitotique ». Cette séparation fait d'autant plus sens lorsqu'on considère leur importance respective. En effet, la déletion de Cdk1 chez la souris empêche la division, et **arrête le développement au stade du zygote** [9].

La présence des Cdk interphasiques ne peut compenser cette perte, et même le remplacement de Cdk1 par Cdk2 par recombinaison homologue aboutit à la mort embryonnaire. Cela indique que Cdk1 ne peut être compensé par Cdk2 même lorsque ce dernier est exprimé à partir du promoteur de Cdk1. Les phénotypes engendrés par les délétions de Cdk2, Cdk4 et Cdk6, sont respectivement la stérilité [10], le diabète due à un déficit dans la prolifération de cellules endocriniennes [11], et un déficit prolifératif des cellules hématopoïétiques [12]. Néanmoins, la délétion combinée des trois Cdk interphasiques induit la mort embryonnaire.

Parmi les autres Cdk, nous ne citerons que Cdk7 (**Cyclin-dépendant kinase 7**), qui, en plus de son rôle dans la transcription, s'associe à la cycline H pour phosphoryler et activer Cdk1 et Cdk2 [13], mais aussi Cdk11 (**Cyclin-dépendant kinase 11**), qui est la seule avec Cdk1 dont la délétion aboutit à la mort embryonnaire [14].

Enfin, il est notable de constater que Cdk1 n'interagit qu'avec les cyclines de type A et B, et que de manière intéressante, ce sont aussi celles qui semblent les plus importantes, ce que nous allons détailler dans la prochaine sous-section.

### 1.1.2.2 Les cyclines de type A et B

Deux cyclines de type A ont été découvertes chez les mammifères [15], et des souris K.O. (**Knock out**) ont été générées. Les souris K.O. pour la cycline A1 sont viables et se développent normalement [16]. À l'inverse, la délétion de la cycline A2 aboutit à une mort embryonnaire à 5 jours et demi. En effet le stade blastocyste est atteint mais la mort survient après l'implantation [17]. Cela suggère que la cycline A2 est essentielle pour le développement, et qu'aucune autre cycline ne peut compenser sa perte. Cela peut s'expliquer par son rôle dans la replication et surtout dans l'entrée en mitose [18].

Les cyclines de type B sont les acteurs essentiels de la mitose. Chez les mammifères, trois cyclines de type B ont été identifiées, B1, B2 et B3 [19, 20, 21]. Les cyclines B1 et B2 sont exprimées dans la majorité des cellules proliférantes, et se localisent à des compartiments cellulaires différents. La cycline B1 est associée aux microtubules, alors que la cycline B2 s'associe aux membranes intracellulaires [22]. La cycline B1 se relocalise au noyau en début de mitose, alors que la cycline B2 ne change pas de localisation [23]. Les deux cyclines, B1 et B2, interagissent avec Cdk1, mais peuvent aussi se lier à Cdk2. La cycline B3 est décrite comme partageant des propriétés des cyclines de type A et B. Elle est principalement localisée au noyau, et s'associe avec Cdk2 [24]. Enfin, son expression est restreinte aux testicules et aux ovaires. Concernant la génération de souris K.O., et bien que cela n'ait pas été encore réalisé pour la cycline B3, **seul la délétion de la cycline B1 aboutit à un phénotype délétère observable**. Elle induit

la mort embryonnaire à 10 jours et demi [25]. Les souris K.O. pour la cycline B2 sont, elles, viables et ne montrent aucune anomalie de croissance. Cela suggère que la cycline B1 est en mesure de compenser pleinement la perte de la cycline B2.

Plus généralement, et malgré une ellipse sur les deux autres types de cycline (D et E), nous ajouterons que les cyclines A2 et B1 apparaissent comme étant les moins redondantes, car ce sont les seules dont la délétion induit la mort embryonnaire.

### 1.1.3 Les mécanismes d'entrée en mitose

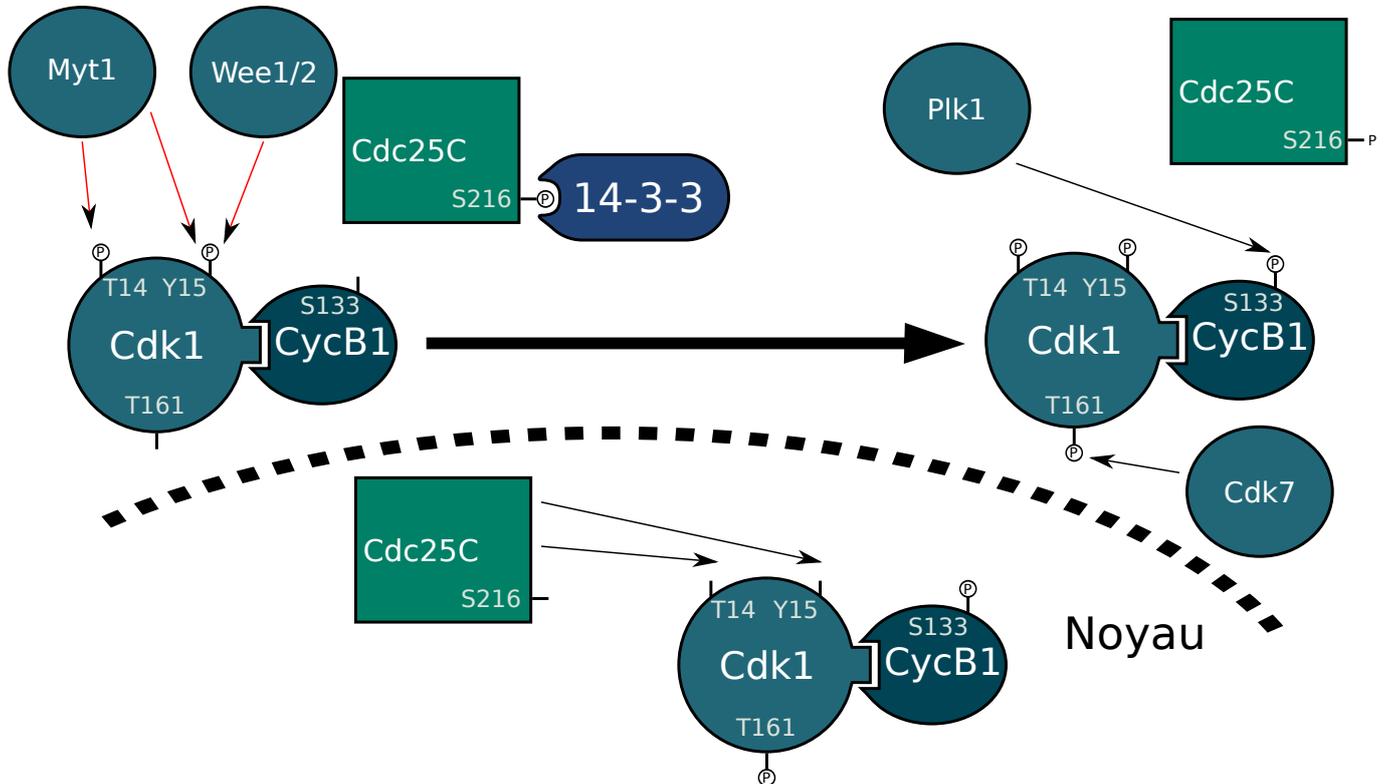
#### 1.1.3.1 Activation de Cdk1

Le modèle général décrivant l'entrée en mitose repose sur celui de la régulation du complexe cycline B1-Cdk1. Chez les vertébrés, la mitose est déclenchée par l'activité de Cdk1. L'activation de Cdk1 est un processus à plusieurs étapes dont nous ne pouvons situer précisément le début. Nous considérerons que l'activation de Cdk1 commence quand la protéine **se lie à la cycline B1**, dont les niveaux augmentent en phase  $G_2$  et marquent un pic pendant la mitose. Avant la mitose, les complexes cycline B1-Cdk1 sont **maintenus inactifs par phosphorylation** de Cdk1 sur la thréonine 14 et la tyrosine 15, évènement réalisé par les kinases Wee1, Wee2 et Myt1 (figure 1.2). Ces phosphorylations sont régulées par l'activité opposée de la phosphatase Cdc25c (**Cell division cycle 25 c**). Cdk1 doit également être phosphorylé sur sa boucle T pour être pleinement actif, cela est réalisé par Cdk7 sur la thréonine 161. Cet évènement se produit après la dissociation de Cdk1 avec la cycline B2 [26]. Nous ajouterons que des inhibiteurs tels que p21 (**protein 21**) sont aussi en mesure de réguler l'activité de Cdk1, en l'inhibant par interaction directe.

L'activation de Cdc25c nécessite, elle, la phosphorylation de plusieurs sites de sa partie N-terminale (**Amino(N)-terminale**), et cela est catalysé par au moins deux kinases, Plk1 (**Polo kinase 1**) et le complexe cycline B1-Cdk1 lui-même. La capacité de Cdk1 à activer son propre activateur fournit une **boucle de rétroaction positive** dans l'activation de Cdk1, où l'activation partielle de Cdc25c permet l'activation complète de Cdk1. Cette boucle de rétroaction positive améliore la capacité de Cdk1 à phosphoryler, et inactiver Wee1.

#### 1.1.3.2 Relocalisation du complexe cycline B1-Cdk1

Durant l'interphase, le complexe cycline B1-Cdk1 se trouve entièrement dans le cytoplasme, soit sous forme soluble, soit associé au réseau de microtubules et aux centrosomes [27]. Au début de la mi-



**FIGURE 1.2 – Mécanismes d'activation de Cdk1 pour l'entrée en mitose.** Les kinases Wee1, Wee2 et Myt1 inhibent Cdk1 par phosphorylation (thrénosine 14 et tyrosine 15), et la phosphatase Cdc25c agit dans le sens opposé. Cdk1 doit également être phosphorylé par Cdk7 sur la thrénosine 161 pour être pleinement actif. La localisation a elle aussi son importance : la phosphorylation de Cdc25c sur la sérine 216 retient la protéine dans le cytoplasme via 14-3-3, et la cycline B1 transloque dans le noyau via sa phosphorylation sur la sérine 133 par Plk1.

tose, la plupart de ces complexes transloquent rapidement du cytoplasme vers le noyau, après quoi l'enveloppe nucléaire est rompue [28]. Une fraction des complexes cycline B1-Cdk1 reste dans le cytoplasme en début de mitose, et est associée, au moins en partie, avec les centrosomes dupliqués lorsqu'ils se séparent [27].

La localisation cytoplasmique de la cycline B1 durant l'interphase a été attribuée à la région du résidu 43 dans la moitié N-terminale, qui fut appelée séquence de rétention cytoplasmique [29]. Cette séquence contient un signal d'exportation nucléaire qui se lie à la protéine Crm1 (Chromosome region maintenance 1 protein homolog), ainsi, la cycline B1 fait continuellement la **navette entre le noyau et le cytoplasme** [30]. La localisation de la cycline B1 est donc déterminée par les rythmes d'import et d'export. Durant l'interphase, le rythme d'export excède le rythme d'import nucléaire, aboutissant à une localisation cytoplasmique.

Ni la cycline B1 ni Cdk1 ne contiennent de séquence de localisation nucléaire, ou d'autre signaux

d'import reconnaissables. Des travaux montrent que l'import de la cycline B1 durant l'interphase est réalisé par un mécanisme impliquant l'importine  $\beta$ , et sa phosphorylation sur la sérine 133 par Plk1 [31].

Comme la cycline B1, Cdc25c fait la navette entre le cytoplasme et le noyau, et de même sa localisation est déterminée par des rythmes d'import et d'export. Cdc25c contient une séquence de localisation nucléaire et deux séquences d'exportation nucléaire [32]. Durant l'interphase, Cdc25c est phosphorylé sur la sérine 216, cela crée un site de liaison pour la protéine 14-3-3 (14<sup>th</sup> fraction, positions 3 and 3). Cette liaison bloque l'accès à la séquence de localisation nucléaire et empêche la translocation dans le noyau. Durant la mitose la sérine 216 est déphosphorylée et Cdc25c se localise alors dans le noyau.

Concernant Cdk1, sa localisation dans le noyau est principalement due à son interaction avec la cycline B1. Son activation ne dépend pas de cette localisation, mais elle influence les propriétés cinétiques de cette dernière, principalement à cause de présence de Cdc25c dans le noyau.

## 1.2 Les différentes phases de la mitose

L'anatomiste allemand Walther Flemming, un des pionniers de la recherche sur la mitose, a été l'un des premiers scientifiques à donner une description détaillée des différents événements se déroulant pendant la division cellulaire des cellules animales. C'est d'ailleurs à lui que nous devons le terme de « mitose ». La mitose est la période la plus spectaculaire du cycle cellulaire, impliquant une complète réorganisation de tous les composants cellulaires. Bien que de nombreux détails de la mitose varient parmi les différents organismes, les processus fondamentaux qui assurent la fidélité de la ségrégation du matériel génétique sont conservés chez tous les eucaryotes. Ces événements basiques de la mitose comprennent la **condensation chromosomique**, la **formation du fuseau mitotique** et l'**attachement des chromosomes aux microtubules du fuseau**. Les chromatides soeurs sont ensuite séparées l'une de l'autre, et se déplacent vers les pôles opposés du fuseau, cela étant suivi par la formation des noyaux fils, et celle des cellules filles.

La mitose est classiquement décrite comme ayant cinq phases : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase ; ces phases s'enchaînent comme un processus continu sans interruption [5].

**Prophase** La prophase est essentiellement marquée par la condensation du matériel génétique en chromosomes. En plus d'organiser la séparation, cela permet l'**exposition des centromères** et l'**assemblage des kinétochores sur ces derniers**. De manière concomitante, les centrioles se mettent en mouvement vers les pôles opposés de la cellule et des fibres s'étendent à partir des centrosomes. La fin de la prophase est considérée comme le moment où la condensation est achevée et la membrane nucléaire intacte.

**Prométaphase** La prométaphase commence avec le désassemblage de l'enveloppe nucléaire. Cet événement lance le départ de la **capture des chromosomes par les microtubules**. Cela permettra l'alignement des chromosomes au centre de la cellule et l'attachement des chromatides soeurs à chaque pôle du fuseau pendant la métaphase.

**Métaphase** À ce stade, les chromosomes sont attachés aux microtubules du fuseau via leurs kinétochores. S'ensuit l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique située à mi-chemin de chaque pôle du fuseau. Cet état est contrôlé par le point de contrôle mitotique. Un fois tous les chromosomes capturés, alignés et **sous tension**, la mitose peut progresser vers la prochaine étape.

**Anaphase** Les chromatides soeurs se séparent au niveau des kinétochores, et se mettent en mouvement vers les deux côtés opposés de la cellule. Ce mouvement résulte de la combinaison du mouvement des kinétochores le long des microtubules du fuseau, et de l'interaction physique des microtubules polaires.

**Télophase** Après la ségrégation des chromosomes, les chromatides arrivent aux pôles opposés de la cellule, et de nouvelles membranes se forment autour des noyaux fils. Les chromosomes se dispersent et se décondensent, et ne sont alors plus visibles en microscopie optique. Les fibres du fuseau mitotique se dispersent elles aussi, et le partitionnement de la cellule commence.

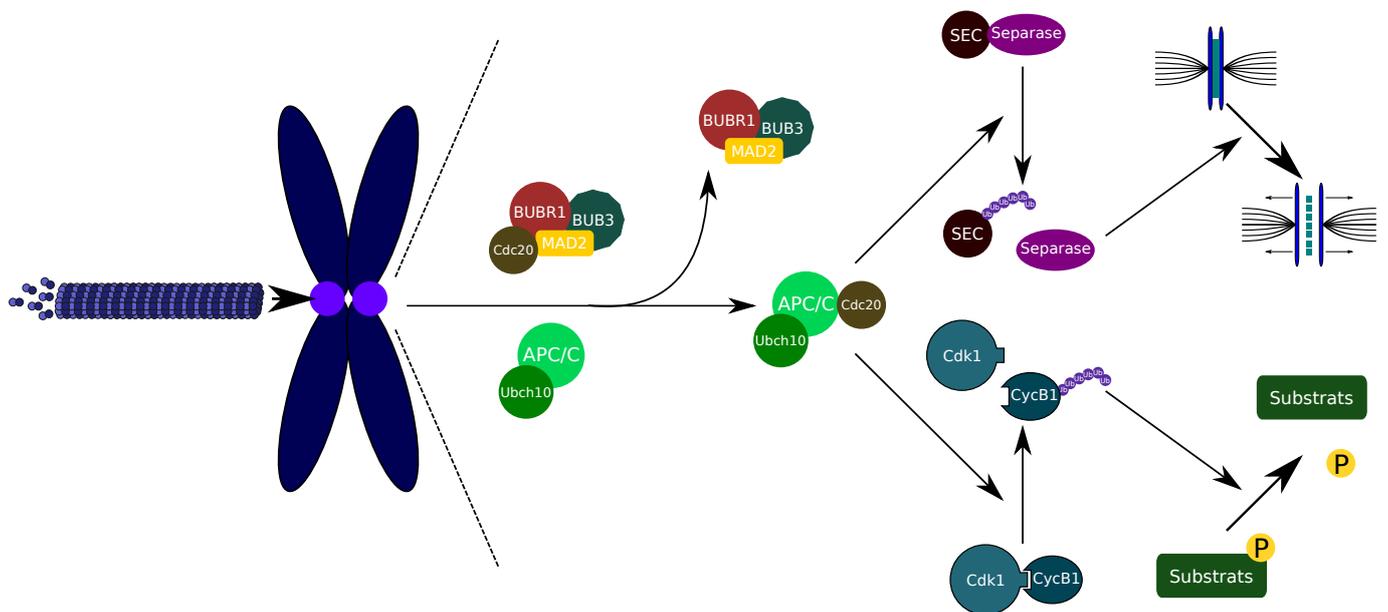
**Cytocinèse** C'est la phase finale, le cytoplasme de la cellule mère est physiquement divisée en deux cellules filles. La cytokinèse fut le premier événement du cycle cellulaire à être observé par les techniques de biologie cellulaire.

## 1.3 Contrôle de l'initiation de l'anaphase par le point de contrôle mitotique

La séparation des chromatides soeurs dans les deux cellules filles est un événement critique de la mitose. Le point de contrôle mitotique assure la qualité de ce processus en empêchant l'entrée en anaphase jusqu'à ce que tous les chromosomes présentent un attachement bipolaire au fuseau mitotique,

et soient alignés sur la plaque métaphasique. Une mauvaise séparation des chromosomes peut mener à la mort cellulaire [33], au vieillissement [34], mais aussi générer l'aneuploïdie [35]. Et, étant donné que l'aneuploïdie est observé dans 70 à 80 % des cancers humains de tous types [36], il est d'usage de considérer que des erreurs dans la séparation du matériel génétique sont impliquées dans le processus de tumorigenèse, peuvent contribuer au cancer.

En métaphase, les chromosomes qui ne sont pas attachés au fuseau génèrent un signal qui inhibe la transition vers l'anaphase. Une fois que tous les kinétochores ont réalisé cet attachement bipolaire aux microtubules du fuseau, l'inhibition par le point de contrôle mitotique est levée et l'anaphase s'en suit. L'APC/C (Anaphase-promoting complex/cyclosome) est en quelque sorte le bras armé du point de contrôle mitotique. Il s'active uniquement après l'**attachement du dernier kinétochore**. Cdc20 (Cell-division-cycle 20 homologue) est le coactivateur de l'APC/C au niveau de la transition de la métaphase vers l'anaphase. Le couple APC/C-Cdc20 induit l'ubiquitination de la sécurine, ce qui active la séparase. La séparase peut alors cliver les cohésines qui maintiennent les chromatides soeurs l'une à l'autre, et ainsi induire leur séparation synonyme d'entrée en anaphase [37]. Le complexe APC/C-Cdc20 cible aussi la cycline B1, et sa dégradation inactive Cdk1, permettant ainsi la sortie de mitose [38].



**FIGURE 1.3 – Mécanismes moléculaires de la levée du point de contrôle mitotique.** En l'absence d'attachement et de tension sur les kinétochores, le complexe du point de contrôle mitotique séquestre la sous-unité activatrice d'APC/C, Cdc20. Lorsque les microtubules s'attachent aux kinétochores et exercent une tension sur ces derniers, le complexe du point de contrôle mitotique libère Cdc20 qui peut alors interagir avec le complexe APC/C-Ubch10. Le nouveau complexe ainsi formé va pouvoir induire la dégradation de la sécurine (SEC) et de la cycline B1. Conséquemment, la séparase va pouvoir induire la séparation des chromatides soeurs et les substrats de Cdk1 vont être déphosphorylés. Ces deux événements vont concourir à l'initiation de l'anaphase et à la sortie de mitose.

### 1.3.1 L'initiation de l'anaphase est induite par l'APC/C

L'APC/C est une E3 ligase conservée de la levure jusqu'à l'Homme. Cette enzyme est composée d'au moins 13 sous-unités, qui forment deux sous-complexes joints par la sous-unité Apc1 (**Anaphase-promoting complex subunit 1**). Cette ensemble reste en cohésion tout au long du cycle cellulaire. L'activité de l'APC/C est strictement dépendante de plusieurs **protéines coactivatrices**, qui s'associent à lui durant des périodes spécifiques du cycle cellulaire. Cdc20 et Cdh1 (**Cdc20 homolog 1**) sont les mieux étudiées de ces protéines, et elles sont codées par tous les génomes eucaryotiques. D'autres coactivateurs spécifiques de la méiose ont été identifiés chez la levure et la drosophile. La liaison de Cdc20 à l'APC/C nécessite la phosphorylation de certaines sous-unités de l'APC/C par Cdk1 [39]. À l'inverse, la phosphorylation de de l'APC/C par plusieurs Cdk, notamment Cdk4, empêche sa liaison à Cdh1 [40]. Ainsi, Cdc20 active l'APC/C principalement pendant la mitose, lorsque l'activité de Cdk1 est forte, alors que Cdh1 le fait à la télophase et en phase G<sub>1</sub>, lorsque l'activité des Cdk est faible. Il est notable de constater que tous les coactivateurs d'APC/C contiennent des domaines WD40 (Tryptophan(**W**)-aspartic acid(**D 40**)). Ces domaines forment une structure en forme d'hélice dont on pense qu'elle reconnaît les substrats par interaction avec leurs éléments spécifiques appelés D-box (**Destruction-box** motif) [41] et KEN-box (Lysine(**K**)-glutamic acid(**E**)-asparagine(**N**)-**box**) [42]. Cdc20 et Cdh1 interagissent tous deux avec les D-box et KEN-box, et c'est cette capacité qui leur permet de diriger l'APC/C vers ses cibles.

En mitose, l'APC/C s'active lorsqu'il est complexé à Cdc20 au début de l'anaphase, juste après la levée de l'inhibition par le point de contrôle mitotique. Le complexe APC/C-Cdc20 a deux principales fonctions :

1. il catalyse l'**ubiquitination de la sécurine** qui se lie et inhibe la protéase séparase, ainsi la séparase clive la sous-unité Scc1 (**Sister chromatid cohesion 1 protein 1**) de la cohésine, ce qui brise les anneaux formés par cette dernière [43] ;
2. il est responsable de la première phase de **dégradation de la cycline B1**, qui se produit lorsque les niveaux de cette dernière sont élevés. Puis le complexe APC/C-Cdh1 initie la seconde phase de dégradation de la cycline B1 et déclenche la sortie de mitose [44].

### 1.3.2 Cdc20 est le coactivateur de l'APC/C pendant la mitose

Ce sont les travaux de Lee Hartwell qui ont posé les bases de la compréhension du point de contrôle mitotique au niveau moléculaire. Lui et ses collaborateurs ont en effet isolé des souches mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* qui, en dépit d'une croissance cellulaire continue, étaient dans l'incapacité d'exécuter un cycle cellulaire complet, ou certains de ses événements clés comme la réplication ou la mitose [45]. Parmi leur collection de mutants, les mutants Cdc20 arrêtaient leur division cellulaire en

mitose, et échouaient à initier l'anaphase [46]. Cdc20 est une protéine hautement conservée comportant des répétitions WD40 [47]. Des orthologues de Cdc20 ont ensuite été trouvés chez différentes organismes, notamment chez la drosophile, mais aussi chez les mammifères. Chez la drosophile, il fut montré que l'orthologue de Cdc20 était responsable de la dégradation des cyclines de types A et B pendant la mitose. Cependant les fonctions biochimiques de Cdc20 restèrent obscures jusqu'à la découverte de l'APC/C.

Le paradigme actuel est que les domaines WD40 de Cdc20 reconnaissent les KEN-box et D-box, ce qui dirige APC/C vers ses cibles. Cependant des études montrent qu'APC/C participe aussi à la liaison aux D-box [48]. De là, quatre modèles se proposent d'expliquer la reconnaissance des substrats par le complexe APC/C/Cdc20 [47] :

- le modèle de transfert séquentiel ;
- le modèle de site de liaison composite ;
- le modèle allostérique ;
- le modèle de la multivalence.

Dans le **modèle de transfert séquentiel**, le substrat se lie d'abord à Cdc20 pour ensuite être transféré sur l'APC/C. Le **modèle de site de liaison composite** propose que l'APC/C et Cdc20 se lient ensemble sur le substrat. Le **modèle allostérique** suggère que Cdc20 induit un changement conformationnel de l'APC/C, ce qui lui permet de fixer le substrat. Enfin, dans le **modèle de la multivalence**, le substrats est lié au deux protéines par deux domaines différents. Ces modèles sont mutuellement exclusifs, et se justifient tous les quatres par des résultats expérimentaux.

En cohérence avec son rôle dans la mitose, Cdc20 commence à s'accumuler en phase S [49]. Son expression marque un pic pendant la mitose, pour ensuite diminuer brutalement en sortie à la cytokinèse. Un des acteurs de cette chute d'expression est Cdc20 est le complexe APC/C/Cdh1 [50]. Cdc20 est également capable de s'autoubiquitiner, via l'APC/C [51].

Plusieurs protéines sont capables de réguler Cdc20, notamment Cdk1 qui l'inhibe par phosphorylation [52]. Cependant les régulateurs les plus important pour l'activité de Cdc20 sont BUBR1 (**B**udding **u**ninhibited by **b**enzimidazoles **r**elated **1**), BUB3 (**B**udding **u**ninhibited by **b**enzimidazoles **3**) et MAD2 (**M**itotic **a**rrest **d**eficient homologue **2**), avec lesquels ils forment le complexe du point de contrôle mitotique.

### 1.3.3 Formation du complexe du point de contrôle mitotique

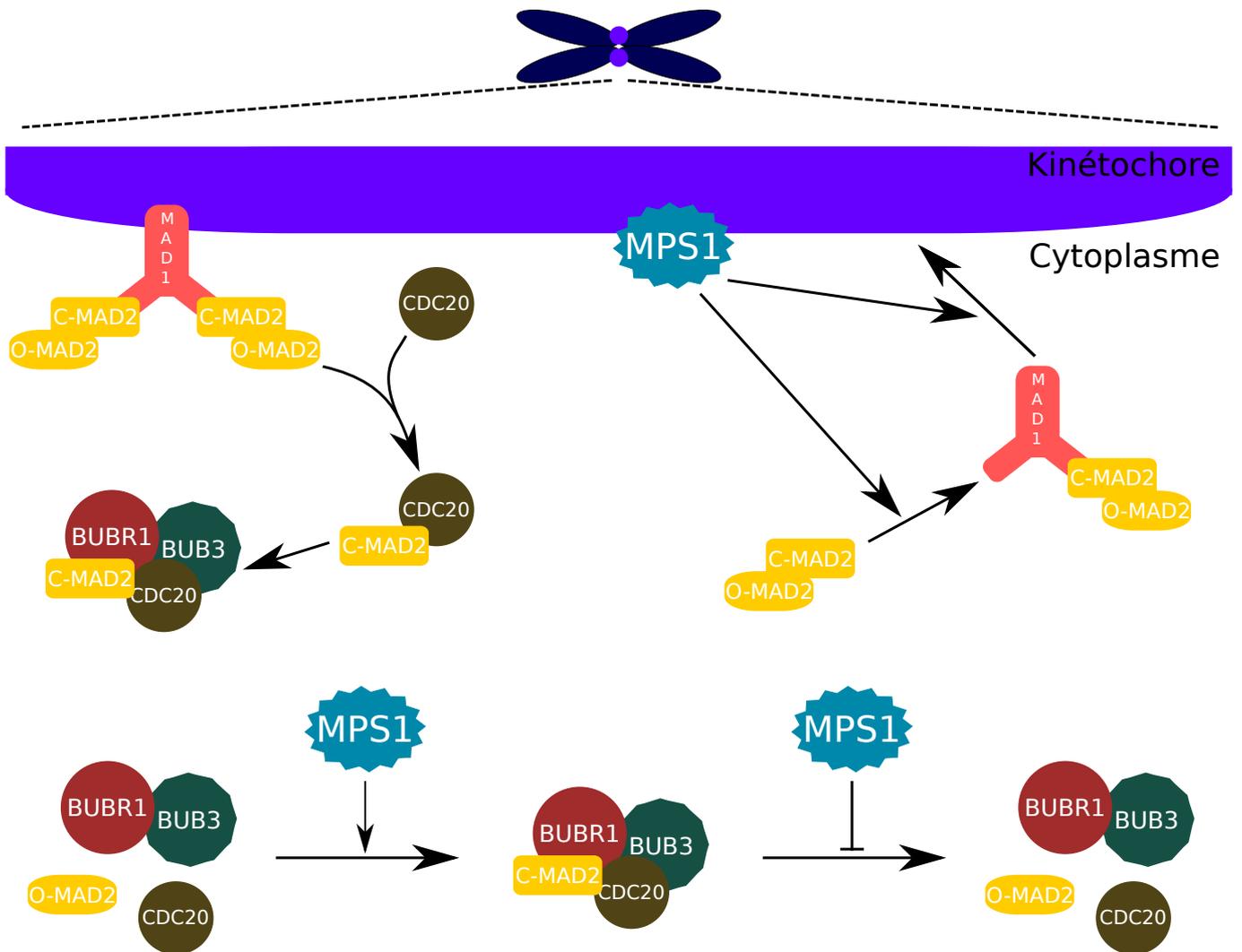
MAD2 et BUBR1 sont essentiels pour la **séquestration de Cdc20**. Ils forment le complexe du point

de contrôle mitotique, dont la raison d'être est de séquestrer Cdc20, inhibant ainsi l'activité de l'APC/C jusqu'à ce que les chromosomes soient doublement capturés, et qu'une tension soit exercée sur les kinétochores. Le complexe du point de contrôle mitotique contient MAD2, BUB3, BUBR1 et Cdc20 dans une stoechiométrie équitable [53].

BUB3 s'associe à BUBR1. Cette interaction est nécessaire à la localisation de BUBR1 aux kinétochores pendant la mitose. En prométaphase, CENP-E (**C**entromere **p**rotein-**E**) déclenche l'activité kinase de BUBR1 sur les kinétochores non attachés. La nécessité de l'activité de BUBR1 pour le fonctionnement du point de contrôle mitotique reste actuellement incertaine, cependant, BUBR1 contrôle d'autres aspects de la signalisation du kinétochore, ou de l'alignement des chromosomes. L'activité de BUBR1 s'éteint suite à l'attachement des microtubules. BUBR1 peut former un complexe ternaire avec BUB3 et Cdc20, mais qui n'inhibe pas l'activité d'APC/C. En outre, l'inhibition *in vivo* de Cdc20 nécessite la liaison préalable de MAD2 à Cdc20 pour le rendre sensible à la liaison à BUBR1 [54].

Deux protéines MAD2 peuvent se lier à une protéine MAD1 (**M**itotic **a**rrest **d**eficient **h**omologue **1**) [55]. La liaison de MAD2 à MAD1 déclenche un **changement conformationnel** de MAD2, similaire à celui déclenché par la liaison à Cdc20 [56]. MAD2 se lie à MAD1 et Cdc20 via la même poche, et avec des affinités semblables. MAD2 peut adopter deux conformations : O-MAD2 (**O**pen-**MAD2**) et C-MAD2 (**C**losed-**MAD2**) (Figure 1.4), dont la structure diffère sur les 50 résidus en position C-terminale (**C**arboxy-**t**erminale) [57]. La forme O-MAD2 est l'état physiologique de MAD2 cytosolique en absence de MAD1 et Cdc20. O-MAD2 se replie sous la forme C-MAD2 lorsqu'il est lié à MAD1 ou à Cdc20. Il existe actuellement deux modèles explicatifs de la liaison MAD2-Cdc20 : le modèle l'« échange » et celui du « patron » [58]. Ces modèles ne seront pas détaillés, mais une protéine importante dans les deux modèles est la kinase MPS1 (**M**onopolar **s**pindle **1**). En effet MPS1 intervient à la fois dans la liaison de MAD2 à MAD1, celle de MAD1 aux kinétochores, et aussi dans la formation du complexe du point de contrôle mitotique [58].

La localisation de toutes les protéines du point de contrôle mitotique sur les kinétochores non attachés fournit un **plateforme catalytique** et contribue à la formation du complexe du point de contrôle mitotique. Le complexe du point de contrôle mitotique est aussi détectable dans des cellules en métaphase normale dans lesquelles le point de contrôle mitotique est inactif. Cela indique que la formation du complexe du point de contrôle mitotique ne nécessite pas, ou l'inverse n'induit pas, nécessairement l'activité du point de contrôle mitotique. De plus, le complexe du point de contrôle mitotique est aussi détectable dans des cellules déficientes pour le point de contrôle mitotique. Ces arguments soutiennent l'idée que le complexe du point de contrôle mitotique peut se former de manière indépendante du ki-



**FIGURE 1.4 – Formation du complexe du point de contrôle mitotique.** MAD1 recrute MAD2 aux kinétochores, et induit un changement de conformation lui permettant d'interagir avec Cdc20. L'activité de la kinase MPS1 aide à la formation du complexe du point de contrôle mitotique, et empêche sa destruction.

nétochore.

En plus de l'attachement, la **tension** est importante pour la levée de l'inhibition par le point de contrôle mitotique. Si aucune tension n'est générée suite à l'attachement, la liaison entre les microtubules et le kinétochores est déstabilisée. Cette déstabilisation est dépendante de la kinase Aurora B (**Aurora kinase B**) [59].

### 1.3.4 Composants additionnels du point de contrôle mitotique

En plus des quatre protéines du complexe du point de contrôle mitotique, le point de contrôle mitotique implique plusieurs autres protéines qui sont aussi impliquées dans des aspects essentiels de ce mécanisme. Parmi ces composants additionnels se trouvent Aurora B et MPS1 (cités plus haut). Ces composants sont nécessaires au signal d'amplification du point de contrôle mitotique et à la formation

du complexe du point de contrôle mitotique. Les kinétochores servent de recrutement, et lorsque l'attachement se produit, un grand nombre de ces protéines quittent le kinétochore.

La région centromère-kinétochore est représentée sur la figure 1.5. Au coeur du kinétochore, se

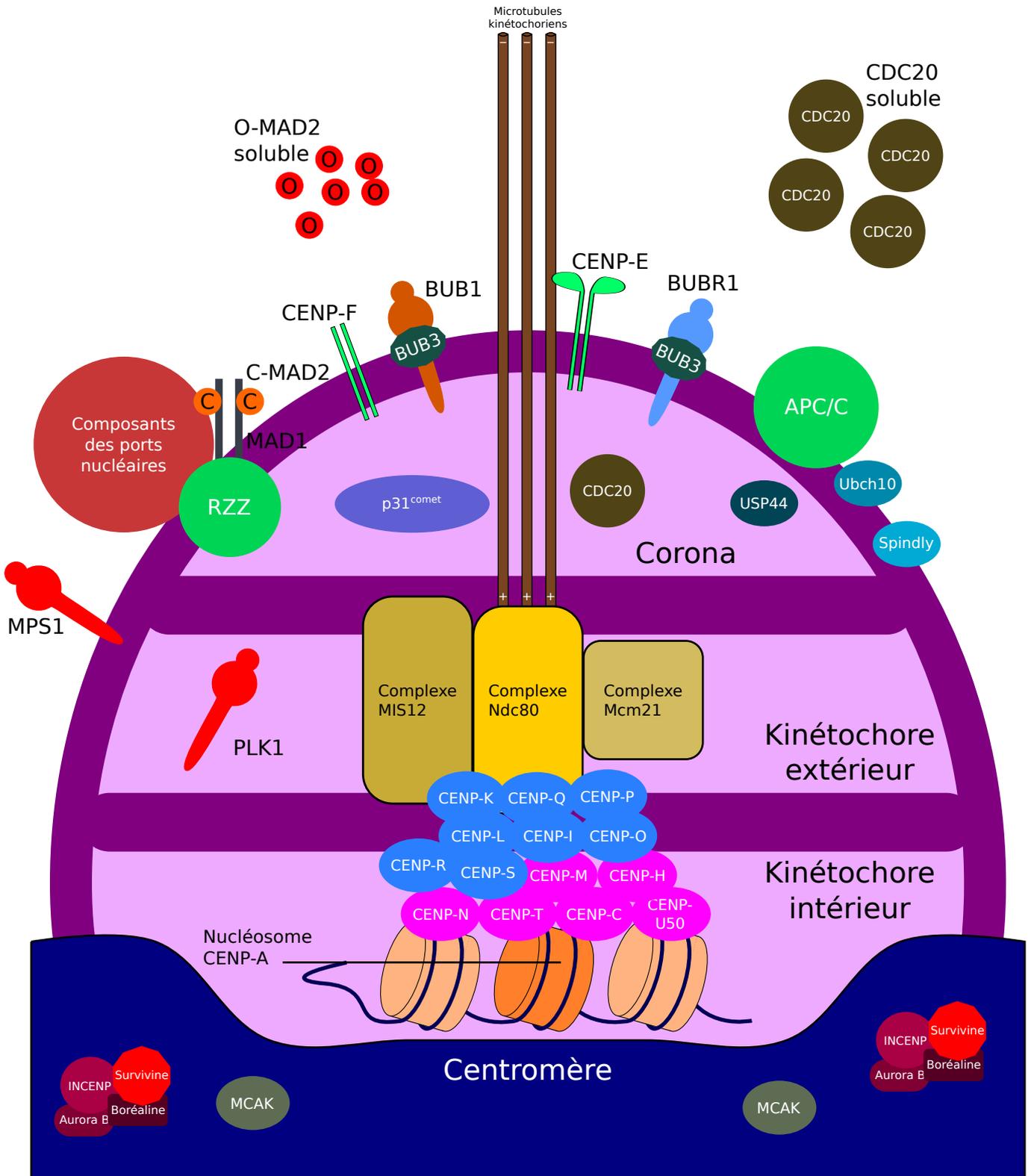


FIGURE 1.5 – La région centromère-kinétochore [58].

trouve un nucléosome spécialisé contenant la protéine CENP-A (Centromere protein-A), un homologue

de l'histone H3. Plusieurs composants de la partie interne du kinétochore s'associent avec les kinétochores tout au long du cycle cellulaire. De nombreuses autres protéines, ce qui inclue celles des complexes Ndc80, MIS12 et Mcm21 (**M**inichromosome **m**aintenance protein **21**) sont recrutées à la partie externe du kinétochores, et ce spécifiquement en mitose [58]. Elles fournissent une plate-forme pour les protéines du point de contrôle mitotique. Le complexe Ndc80 semble être directement impliqué dans la liaison des microtubules. La boréaline, la survivine, Aurora B, INCENP (**I**nnner **c**entromere **p**rotein) et MCAK (**M**itotic centromere-associated **k**inesin) peuplent préférentiellement la région du centromère et régulent la stabilité de l'attachement microtubule-kinétochore. Elles ont été impliquées dans la correction des erreurs d'attachements. Plk1 est également présent aux kinétochores.

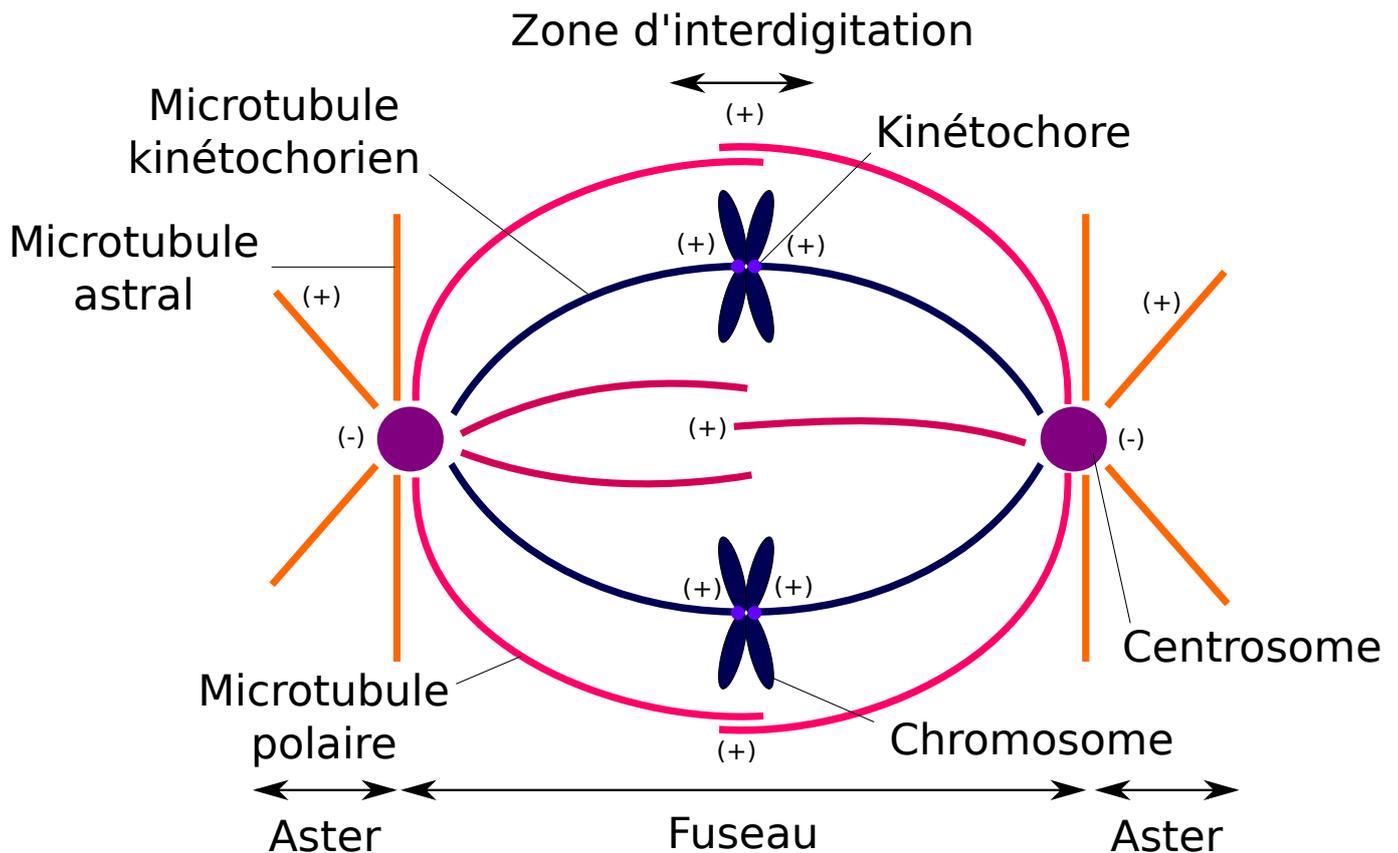
Plusieurs sous-unités du complexe de pore nucléaire se localisent aux microtubules des kinétochores, mais leur fonction sur ces derniers reste à éclaircir. Le complexe RZZ (**R**od-**Z**w10-**Z**wilch) sert d'intermédiaire pour le recrutement du complexe MAD1/MAD2 au kinétochores. En outre, il existe de larges pools cytosoliques de MAD2 et Cdc20. Ubch10 (**U**biquitin-conjugating enzyme **H10**) favorise la dissociation entre Cdc20 et MAD2, mais aussi l'activité du complexe APC/C-Cdc20 [60]. Logiquement, la déplétion de Ubch10 induit l'effet inverse, retardant ainsi l'initiation de l'anaphase. Une autre protéine a été identifiée comme un composant du point de contrôle mitotique, il s'agit de la protéase USP44 (**U**biquitin specific **p**eptidase **44**). La déplétion d'USP44 supprime l'arrêt mitotique en présence de poisons du fuseau [61]. Cet abolition du point de contrôle mitotique est dépendante de l'APC/C, bien que MAD2 et BUBR1 soient correctement localisés aux kinétochores. Ainsi, l'inhibition de l'APC/C par USP44 se fait en aval de celle exercée par MAD2. Une protéine nommée Spindly a été identifiée. Sa déplétion empêche la localisation de la dynéine aux kinétochores, aboutissant à un arrêt en métaphase [62]. Enfin, p31<sup>comet</sup> est un régulateur négatif du point de contrôle mitotique. Il empêche le renouvellement de MAD2 sur MAD1, et neutralise l'activité inhibitrice de MAD2 sur Cdc20, menant ainsi à la levée de l'inhibition par le point de contrôle mitotique [63].

## 1.4 Importance des microtubules pour la mitose

Dernière étape du cycle cellulaire, la mitose est une période au cours de laquelle la cellule assemble, puis désassemble, une structure microtubulaire spécialisée, l'appareil mitotique. Plus volumineux que le noyau, l'appareil mitotique est conçu pour s'attacher à et capturer les chromosomes, les aligner, puis les séparer de manière équitable entre les deux cellules filles.

### 1.4.1 L'appareil mitotique se compose de microtubules

La structure de l'appareil mitotique change constamment au cours la mitose [5]. En métaphase, l'appareil mitotique est organisé en deux parties : un fuseau mitotique central et une paire d'« asters » (étoiles). Le fuseau est un paquet bilatéral et symétrique de microtubules associés à des protéines, et avec une forme générale en ballon de rugby. Il est divisé en deux moitiés opposées par rapport au plan équatorial de la cellule, et donc par rapport aux chromosomes métaphasiques. Les asters sont des éta-lages radiaux de microtubules situés à chaque pôle du fuseau.



**FIGURE 1.6 – Structure de l'appareil mitotique.** L'appareil mitotique est organisé par les centrosomes. Il est composé de trois types de microtubules : kinétochoriens, polaires et astraux. Le fuseau mitotique est constitué des deux premiers, et les asters du troisième. La zone d'interdigitation est la zone de chevauchement des microtubules polaire opposés.

Dans chaque moitié du fuseau, un centrosome situé au pôle organise trois groupes distincts de microtubules dont les extrémités négatives sont toutes dirigées vers ce même centrosome. Un groupe, les **microtubules astraux**, forment les asters ; ils rayonnent du centrosome vers le cortex de la cellule, où ils aident à positionner l'appareil mitotique, et plus tard aideront à déterminer le plan de clivage pendant la cytokinèse. Le second groupe est constitué par les **microtubules du kinétochore**, et s'attachent aux chromosomes au niveau de cette région spécialisée. Enfin, les **microtubules polaires** n'interagissent pas avec les chromosomes, mais au lieu de cela se chevauchent avec les microtubules polaires du pôle op-

posé.

Deux types d'interactions maintiennent ensemble les deux moitiés du fuseau pour former un appareil mitotique symétrique bilatéralement [64] :

- les interactions latérales entre les extrémités positives chevauchantes des microtubules polaires ;
- les interactions entre les microtubules kinétochoriens et kinétochores des chromatides soeurs.

### 1.4.2 Le kinétochore aide au transport des chromosomes

Les chromatides soeurs d'un chromosome métaphasique sont transportées à chaque pôle liées aux microtubules kinétochoriens. Au regard de leur attachement aux microtubules et de leur mouvement, les chromosomes diffèrent substantiellement des vésicules ou autres organelles transportés le long des microtubules cytosoliques. Le lien entre les chromosomes métaphasiques et l'extrémité positive des microtubules kinétochoriens est réalisé par le kinétochore. Le kinétochore est un large complexe protéique à plusieurs fonctions [65] :

- **capturer et attacher l'extrémité des microtubules aux chromosomes ;**
- **générer les forces pour bouger les chromosomes le long des microtubules ;**
- **réguler la séparation et la translocation des chromosomes au pôles ;**
- **recruter les protéines nécessaires au point de contrôle mitotique.**

Dans une cellule animale, le kinétochore se forme au centromère, et s'organise en une couche interne et une couche externe intégrées dans une couronne fibreuse. La localisation du centromère, et ainsi du kinétochore, est directement contrôlée par une séquence spécifique d'ADN chromosomique appelée ADN centromérique. Bien que les séquences de l'ADN centromérique et celles des protéines de liaison à l'ADN du kinétochore ne soient pas bien conservées, les protéines qui relient le kinétochore au fuseau sont elles conservées de la levure jusqu'à l'Homme. Les protéines motrices des microtubules (*e.g.*, la kinésine mitotique MCAK [66] et la dynéine cytosolique [67]) coopèrent dans l'attachement du kinétochore à une extrémité d'un microtubule pendant que les sous-unités du tubuline sont ajoutées ou libérées. La présence de ces protéines motrices indiquent que les kinétochores jouent un rôle dans le transport des chromosomes aux extrémités opposées de la cellule pendant la mitose.

### 1.4.3 Les centrosomes dirigent la mitose

Du fait que chaque moitié de l'appareil mitotique métaphasique émane d'un centrosome polaire, son assemblage dépend de la duplication des centrosomes, et du mouvement des centrosomes fils aux pôles opposés de la cellule. Ce processus, connu sous le nom de cycle centriolaire (ou cycle des centrosomes), marque les premières étapes de la mitose, commençant durant la phase  $G_1$  quand les centrioles

et d'autres composants du centrosome sont dupliqués. En phase  $G_2$ , les deux centrioles fils ont atteint leur taille optimale, mais les centrioles dupliqués sont toujours présents au sein d'un seul et même centrosome. En début de mitose, les deux paires de centrioles se séparent en migrant vers les côtés opposés du noyau, établissant ainsi la bipolarité de la cellule en division. De ce point de vue, et uniquement de celui-ci, **la mitose peut être vue comme la migration des centrosomes dupliqués**, qui le long de leur parcours capturent les chromosomes, s'arrêtent en métaphase, et durant l'anaphase continuent leur mouvement vers leur nouvelle localisation dans les cellules filles où ils libèrent les chromosomes et organisent les microtubules cytosoliques.

La dynamique des microtubules change drastiquement au début de la mitose, à mesure que les longs microtubules interphasiques disparaissent et sont remplacés par les microtubules astraux et du fuseau. Ces microtubules mitotiques, qui se forment à partir des centrosomes nouvellement dupliqués, sont peu nombreux, plus courts, et moins stables que les microtubules interphasiques. La durée de vie moyenne d'un microtubule interphasique est 10 minutes, et passe à 60-90 secondes pour les microtubules de l'appareil mitotique. **Cette augmentation de l'instabilité dynamique permet aux microtubules de s'assembler, et de se désassembler rapidement pendant la mitose.**

#### 1.4.4 Protéines motrices et dynamique des microtubules

Une fois les chromosomes dupliqués et alignés, se déroule alors la formation du fuseau. Les centrosomes facilitent la formation du fuseau par nucléation des microtubules. Mais les extrémités négatives des microtubules sont stabilisées et réunies par le travail du couple dynéine-dynactine [67]. Ce rôle de la dynéine a été montré chez le xénope par l'addition d'un anticorps dirigé contre cette dernière, et dont l'effet était de libérer et écarter les microtubules du fuseau tout en laissant les microtubules astraux et centrosomiques en place.

**L'instabilité dynamique des microtubules du fuseau à leur extrémité positive est critique pour la capture des chromosomes** à mesure que l'enveloppe nucléaire commence à se fragmenter. Cette capture s'effectue par allongement et raccourcissement rapide des microtubules. Il arrive que l'extrémité positive d'un microtubule se lie directement à un kinétochore. Plus communément, un kinétochore se lie d'abord à un côté d'un microtubule, et glisse jusqu'à l'extrémité positive au cours d'un processus impliquant les dynéines cytosoliques et les kinésines mitotiques.

Durant la prométaphase, les chromosomes, nouvellement condensés et attachés aux extrémités positives des microtubules kinétochoriens, se déplacent vers l'équateur du fuseau. Pendant ce trajet, les chromosomes affichent un comportement aléatoire, oscillant entre des mouvements de va-et-vient

entre les pôles et l'équateur. Ces oscillations résultent de l'alternance entre polymérisation et dépolymérisation aux extrémités positives des microtubules. De plus, des protéines motrices associées à la fois aux extrémités des microtubules kinétochoriens et aux extrémités distales des microtubules polaires génèrent des forces d'opposition pour positionner les chromosomes équitablement entre les deux pôles du fuseau.

Enfin durant l'anaphase, au moins trois processus impliquant les microtubules et les protéines motrices sont responsables de la séparation des chromatides soeurs et des pôles de la cellule mère :

- une **force de poussée générée** par le glissement, due aux kinésines, des microtubules polaires entre eux ;
- une **force de traction générée par les dynéines** cytosoliques associées au cortex ;
- une **force de traction générée par le raccourcissement des microtubules polaires** à leur extrémité positive.

## 1.5 Poisons des microtubules et modèle des réseaux compétitifs

### 1.5.1 Poisons des microtubules

Le rôle crucial des microtubules pour la mitose, mais aussi pour d'autres fonctions cellulaires vitales pour la cellule comme la motilité ou et les contacts intercellulaires, en font des **cibles intéressantes pour la chimiothérapie**. Un grand nombre de composés chimiques sont capables de se lier à la tubuline ou aux microtubules, et d'inhiber ainsi la prolifération cellulaire par action sur le fuseau mitotique. Certains de ces composés, comme les vinca-alcaloïdes ou la colchicine, inhibent la polymérisation des microtubules, d'autres, comme les taxanes, stabilisent les microtubules. Bien que ces composés exercent des effets opposés sur les microtubules, ils partagent la propriété de supprimer la dynamique des microtubules, et donc leur fonction, touchant ainsi le fuseau mitotique, et bloquant les cellules en promé-taphase, ou en métaphase [68]. Cet arrêt mitotique est le mode d'action majeur des ces poisons des microtubules ou poisons du fuseau.

Les poisons des microtubules agissent par liaison aux dimères de tubuline à différents sites, et à différentes positions sur les microtubules [2]. Ils peuvent être classifiés en trois catégories principales sur la base de leur domaine de liaison à la tubuline : le **domaine des vinca-alcaloïdes**, le **domaine de la colchicine**, et le **domaine du paclitaxel**. Néanmoins, d'autres catégories ont été proposés pour d'autres composés touchant les microtubules. Cette thèse n'impliquant que le paclitaxel, seul les taxanes seront traités ici.

## 1.5.2 Mécanismes de résistance aux taxanes

En dépit de la contribution des taxanes dans l'amélioration de la qualité de vie, et la survie, des patients atteints d'un cancer, le développement de résistances cellulaires représente une sérieuse limitation à leur utilisation clinique. Les deux principaux mécanismes impliqués dans ces phénomènes de résistance, sont l'expression d'un phénotype MDR (**Multidrug resistance**), et les altérations des cibles cellulaires des taxanes, principalement le système tubuline/microtubule. Plusieurs autres mécanismes de résistance, moins étudiés, ont été décrits. Il s'agit notamment d'altérations du contrôle de l'apoptose, et des signaux de mort cellulaire. Un autre mécanisme de résistance connu, celui qui précisément nous intéresse, est l'échappement à l'arrêt mitotique. Il ne sera pas traité ici, mais détaillé dans les sous-sections suivantes.

### 1.5.2.1 La MDR comme mécanisme de résistance

La MDR est un terme utilisé pour décrire la capacité des tumeurs résistantes à présenter des **résistances simultanées** à un nombre d'agents chimiothérapeutiques, structurellement, et fonctionnellement non apparentés. La MDR a été le premier mécanisme de résistance aux taxanes décrit ; c'est aussi le plus fréquemment rapporté. Le phénotype MDR repose souvent sur la surexpression de **pompes à efflux**, qui empêchent l'accumulation des composés chimiques à l'intérieur de la cellule. Parmi ces pompes à efflux, P-gp (**P-glycoprotein**) est sans doute la plus connue, mais d'autres pompes à efflux sont aussi étudiées, notamment MRP1 (**Multidrug resistance protein 1**), BCRP (**Breast cancer resistance protein**), et les transporteurs de la famille ABC (**ATP-binding cassette**). La sélection de lignées cellulaires cancéreuses avec du paclitaxel aboutit fréquemment à un phénomène de MDR par augmentation de l'expression de P-gp [69]. La surexpression de P-gp est fréquente dans plusieurs types tumoraux, et est fréquemment associé à une résistance au paclitaxel. MRP1 a aussi été très étudié. Il présente une structure similaire à P-gp, cependant, alors que P-gp reconnaît préférentiellement les molécules hydrophobes, MRP1 cible les molécules hydrophiles et les anions inorganiques. Son implication dans la résistance aux taxanes est négligeable comparé à celle de P-gp [69]. BCRP a été nommé ainsi car il a été initialement isolé dans des lignées de cancer de sein résistantes à la doxorubicine, et son expression ne confère pas de résistance aux taxanes [70]. La famille de transporteurs ABC est très largement distribuée dans les tissus normaux. Leur rôle physiologique exacte reste à élucider. Tout comme, P-gp, ces transporteurs ciblent les composés hydrophobes, et leur expression est susceptible de conférer une résistance aux taxanes [70].

### 1.5.2.2 Résistance associée à des altérations du système tubuline/microtubule

Les microtubules sont des polymères filamenteux du cytosquelette, formés d'hétérodimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  ; ces hétérodimères s'assemblent pour former des protofilaments linéaires dont l'association de 13 d'entre eux forme un microtubule. Le paclitaxel et le docétaxel se lient à la tubuline  $\beta$ . Les altérations du système tubuline/microtubule qui ont été proposées comme conférant une résistance aux taxanes sont [70] :

- des mutations de la tubuline ;
- des changements des niveaux d'expression de la tubuline  $\beta$  ;
- des changements des niveaux d'expression des régulateurs des microtubules, tels que les MAP (**M**icrotubule **a**ssociated **p**rotein) ;
- des modifications post-traductionnelles de la tubuline ou des protéines régulatrices des microtubules ;
- une réduction du contenu en tubuline de la cellule.

Dans la plupart des cas, de telles altérations sont supposées **affecter le site de liaison à la tubuline  $\beta$** , et ainsi diminuer l'efficacité de liaison. Une autre explication est un **changement dans l'équilibre dynamique** des microtubules, réduisant ainsi leur stabilité, et donc contrecarrant l'effet stabilisateur du paclitaxel. Il est intéressant de noter que l'intérêt porté à ce type de résistance est très récent comparé à celui reposant sur la MDR. En conséquence, la contribution de ces mécanismes à la résistance clinique n'est pas pleinement comprise.

### 1.5.2.3 Résistance associée au statut de p53

Deux autres mécanismes de résistance au paclitaxel ont été bien étudiés. Il s'agit des altérations touchant p53 (**P**rotein **53** kDa) et les protéines de la famille de Bcl-2 (**B** cell **l**ymphoma **2**). L'implication des protéines de la famille de Bcl-2 sera traitée dans le chapitre de l'introduction y étant consacré. Nous nous intéresserons ici à p53. La perte de p53 n'aboutit pas forcément à une résistance au paclitaxel. Par exemple une lignée tumorale ovarienne, présentant une forme non mutée de p53, ne devenait pas résistante lorsqu'elle était transfectée avec une forme dominante-négative de p53 [71]. À l'inverse, il a été montré qu'une autre lignée tumorale ovarienne, présentant une forme mutée de p53, était plus sensible au paclitaxel [72]. Les auteurs ont conclu que cela était associé à une inhibition de la mort post-échappement<sup>1</sup>. Il y a plusieurs possibilités pouvant expliquer pourquoi la perte d'un p53 fonctionnel peut mener à une sensibilité au paclitaxel. Par exemple la perte de p53 peut empêcher l'activation du point de contrôle de la phase  $G_1$ , qui nécessite l'induction de p21. Un autre exemple est que la perte de p53 induit une augmentation de MAP4 (**M**icrotubule-**a**ssociated **p**rotein **4**), ce qui augmente la polymé-

1. La définition de la mort post-échappement sera développée dans les sections suivantes.

risation des microtubules, et ainsi augmente la sensibilité au paclitaxel [73]. Enfin une étude suggère un lien entre les mutations de p53 et celles de la tubuline [74].

### 1.5.3 Le paclitaxel induit l'arrêt mitotique

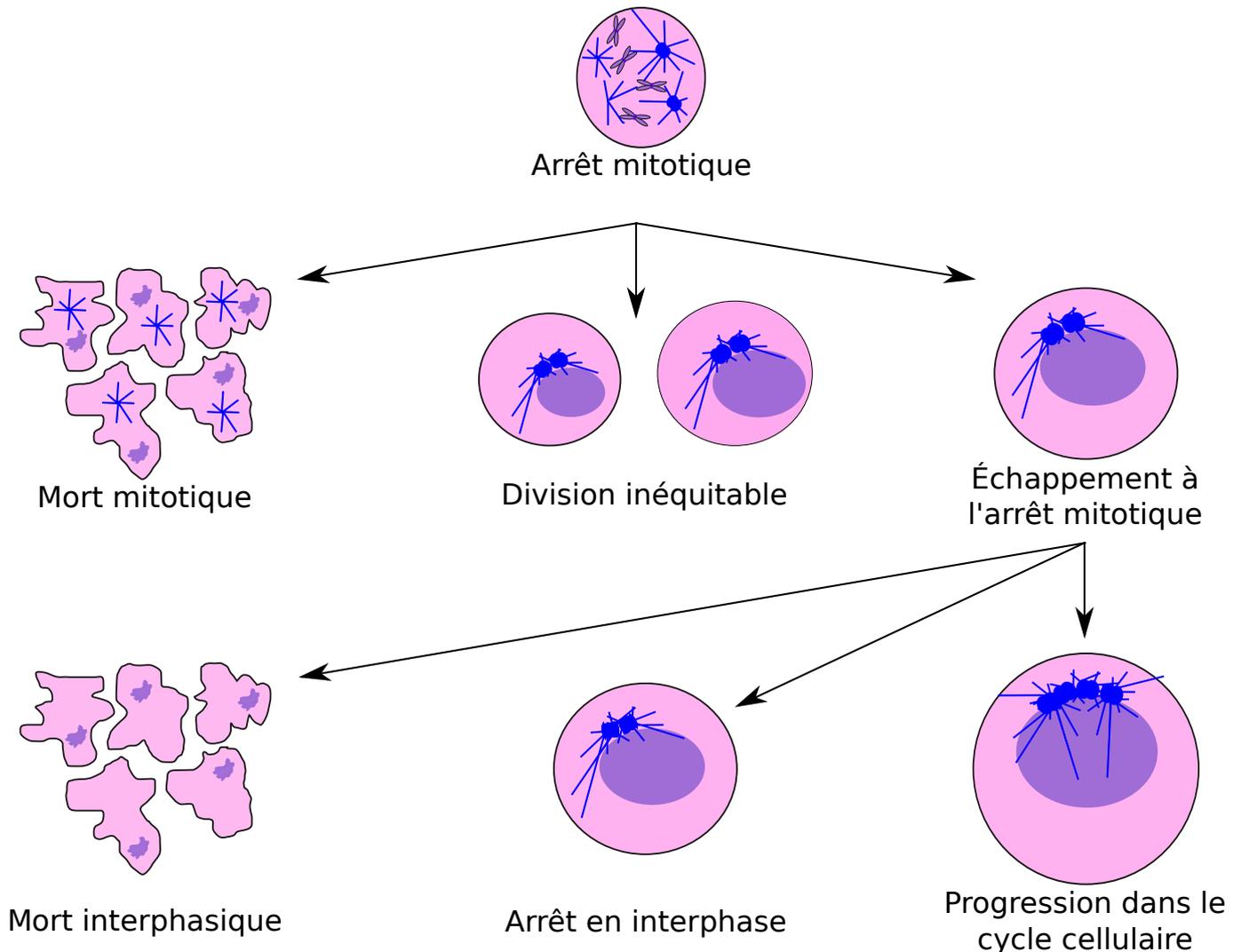
L'action anti-tumorale significative des taxanes fait que ces composés représentent une classe importante au sein des agents anti-cancéreux. Les composés les plus connus sont le paclitaxel et le docétaxel, tous deux largement utilisés en clinique. Il sera principalement question ici du paclitaxel.

Le paclitaxel agit par **inhibition de la dépolymérisation des microtubules** (stabilisation), et promeut la formation de microtubules anormalement stables [75]. Cela empêche la réorganisation dynamique du réseau microtubulaire nécessaire à la mitose et à la prolifération cellulaire. De cette manière le paclitaxel induit un arrêt des cellules en prométaphase par non satisfaction du point de contrôle mitotique. En effet, des microtubules anormalement longs ne sont plus en mesure d'exercer une tension sur les kinétochores, et la libération de Cdc20 par MAD2 ne peut être déclenchée [58]. Une exposition prolongée au paclitaxel peut induire l'apoptose. La concentration en paclitaxel est importante dans l'induction de la mort, et des concentrations élevées (supérieures à 200 nmol/l) peuvent induire la formation de paquets de microtubules, provoquant une mort indépendante de l'arrêt mitotique [76].

La cible cellulaire du paclitaxel est la tubuline  $\beta$  lorsqu'elle est engagée dans un polymère de microtubule, et d'une manière générale les taxanes se lient préférentiellement aux microtubules plutôt qu'aux dimères de tubuline isolés (tubuline  $\alpha$  + tubuline  $\beta$ ). Le site de liaison des taxanes est situé sur les 31 résidus en position N-terminale de la tubuline  $\beta$  [77]. Ce site est distinct du site de liaison au GTP (Guanosine triphosphate). Le paclitaxel se lie de manière réversible aux microtubules, mais avec une haute affinité, et une stœchiométrie d'une molécule de paclitaxel par dimère [78]. Nous ajouterons qu'avec le même site de liaison et la même stœchiométrie, le docétaxel possède une affinité plus élevée que le paclitaxel [58].

### 1.5.4 Le paclitaxel induit plusieurs devenir cellulaires

En dépit d'intenses recherches, le mécanisme précis par lequel le paclitaxel, et plus généralement les poisons des microtubules, induisent la mort reste obscur. En effet le lien moléculaire entre l'arrêt mitotique prolongé et la mort cellulaire reste inconnu à ce jour. De plus, une ambiguïté persiste concernant le moment où se produit la mort cellulaire. Certaines études montrent que l'exposition à la drogue est suivie par l'**échappement de la cellule à l'arrêt mitotique sans division cellulaire** (Figure 1.7), aboutissant à une pseudo-phase  $G_1$  durant laquelle la cellule est présente à l'état tétraploïde. Des études rapportent



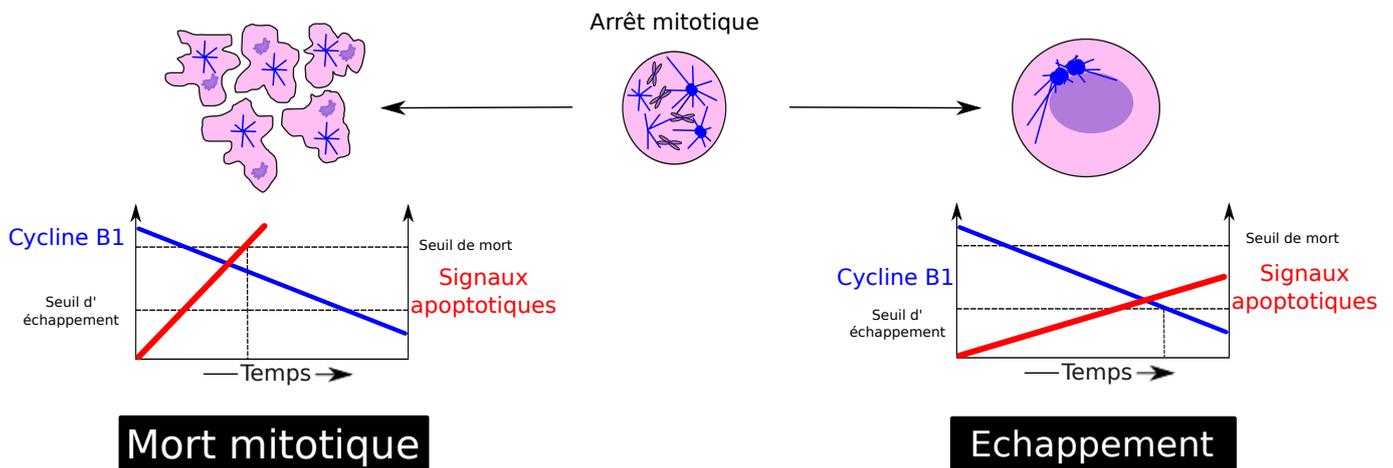
**FIGURE 1.7 – Devenirs cellulaires en réponse à un traitement par les poisons des microtubules.** Quand les cellules sont exposées à des poisons des microtubules, tels que le paclitaxel, elles s'arrêtent en mitose à cause d'une activation chronique du point de contrôle mitotique. Elles subissent ensuite un des devenir cellulaires présentés ici. Les cellules peuvent mourir directement en mitose, ou se diviser de manière non équitable d'un point du matériel génétique pour donner des cellules filles aneuploïdes. Alternativement, les cellules peuvent sortir de mitose sans se diviser. Dans ce cas les cellules peuvent mourir en interphase, s'arrêter en interphase, ou entrer dans des cycles cellulaires additionnels.

que la cellule **meurt au cours de cette pseudo-phase  $G_1$** , ou **s'engage dans des cycles cellulaires additionnels**. D'autres études indiquent que la **mort cellulaire se produit directement en mitose**. Reste la possibilité de la **division anormale**, qui elle aussi a été observée.

Le but de traitement au paclitaxel étant de tuer les cellules en mitose, la capacité d'une cellule à échapper à l'arrêt mitotique, et à survivre à l'issue de ce dernier, constitue un **mécanisme de résistance**. Ceci est d'autant plus important qu'une cellule ayant échappé à l'arrêt mitotique a doublé sa quantité d'ADN, ce qui représente une source potentielle d'agressivité.

### 1.5.5 Le modèle des réseaux compétitifs

Durant une mitose normale, **la sortie de mitose est déclenchée par la dégradation rapide de la cycline B1**. La dégradation de la cycline B1 est empêchée par l'activité du point de contrôle mitotique jusqu'à ce que les chromosomes soient alignés et correctement attachés. Il apparaît que, dans des cellules de mammifères exposées à des poisons des microtubules, **la cycline B1 est toujours lentement dégradée en dépit de l'activation du point de contrôle mitotique** [79, 80]. Éventuellement, la quantité de cycline B1 tombe en dessous du seuil qui est nécessaire au maintien de l'état mitotique, et la cellule sort de mitose, un processus connu sous le nom d'échappement à l'arrêt mitotique [79]. En concordance avec cela, quand la cycline B1 est surexprimée, il faut plus de temps pour que le seuil soit atteint, et ainsi l'échappement à l'arrêt mitotique est retardé [80]. En outre, il est important de signaler que la fréquence d'échappement à l'arrêt mitotique diffère entre les populations cellulaires, mais aussi à l'intérieur d'une population cellulaire génétiquement identique [80].



**FIGURE 1.8 – Le modèle des réseaux compétitifs.** La décision de déclencher la mort en mitose ou de faire de l'échappement à l'arrêt mitotique est dictée par deux réseaux en compétition, l'un impliquant l'activation des voies de mort cellulaire, et l'autre protégeant de la dégradation de la cycline B1. Durant un arrêt mitotique prolongé, les signaux de mort cellulaire deviennent plus fort en même temps que les niveaux de cycline B1 baissent. Les deux réseaux possèdent des seuils et la destinée de la cellule est déterminée par le premier seuil outrepassé. Ainsi, si les niveaux de cycline B1 passe en premier en dessous du seuil de sortie de mitose, l'échappement à la mitose se produit. Si le seuil de mort de mort cellulaire est outrepassé le premier, alors les cellules meurent en mitose.

Des études ont identifié le processus de mort cellulaire en mitose comme un processus dépendant des caspases, puisque des inhibiteurs des caspases empêchent, ou retardent, la mort des cellules cancéreuses [81]. De plus, l'inhibition des caspases peut prolonger la durée de l'arrêt mitotique. Pour expliquer la capacité des inhibiteurs des caspases à prolonger l'arrêt mitotique, Karen E. Gascoigne et Stephen S. Taylor ont proposé un modèle où la destinée cellulaire serait déterminée par deux réseaux

en compétition, l'un impliquant l'activation des voies de mort cellulaire, et l'autre contrôlant la dégradation de la cycline B1 et la sortie de mitose [3].

Karen Gascoigne et Stephen Taylor proposent que ces deux réseaux agissent dans des directions opposées durant l'arrêt mitotique : pendant que les signaux de mort cellulaire deviennent de plus en plus forts, les niveaux de cycline B1 baissent. Les deux réseaux possèdent des seuils, et le fait qu'une cellule subisse la mort est déterminé par une « course » entre les deux réseaux. Au sein d'une cellule, le fait qu'un des deux seuils soit atteint avant l'autre détermine la destinée de cette même cellule. **Ainsi, si les niveaux de cycline B1 passent, en premier, en dessous du seuil de sortie de mitose, il se produit l'échappement à l'arrêt mitotique. Si le seuil de mort est atteint en premier, la cellule meurt en mitose.**

### 1.5.6 Caractéristiques de la mort post-échappement et de la mort mitotique

Le modèle des réseaux compétitifs, même s'il n'y fait pas explicitement référence, participe à la définition de ce qu'on appelle la « **catastrophe mitotique** ». La catastrophe mitotique est un terme générique, utilisé pour décrire un **mécanisme oncosuppressif** de lutte contre l'instabilité génétique. Plus précisément, nous pourrions dire que la catastrophe mitotique regroupe les phénomènes de mort (ou de sénescence) qui sont précédés par un arrêt mitotique, ou une atteinte du fuseau mitotique, ou les deux. Cette définition fait de la catastrophe mitotique un phénomène très **hétérogène**, qui bien que dénommé « mitotique » regroupe trois types de mort qui ne se produisent pas nécessairement pendant la mitose :

- **la mort mitotique**, qui se produit en présence de niveaux élevés de cycline B ;
- **la mort post-échappement**, se produisant après l'échappement à l'arrêt mitotique ;
- **la sénescence post-échappement**, qui désigne le fait qu'après échappement à l'arrêt mitotique, la cellule ne s'engage pas d'un nouveau cycle cellulaire, ne meurt pas non plus, et présente des caractéristiques de la sénescence.

Ainsi, le modèle des réseaux compétitifs passe outre cette définition de la catastrophe mitotique, et s'intéresse au moment précis du cycle cellulaire où se produit la mort.

Le modèle des réseaux compétitifs n'explique pas la réponse post-mitotique, c'est à dire les différents comportements observés suite à l'échappement à l'arrêt mitotique. Plusieurs devenir ont été décrits pour les cellules qui font de l'échappement à l'arrêt mitotique : l'arrêt du cycle cellulaire, la progression du cycle cellulaire, et l'apoptose. Les facteurs moléculaires qui gouvernent ces devenir cellulaires restent obscurs. De là le terme de « **point de contrôle de tétraploïdie** (ou polyploïdie) » a émergé. Ce terme a

été introduit pour expliquer la tendance d'une cellule à mourir après l'échappement à l'arrêt mitotique, et associer cela à un mécanisme oncosuppressif. Cependant l'existence d'un point de contrôle de tétraploïdie ne fait pas consensus. Jusqu'à présent, les principales protéines ayant été impliquées dans ce phénomène sont p53, Bax (**Bcl-2 associated x**), Puma (**p53 upregulated modulator of apoptosis**) et p21. En effet, certains travaux suggèrent que p53 empêche la progression du cycle cellulaire après un échappement qui suit un arrêt mitotique prolongé [82]. Cela serait lié au fait que, pendant l'arrêt mitotique, des signaux activateurs de p53 soient générés. Cependant, l'activité principale de p53 est dépendante de la transcription, transcription que la condensation de l'ADN inhibe pendant l'arrêt mitotique. L'échappement à l'arrêt mitotique, et donc la reprise de la transcription, pourrait alors faire suite à une augmentation importante des cibles de p53, ce qui induirait l'apoptose [83]. En soutien à cela est l'observation que la mort post-échappement est dépendante de Bax et Puma [84], deux cibles transcriptionnelles de p53. De même p21, une autre cible transcriptionnelle de p53, a été impliquée dans la sénescence post-échappement [85].

Une autre hypothèse s'affranchit de p53 pour expliquer la mort post-échappement. Il se pourrait en effet que les dommages, ou le stress accumulé pendant la mitose ne déclenchent pas toujours de réponse apoptotique durant la mitose à cause de l'activité de Cdk1 sur la caspase-9 (**Cysteine protease cleaving after asp 9**), qui l'inhibe par phosphorylation [86]. Suivant l'échappement à l'arrêt mitotique, et la perte de l'activité de Cdk1, le seuil apoptotique retournerait à son seuil interphasique. Alors, le signal de dommage ou de stress pré-existant est serait reconnu, et mènerait à l'exécution de l'apoptose. De la même manière que dans le cas d'une mort de p53, tout se passerait comme si la cellule gardait en mémoire le souvenir d'un arrêt mitotique prolongé. Ceci suggère que le devenir cellulaire est déterminé non seulement par les événements se produisant durant l'arrêt mitotique, mais aussi par les conséquences des ces événements après l'échappement à l'arrêt mitotique, aussi bien que par les voies de signalisation additionnelles qui sont activées durant l'interphase. Néanmoins cette notion en suggère à son tour une autre, celle d'une importance de la durée de l'arrêt mitotique pour le devenir cellulaire. Cela a longtemps été suggéré par certains travaux [87], mais cette idée ne s'est pas généralisée, et semble en fait dépendre des conditions physiologiques et expérimentales [80].

La mort mitotique n'est pas mieux caractérisée. Les études s'étant intéressées à ses mécanismes moléculaires traitent principalement de cinq points :

- **l'implication de p73 ;**
- **l'implication des caspases ;**
- **l'influence de l'activité de Cdk1 ;**
- **l'activation de voies apoptotiques par des protéines du point de contrôle mitotique ;**

### — l'implication des protéines de la famille de Bcl-2.

Au moins deux études suggèrent que la mort mitotique est dépendante de p73 (**P**rotein **73** kDa) [88, 89]. Elles décrivent un processus se produisant en mitose, mais dont les racines sont ancrées en phase G<sub>2</sub>, lorsque la transcription est encore possible. L'idée est qu'un mécanisme de « prévention » déclenche l'activité de p73 pour induire des protéines pro-apoptotiques, et provoquer la mort mitotique.

La nécessité des caspases à la mort mitotique fait l'objet de débats. En effet, des phénomènes de mort mitotique dépendants, et indépendants, ont tout les deux été observés [90, 91]. Les caspases observées comme étant impliquées dans la mort mitotique sont la caspase-2 (**C**ysteine **p**rotease **c**leaving **a**fter **a**sp **2**), la caspase-3 (**C**ysteine **p**rotease **c**leaving **a**fter **a**sp **3**), et la caspase-9 [92]. Enfin, un article montre que l'activation des caspases, pendant l'arrêt mitotique, participe aux dommages de l'ADN, via l'activation de CAD (**C**aspase-**a**ctivated **D**Nase) [93].

L'activité de Cdk1 semble être importante dans l'induction de la mort mitotique. Cette idée vient de l'observation de ces cibles. Parmi elles, la survivine, qui est phosphorylée par Cdk1 pendant l'arrêt mitotique [94]. Cette phosphorylation est nécessaire à l'activité anti-apoptotique de la survivine, ce qui suggère que l'activité de Cdk1 empêche la mort. Dans le même, il a été montré que Cdk1 phosphorylait la caspase-9 pendant la mitose pour inhiber la mort [86]. Cdk1 phosphoryle également des membres de la famille de Bcl-2, comme Bcl-x<sub>L</sub> (**B** cell **l**ymphoma **e**xtra **l**arge) [95], et ceci sera traité dans la partie consacrée à cette famille de protéines.

Établir un lien direct entre le point de contrôle mitotique et les voies de mort cellulaire, notamment l'apoptose, fait actuellement l'objet d'intenses recherches, car cela conforterait l'idée que ce point de contrôle constitue effectivement un mécanisme oncosuppresseur. Au moins trois protéines du point de contrôle mitotique ont été montrées comme ayant un lien direct avec l'apoptose. Il s'agit des kinases MPS1, Plk1 et Aurora B, qui toutes phosphorylent p53 [96, 97, 98]. MPS1 semble en effet stabiliser p53, et favoriser son activité transcriptionnel, alors qu'Aurora B et Plk1 l'inhibent<sup>2</sup>.

Enfin, il a été montré que Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 (**M**yeloid **c**ell **l**eukemia-1) régulaient la mort mitotique via des modifications post-traductionnelles [99]. Ceci sera détaillé dans la partie traitant de ces protéines.

---

2. L'absence de transcription pendant la mitose fait que ces phénomènes ne concernent pas directement la mort mitotique, cependant ils ont été placés ici car ce sont des protéines directement impliquées dans le point de contrôle mitotique.

# Chapitre 2

## Le cancer du sein

### 2.1 Physiologie et développement du sein

#### 2.1.1 Physiologie des glandes mammaires

Chez les femmes, les glandes mammaires sont des organes spécialisés qui sont contrôlés principalement par les hormones du système reproducteur [100]. Anatomiquement, une glande mammaire se situe dans le tissu sous-cutané du manchon graisseux pectoral profond. Chaque sein possède un mamelon, une petite projection conique où les canaux de la glande mammaire sous-jacente s'ouvrent à la surface du corps. La peau brune-rougeâtre autour du mamelon est l'aréole, et les larges glandes sébacées profondes de l'aréole lui donnent une texture granuleuse.

Le tissu glandulaire des glandes mammaires est partagé en **lobes séparés**, chacun contenant plusieurs **lobules sécrétoires** (Figure 2.1a). Les canaux des lobules convergent, donnant naissance à un seul **canal lactifère** au sein de chaque lobe [100]. À proximité du mamelon, les canaux lactifères s'élargissent, formant une chambre étendue qui se nomme le **sinus lactifère**. En moyenne, 15 à 20 sinus lactifères s'ouvrent sur la surface de chaque mamelon. Du tissu conjonctif dense entoure le système canalaire, et forme des partitions qui s'étendent entre les lobes et les lobules. Ces bandes de tissu connecteur, les ligaments suspenseurs du sein, prennent leur origine dans le derme de la peau sous-jacente. Une couche de tissu aréolaire sépare la glande mammaire complexe des muscles pectoraux sous-jacents. Des branches de l'artère thoracique interne approvisionnent en sang chaque glande mammaire.

Une **glande mammaire inactive** (ou au repos) est dominée par un système canalaire plutôt que par des cellules glandulaires actives (Figure 2.1b). En dehors de la grossesse, la taille des glandes mammaires chez une femme reflète principalement la quantité de tissu adipeux présent, et en aucun cas la quantité de tissu glandulaire. L'appareil sécrétoire ne complète normalement pas son développement à moins

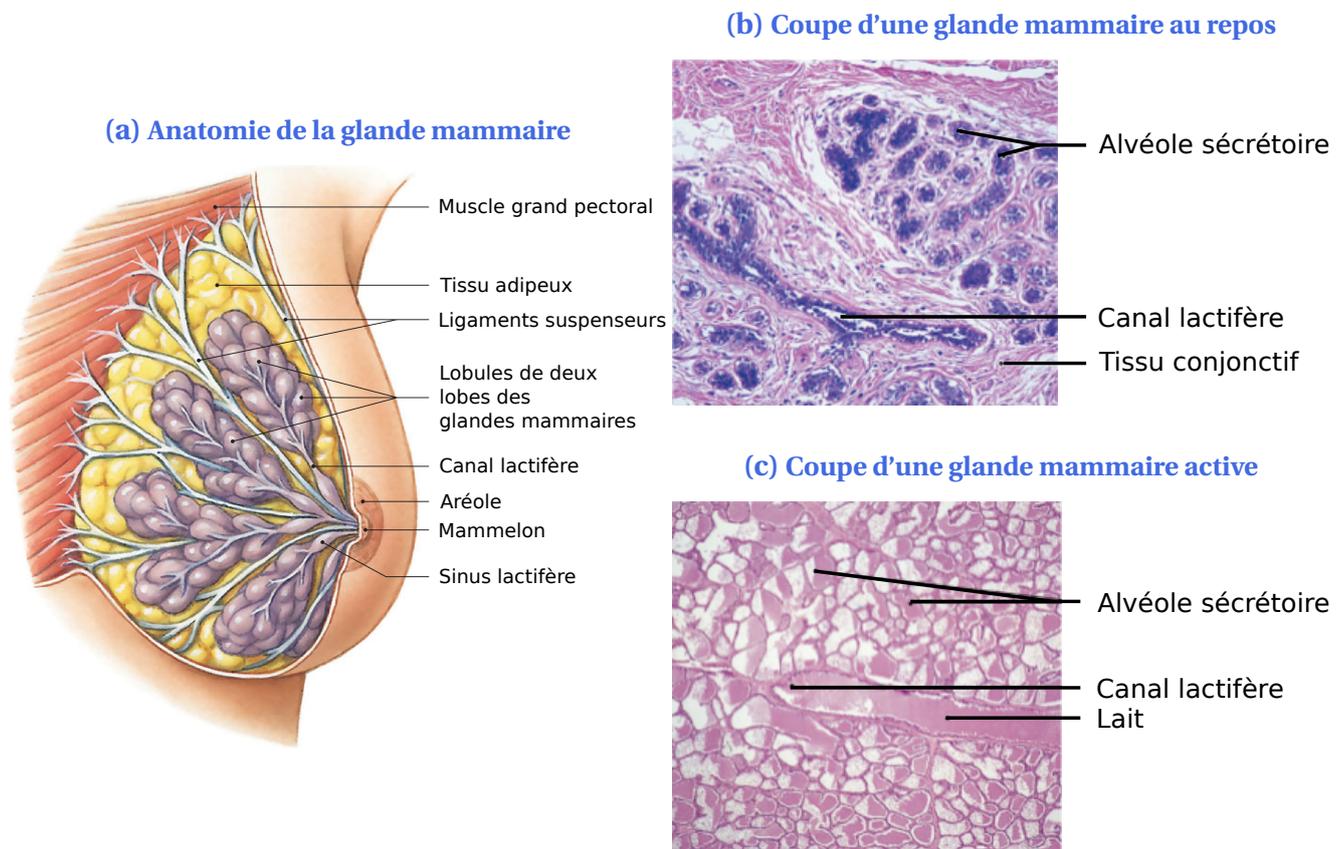


FIGURE 2.1 – Anatomie et histologie de la glande mammaire [100].

que la grossesse se produise. Une **glande mammaire active** est une glande tubulo-alvéolaire consistant en de multiples tubes glandulaires qui se terminent en alveoles sécrétrices (Figure 2.1c).

### 2.1.2 Développement du sein

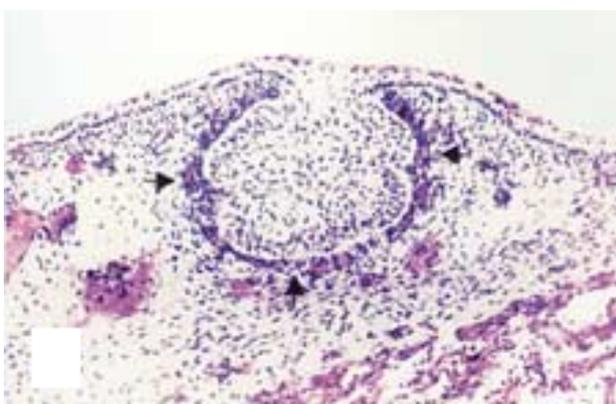
Nous savons très peu de choses des mécanismes moléculaires qui initient la formation du sein. Les seins se forment après que les trois axes majeurs se soient positionnés, et que la segmentation se soit produite. Bien que les mécanismes sous-jacents nous soient inconnus, il semblerait que l'information positionnelle du plan des vertébrés soit transmise aux cellules qui deviendront le sein primordial. Des travaux chez la souris montrent que le sein émerge des **interactions entre les tissus épithéliaux et mésenchymateux** [101], cependant le mécanisme déterminant sa localisation reste inconnu. L'étape initiale de formation de l'organe reste néanmoins de première importance, car elle détermine également l'emplacement des cellules souches. Une fois la zone déterminée, croissance, morphogenèse et différenciation cellulaire se produisent, pour qu'éventuellement, un système rudimentaire de canaux se soit formé au moment de la naissance. Les mécanismes moléculaires qui régulent ces processus de développement sont probablement communs aux autres tissus.

La disponibilité réduite en tissus fait que les études sur le développement du sein humain sont rares.

Cette partie se base essentiellement sur les travaux de Beatrice Howard et Barry Gusterson [101], qui ont collecté des tissus foetaux, enfantins, et péri-pubert, afin de réévaluer le développement normal du sein.

**Développement prénatal** La formation du sein est une étape critique de la morphogenèse. Il a été suggéré que certains des évènements initiaux de la carcinogenèse puissent se produire *in utero*, et aux stades précoces du développement postnatal [102]. Le développement prénatal du sein a été étudié, mais ces descriptions classiques de la littérature européenne s'accompagnent de dessins comportant nombre d'imprécisions, notamment sur les correspondances avec les stades de développement tels qu'ils sont définis actuellement. Une étude plus récente montre que le sein primordial apparaît dans la région thoracique sous forme d'une condensation de tissu épithéliale de 7 à 8 mm de diamètre [101]. Une augmentation de ce diamètre de 10 à 14 mm traduit la différenciation du tissu mésenchymateux sous-jacent, et à 14 mm, le sein primordiale adopte une position plus ventral avec un épithélium formant un nodule. Ensuite, la croissance du nodule continue pour former le **bourgeon du sein** (Figure 2.2a). La structure typique des vaisseaux sanguins apparaît plus tardivement. Puis, une seconde élongation du bourgeon se produit, et la morphogenèse des canaux commence. À 28 semaines de développement, les cellules basales du sein primordial sont positives pour le marquage de la kératine 14 et de l'actine des muscles lisses. Dans le même temps une forte expression de l'EGFR (Epidermal growth factor receptor) et du TGF- $\alpha$  (Transforming growth factor  $\alpha$ ) est observée dans ces cellules, suggérant une stimulation autocrine pour la prolifération. Une **forte expression de Bcl-2** est également observé, probablement pour permettre l'expansion des cellules par inhibition de l'apoptose (Figure 2.2b). Enfin à ce stade l'expression l'expression du collagène de type IV est observé à l'extérieur du bourgeon.

(a) Bourgeon mammaire



(b) Expression de Bcl-2

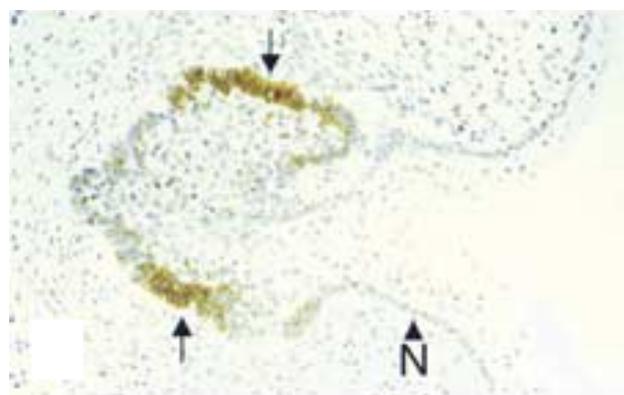


FIGURE 2.2 – Développement prénatal du sein [101]. « N » : Noeud.

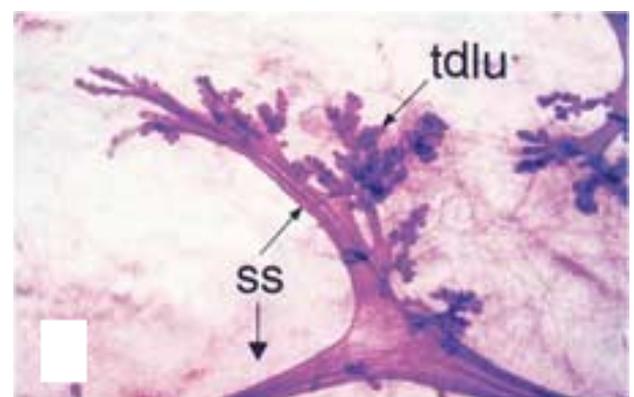
**Développement postnatal** Comme chez le fœtus, de la naissance à la puberté il n'y a aucune différences morphologiques identifiables dans le développement du sein entre les filles et les garçons. Ce-

pendant d'importantes variations du degré de développement glandulaire et, et du degré de différenciation fonctionnelle, peuvent être observées. À la naissance, le système canalaire s'ouvre à la surface de la fosse du sein, une petite dépression à la surface de la peau. Le mésenchyme sous-jacent prolifère pour former le mamelon, la peau qui l'entoure prolifère également pour former l'aréole. Le sein de l'enfant est capable de répondre à des stimuli sécrétoires issus des hormones du lait maternelle comme la prolactine. Les récepteurs hormonaux (ER (**E**strogen **r**eceptor) et PR (**P**rogesteron **r**eceptor)) sont présents dans les cellules du sein infantin, mais le sont aussi dès le stade foetal, et le seront à la puberté. Durant les deux premières années de la vie, **l'épithélium glandulaire se différencie et involue** séquentiellement. Cette involution s'arrête lorsque l'enfant n'est plus soumis aux hormones maternelles. À deux ans, le sein se compose de petites structures canalaire dans un stroma fibroblastique, et aucun autre changement n'a été observé dans le deux sexes jusqu'à la puberté.

**Développement à la puberté** Alors que les changements anatomiques se produisant à la puberté sont bien connus, la séquence d'évènements au niveau cellulaire sont moins bien documentés. Ces changements se produisent à la fois dans l'épithélium et le stroma. Au sein du stroma, il y a une augmentation de la quantité de tissu fibreux et grasseux, si bien qu'un sein adulte non-allaitant se compose de 80 %, ou plus, de stroma.

En effet, l'extension des canaux est précédé par celle du tissu conjonctif, et le tissu grasseux inhibe la croissance épithéliale. Le **dimorphisme sexuel** se produit durant la puberté sous l'influence d'hormones, et chez la femme l'élongation canalaire ainsi que la formation des structures lobulaires se concrétise. Le type de branchement observé durant la puberté est très variable, mais une structure typique se développe. Les canaux primaires qui gagnent le mamelon donne naissance à un profil de branchements complexe de canaux secondaires qui mènent à ce qu'on appelle les canaux segmentaires et les plus petits canaux sous-segmentaires.

Les canaux sous-segmentaires aboutissent à une extrémité fermée, l'acinus. Une collection d'acini issus d'un canal terminal, et entouré d'un stroma intralobulaire est nommé **unité lobulo-canalaire terminale**, et est considéré comme l'unité fonctionnelle du sein (Figure 2.3). Ces unités peuvent être classées en trois types (1, 2 et 3) suivant leur degré de complexité.



**FIGURE 2.3 – Unités lobulo-canalaire terminales [101]. « ss » : canaux sous-segmentaires, « tdlu » : terminal duct lobular unit.**

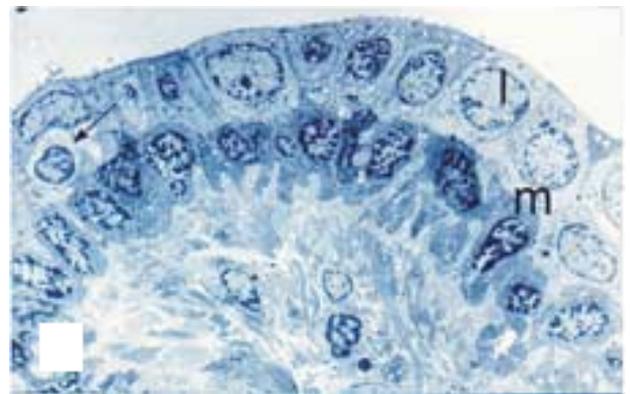
**Développement après la puberté** Chez la femme adulte, l'unité lobulo-canaulaire terminale est circonscrite et délimitée par une couche de fibroblastes. Une perte de tissu conjonctif intralobulaire, et de cellules myoépithéliales est également observée. Il est très difficile d'étudier le sein humain durant la grossesse ou la lactation. Il a seulement été observé que la glande allaitante était composée d'acini dilatés contenant du lait. À la ménopause, une involution se produit. Les unités lobulo-canaulaires terminales diminuent en taille, et en nombre d'acini. Le stroma intralobulaire est remplacé par du collagène, et l'épithélium glandulaire, ainsi que le tissu conjonctif interlobulaire, sont remplacés par du tissu graisseux.

**Populations cellulaires du sein** À partir de la 28<sup>ème</sup> semaine de vie intra-utérine, deux populations cellulaires sont distinguables : une **population interne luminale**, et une **population externe myoépithéliale**, séparées par une **membrane basale**. Au sein de la glande pleinement développée, les cellules luminales peuvent être en contact avec la membrane basale, mais en grande partie, font face à la lumière de l'acinus (Figure 2.4). Le terme de cellule basale a été introduit pour distinguer les cellules des canaux en position basale, des cellules myoépithéliales de l'acinus. Cette classification est en partie **basée sur la forme des cellules**, puisque les cellules basales ont une forme cuboïdale, et les cellules myoépithéliales sont

aplaties.

Il n'y a cependant pas de distinction fonctionnelle précise, et le terme myoépithéliale reflète le fait que ces cellules sont fortement concentrées en microfilaments d'actine et en actine du muscle lisse.

Les distinctions ultrastructurales entre ces deux populations cellulaires sont clairement visibles. Les cellules luminales ont un cytoplasme moins dense aux électrons, et une architecture chromatinienne ouverte. Les cellules myoépithéliales ont, elles, un cytoplasme plus dense aux électrons et une hétérochromatine localisée en périphérie du noyau.



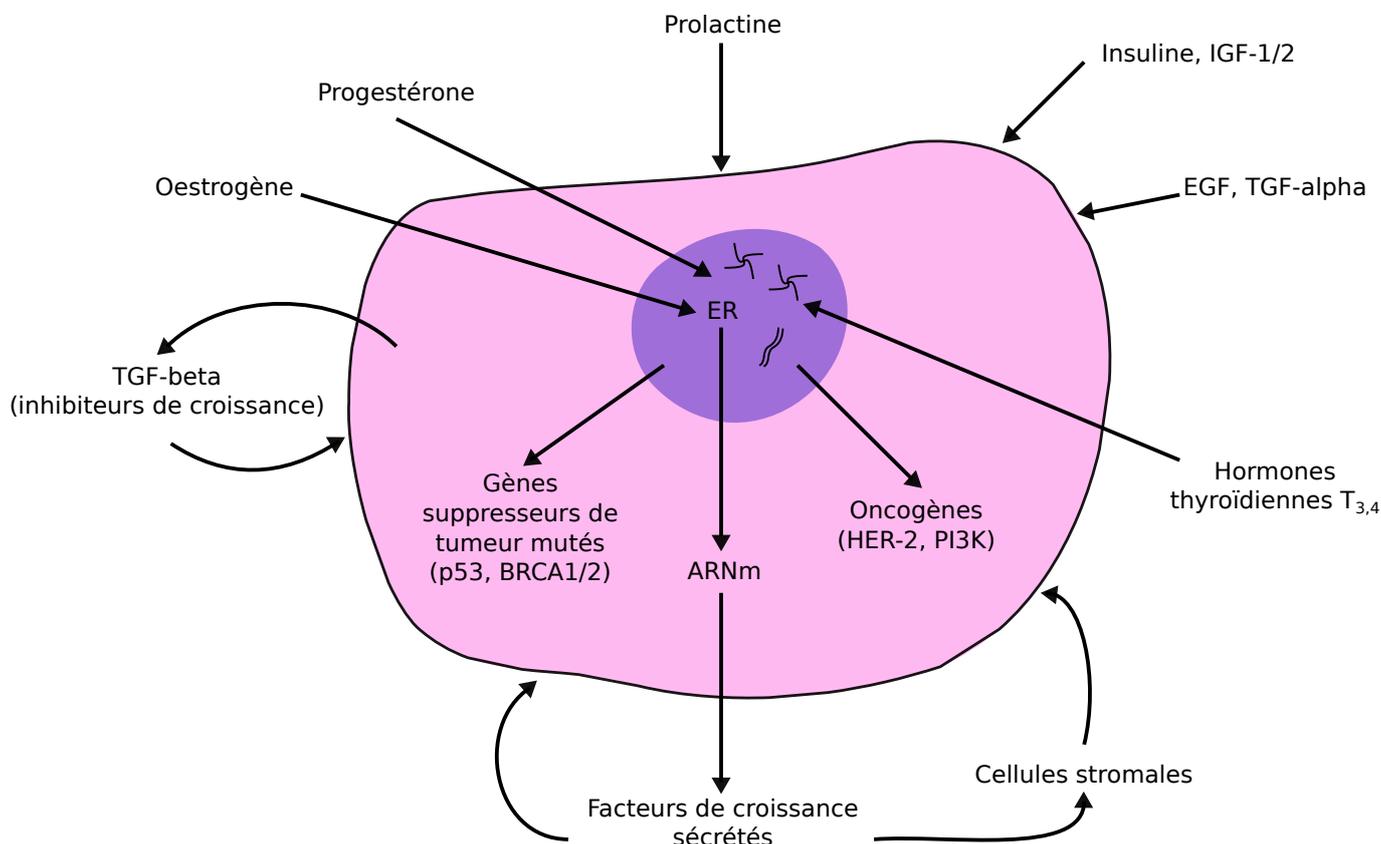
**FIGURE 2.4 – Populations cellulaires de l'acinus [101]. « l » : cellules luminales, « m » : cellules myoépithéliales.**

## 2.2 Régulation de la croissance du cancer sein

Le sein de la femme adulte est composée de canaux lactifères se terminant par des alvéoles sécrétrices, elles-mêmes enchevêtrées dans une structure tissulaire fibreuse et dans du tissu graisseux. La

croissance et le développement normal du sein sont régulés par l'**interaction complexe entre de nombreuses hormones et facteurs de croissance**. Certains de ces composés sont sécrétés par les cellules mammaires elles-mêmes, et peuvent avoir des effets autocrines. L'oestradiol régule l'expression de plusieurs gènes correspondant à des peptides et protéines impliqués dans les mécanismes de contrôle de la croissance cellulaire mammaire. La liaison à des récepteurs spécifiques déclenchent les effets de ces facteurs de croissance et hormones. Les récepteurs aux hormones polypeptidiques sont typiquement localisés à la membrane cellulaire, alors que les récepteurs aux hormones stéroïdiennes sont principalement localisés dans le compartiment nucléaire de la cellule. L'interaction des facteurs de croissance, cytokines et hormones, avec des récepteurs membranaires spécifiques déclenche une cascade de signaux biochimiques intracellulaires, aboutissant à l'activation ou la répression d'un sous-groupe varié de gènes. Plusieurs de ces hormones jouent un rôle actif dans la croissance et le développement des cellules épithéliales mammaires, ainsi que dans la lactation [103]. Du fait que ces hormones et leurs récepteurs régulent le tissu mammaire normal, il n'est pas surprenant que les **cellules malignes**, issues de ce même tissu mammaire, puissent exprimer les récepteurs d'un grand nombre de ces hormones, et puissent conserver un certain degré de **dépendance hormonale**. De nombreuses études utilisant des cellules en culture, aussi bien que du tissu cancéreux mammaire humain, ont démontré la présence des récepteurs de la plupart de ces hormones dans les cellules de cancer du sein humain. Des aberrations génétiques dans les voies de signalisation des facteurs de croissance, pour la plupart acquises, sont inextricablement liées aux anomalies du développement et à une variété de maladies chroniques, ce qui inclut le cancer. Les cellules mammaires malignes résultent d'une suite d'évènement génétiques incluant la **dérégulation de l'expression de facteurs de croissance ou des composants de leur voie de signalisation**.

La régulation de la croissance des cellules tumorales mammaires par des hormones et des facteurs de croissance est schématisée sur la figure 2.5. Le rôle biologique des oestrogènes est réalisé par une liaison de haute affinité à l'ER. Des études suggèrent que les cellules de cancer du sein, sous le contrôle d'oestrogènes, peuvent synthétiser et sécréter leurs propres facteurs de croissance qui pourraient auto-stimuler les cellules cancéreuses, ou le tissu stromal adjacent via des **mécanismes autocrines ou paracrines**. L'aromatase est abondamment exprimée dans de nombreux cancers du sein, permettant à la cellule malignes de synthétiser son propre facteur de croissance, l'oestrogène. Le tissu stromal peut aussi sécréter de l'IGF-1 (**Insulin-like growth factor 1**) et de l'IGF-2 (**Insulin-like growth factor 2**) ce qui stimule les cellules cancéreuses mammaires. Parmi des facteurs de croissance autocrines/paracrines potentiels, se trouvent l'EGF, le TGF- $\alpha$ , l'IGF-2, le PDGF (**Platelet-derived growth factor**) et le FGF (**Fibroblast growth factor**). L'EGF, le TGF- $\alpha$  et l'IGF-2 ont été identifiés dans le sécrétome de cellules de cancer du sein en culture, et dans celui de spécimens tissulaires de cancer du sein humain. Ce sont des mitogènes



**FIGURE 2.5 – Régulation de la croissance du cancer du sein par les facteurs de croissance, oncogènes et suppresseurs de tumeurs.**

potentiels pour la **composante épithéliale** maligne des tumeurs. Le PDGF et le FGF sont sécrétés par les cellules de cancer du sein, et peuvent être responsables de la prolifération de la **composante stromale**, mésenchymateuse, observable dans de nombreux cancer du sein.

Les cellules de cancer du sein humain sécrètent aussi plusieurs peptides qui peuvent avoir une **activité autocrine inhibitrice**. Le TGF- $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ) est un facteur de croissance qui inhibe la prolifération des tissus épithéliaux, et stimule celle du tissu stromal [104]. Des études suggèrent que des cellules de cancer du sein négatives pour l'ER sont plus sensibles au TGF- $\alpha$  que les cellules qui l'expriment. Le potentiel « malin » du cancer du sein est probablement dépendant, au moins en partie, de la balance entre stimulateurs et inhibiteurs de prolifération produits par la tumeur. Les cellules épithéliales et/ou stromales au sein de la tumeur sécrètent aussi des protéases, telles que les cathepsines et les métalloprotéases, qui peuvent participer à l'**invasivité tumorale** et au potentiel métastatique.

Dans les cellules tumorales mammaires **positives pour l'ER**, l'expression et la sécrétion de certains facteurs de croissance autocrine, tels que le TGF- $\alpha$  et IGF-2, sont stimulés par les oestrogènes, et inhiber par les anti-oestrogènes. Dans les cellules **négatives pour l'ER**, la sécrétion de ces facteurs n'est pas régulée par les oestrogènes. Des chercheurs ont émis l'hypothèse que les changements d'expres-

sion de ces facteurs sécrétés peuvent induire, dans une certaine mesure, des effets sur la croissance. Les oestrogènes et les anti-oestrogènes stimulent la synthèse d'ADN, d'ARN (**A**cide **r**ibonucléique) et de protéines, mais aussi l'activité d'enzymes régulatrices. Les anti-oestrogènes ont les effets opposés sur la plupart des tissus. Au bout du compte, les oestrogènes régulent la progression des cellules au sein du cycle cellulaire et de la mitose.

La perturbation des mécanismes de contrôle de croissance au sein d'une cellule aboutit à une prolifération cellulaire incontrôlée, et au développement du cancer. Une telle transformation cellulaire se produit à la suite de l'activation d'**oncogènes**, la perte ou la mutation de **gènes suppresseur de tumeur**, ou les deux [105].

Les équivalents normaux des oncogènes, les proto-oncogènes, fonctionnent en tant que régulateurs de la croissance dans les cellules normales. Des altérations des proto-oncogènes sont associées à l'initiation, et/ou à la maintenance des tumeurs chez l'animal et chez l'Homme. Les produits des oncogènes sont fréquemment des **facteurs de croissance**, des **récepteurs aux facteurs de croissance** ou des **commutateurs moléculaires**. Des oncogènes sont souvent surexprimés dans les tissus cancéreux mammaires, notamment c-Myc (**c**ellular-**M**yelocytose) et Ras (**R**at sarcoma), ou encore les membres de la famille de l'EGFR. La surexpression et la mutation de récepteurs de facteurs de croissance mène souvent à l'activation constitutive de ces derniers, et donc à l'induction de la signalisation sous-jacente en absence de ligand. Des signaux inducteurs de croissance peuvent alors être continuellement transmis aux cellules, aboutissant à l'activation de multiples voies de transduction et à une croissance cellulaire dérégulée. Des gènes normalement impliqués dans le **contrôle du cycle cellulaire**, en particulier les cyclines D et E, constituent aussi des oncogènes potentiels. La surexpression de ces oncogènes peut contribuer à l'initiation et à la maintenance du phénotype malin. Il a été montré que l'expression de c-Myc, Ras et HER-2 (**H**uman epidermal growth factor receptor-2) dans les glandes mammaires de souris augmente l'incidence du cancer du sein, qu'il soit bénin ou malin. Une expression altérée de ces gènes peut avoir de nombreux effets sur la croissance et l'homéostasie de l'épithélium mammaire. Des études ont montré que le blocage de ces récepteurs de facteurs de croissance, ou de leur voie associée, peut avoir des implications thérapeutiques. Ces études ont aussi montré que des anticorps monoclonaux spécifiques d'HER-2 ont d'importants effets anti-tumoraux et inhibent la voie de signalisation de la PI3K (**P**hospho**i**nositide **3** kinase). En outre, ces anticorps monoclonaux agissent en synergie avec des agents cytotoxiques tels que les anthracyclines, les analogues de platine, la vinorelbine et les taxanes. L'EGFR, lorsqu'il est surexprimé, confère un mauvais pronostic au patient. Cependant, l'EGFR ne semble pas être un moteur essentiel du comportement malin dans le cancer du sein, et les anticorps monoclonaux dirigés contre cette cible n'ont donné lieu qu'à des succès marginaux en essai clinique. L'expression

de ces oncogènes au sein de spécimens de cancer du sein humain a été montrée comme fournissant une information valable sur l'agressivité tumorale, le pronostic, ainsi que sur la sensibilité à la thérapie. Bcl-2 est un autre gène fréquemment surexprimé dans le cancer du sein, sa surexpression est associée à un pronostic favorable [106]. Des molécules relais de la signalisation en aval des récepteurs cellulaires de surface sont souvent activés ou autrement altérés dans les cellules malignes. Ainsi, les voies de la PI3K et des MAPK (**Mitogen-activated protein kinase**) sont fréquemment activées dans le cancer du sein, et ce même en absence de surexpression de l'EGFR ou d'HER-2.

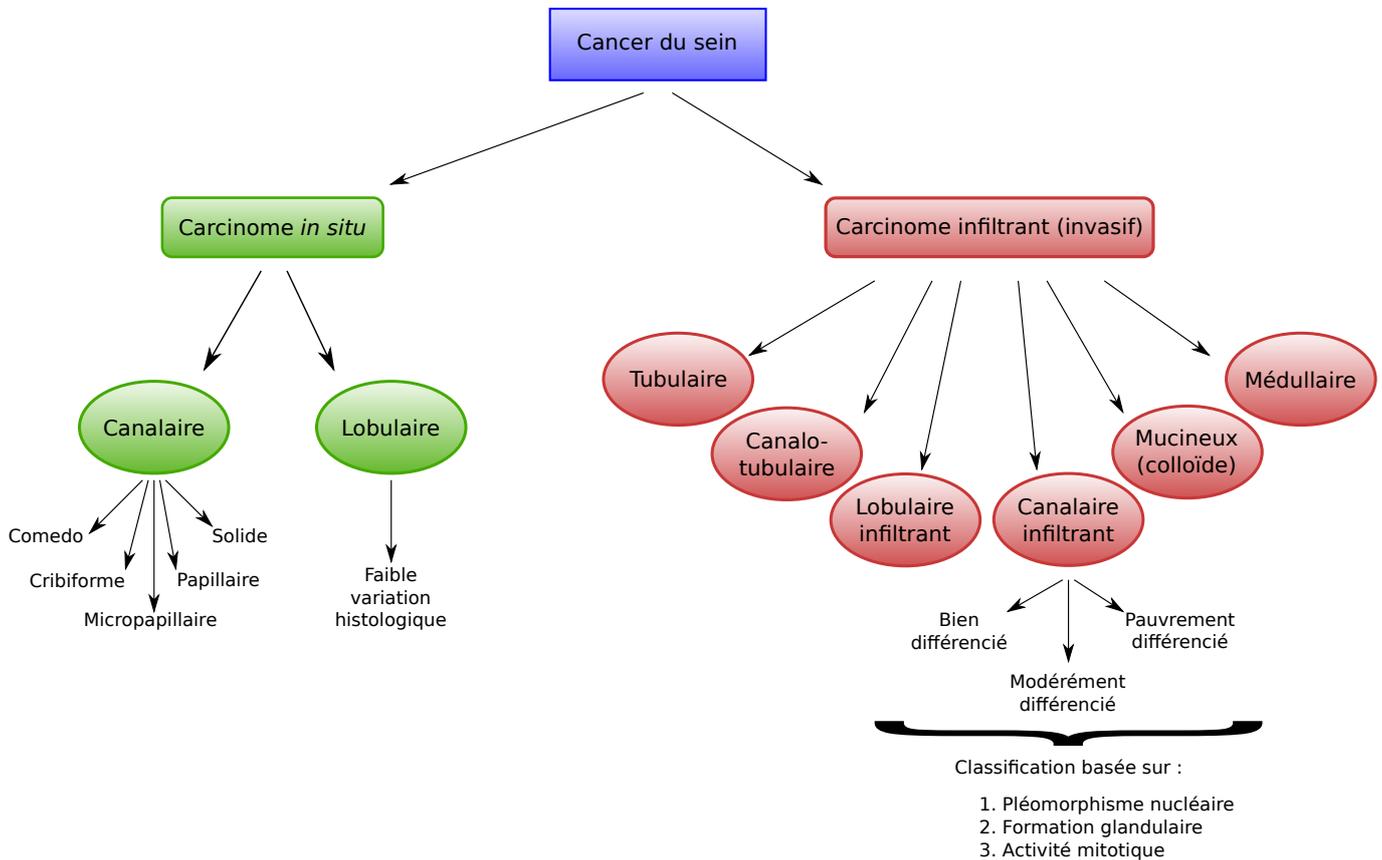
Les gènes supresseurs de tumeurs jouent aussi un rôle dans la carcinogenèse du sein. Des altérations de gènes supresseurs de tumeur bien connus, comme RB1 (**Retinoblastoma 1**) ou p53, ont été identifiées dans les cellules de cancer du sein, aussi bien que dans d'autres tumeurs solides. Des **mutations de p53** ont été trouvées au sein de familles atteintes du syndrome de Li-Fraumeni, qui présentent une augmentation marquée de l'incidence du cancer du sein et d'autres néoplasmes. De plus, plus de 50 % des cancers du sein ont des mutations sur le gène de p53. Les deux gènes mutés associés aux **cancers du sein familiaux**, BRCA1 (**Breast cancer type 1 susceptibility protein**) et BRCA2 (**Breast cancer type 2 susceptibility protein**), sont aussi considérés comme des gènes supresseurs de tumeurs. La fonction normale des produits de ces gènes est de contrôler la prolifération cellulaire (RB1 et p53) ou de faciliter/induire la **réparation de l'ADN** (p53, BRCA1 et BRCA2). Les mutations mènent à des protéines mutées, et ainsi à une progression dérégulée des cellules au sein du cycle cellulaire. La reconnaissance que l'inactivation des gènes supresseurs de tumeurs est associée au cancer du sein pourrait mener à une détection précoce des familles à haut risque, aussi bien qu'à de nouvelles stratégies de traitement pour renverser le phénotype malin par introduction de copies normales du gène à l'aide de la thérapie génique ou par traitement avec la protéines normale elle-même. De telles stratégies font l'objet de recherches actives, que ce soit en laboratoire ou au sein d'essais cliniques.

## 2.3 Classification des cancers du sein

Comme toute classification, celle du cancer du sein a évolué avec l'accroissement des connaissances accumulées sur le sujet. Elle repose essentiellement sur des données histologiques et moléculaires.

### 2.3.1 Sous-types histologiques

**95 % des cancers du sein sont des carcinomes**, c'est à dire des tumeurs se développant à partir de cellules épithéliales [1]. Ces carcinomes peuvent être canaux soit lobulaires, suivant qu'ils se développent à partir des canaux lactifères ou des lobules. Le terme d'adénocarcinome désigne un carcinome issu d'un tissu glandulaire, de ce fait tous les carcinomes peuvent être également appelés ainsi puisque



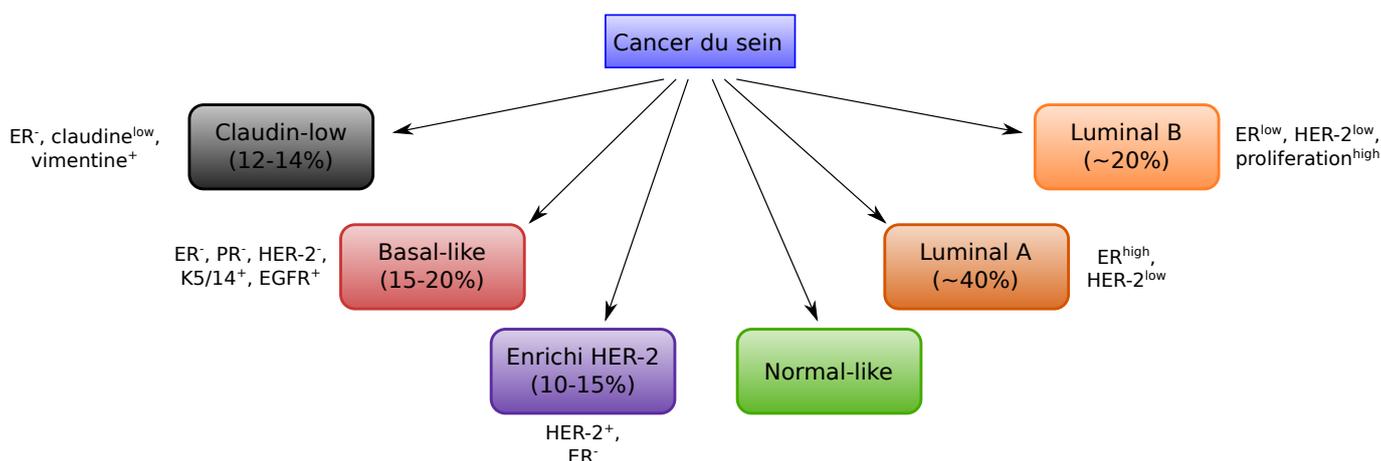
**FIGURE 2.6 – Classification histologique des sous-types de cancer du sein [1].**

les canaux et lobules sont des tissus glandulaires. Les **5 % de cancers du sein restant se développent à partir du tissu entourant la glande**, et bien que plus rares, leur nombre de sous-types est relativement élevé [1]. Nous pouvons citer par exemple, les tumeurs d'origine mésenchymateuse, comme les angiomes qui sont issus des vaisseaux, ou encore les tumeurs fibroépithéliales, comme les tumeurs phylloides qui se développent à partir du tissu conjonctif. Cependant la première distinction histologique de la classification du cancer du sein ne repose pas sur son origine, mais sur le caractère invasif, ou infiltrant de la tumeur. Ce caractère n'est applicable qu'aux carcinomes, car il désigne l'invasion du tissu situé au delà de la membrane basale de la glande. Un carcinome peut donc **soit être *in situ* soit infiltrant**.

Les carcinomes mammaires *in situ* peuvent être à leur tour sous-classifiés en carcinomes mammaires *in situ* canaux ou lobulaires, sur la base de leur profil de croissance et leurs caractéristiques cytologiques. Les carcinomes *in situ* canaux sont considérablement plus fréquents que leurs contreparties lobulaires. Les carcinomes *in situ* canaux ont été traditionnellement subdivisés en comedo, cribiforme, papillaire, micropapillaire et solide. Ce sous-sous-schéma de classification fut un outil valable pendant des décennies, mais, se basant seulement sur des caractéristiques histologiques, il est moins utilisé de nos jours au profit des marqueurs moléculaires.

De la même manière que les carcinomes *in situ*, les carcinomes invasifs sont un groupe hétérogène de tumeurs divisées en plusieurs sous-types histologiques. Les sous-types majeurs sont les carcinomes infiltrants canaux, lobulaires, canalo-lobulaires, mucineux (colloïdes), tubulaires, médullaires et papillaires. De ces derniers, les carcinomes infiltrant canaux sont de loin les plus répandus, représentant 70 à 80 % de toutes les lésions invasives [1].

### 2.3.2 Classification moléculaire



**FIGURE 2.7 – Classification moléculaire du cancer du sein [1].** Cette classification se base sur les sous-types moléculaires du cancer du sein identifiés par analyse de puces génomiques d'échantillons tumoraux primaires.

Alors que la classification histologique du cancer du sein a une valeur pronostique, l'absence de composants moléculaires à cette classification limite la capacité à prédire la réponse aux thérapies ciblées. L'identification de sous-types moléculaires commence à résoudre ce problème. Ils sont au nombre de six :

- HER-2<sup>+</sup> ;
- luminal A ;
- luminal B ;
- basal-like ;
- claudin-low ;
- normal-like.

Ces sous-types moléculaires ont été établis sur la base d'**analyses d'expression par puce génomiques** [107]. Ils présentent des différences significatives dans la prédiction de la survie, notamment pour le sous-type basal-like qui est le plus défavorable. Cette classification a permis en outre de stratifier les populations ER<sup>+</sup>. En effet les statuts ER, PR et HER-2 sont utilisés cliniquement dans le cas des carcinomes canaux infiltrants, mais ces marqueurs ne permettent pas la séparation des luminal A et B,

deux sous-types ER<sup>+</sup> qui ont des issues cliniques très différentes.

Le **sous-type HER-2<sup>+</sup>** est le plus simple à définir. Il se caractérise par une expression élevée d'HER-2. Cela est généralement dû à une amplification de la région chromosomique correspondante. Ainsi, ce type de cancer peut aussi surexprimer les gènes de l'unité d'amplification autour d'ERBB2 (**V-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2**), gène d'HER-2.

Le **sous-type luminal A** représente des cancers généralement de bas grade et d'évolution plutôt favorable. Ces cancers expriment les récepteurs hormonaux, ainsi que le profil de gènes en étant issus. Ils expriment également les gènes liés à la différenciation luminaire, dont le facteur GATA-3 (**Guanosine-adenosine-thymidine-adenosine binding protein 3**) est le plus caractéristique. Le **sous-type luminal B** regroupe quant à lui les autres cas lumineux moins différenciés et plus prolifératifs.

Les **cancers basaux** sont triple-négatifs, c'est à dire qu'ils n'expriment ni ER, ni PR, ni HER-2 [108]. Cependant tous les cancers du sein triple-négatifs ne sont pas de type basal. Ces cancers sont de haut grade et de mauvais pronostic. Ils sont très prolifératifs, expriment des gènes codant pour les régulateurs de cycle cellulaire, et présentent fréquemment des mutations de p53. L'expression de la cadhérine E, et de CD44 (**Cluster of differentiation 44**) sont également des marqueurs de ces cancers. Une subdivision des cancers basaux a été proposée : **basal-like A et B** [109]. Le fait le plus notable de cette distinction l'expression du marqueur mésenchymateux, la vimentine, par le sous-type basal B. Cela le rapprocherait des cancers du sein mésenchymateux, mais surtout pourrait être un indicateur de la transition épithélio-mésenchymateuse précédant la métastase.

Le **sous-type claudin-low** est principalement caractérisé par une faible expression des marqueurs de différenciation luminaire, et par un enrichissement des marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse et des marqueurs des cellules souches. Son nom vient de la faible expression des claudines, des protéines impliquées dans les jonctions intercellulaires serrées, et dont la perte est un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse.

Dans cette classification, les sous-types lumineux A et basaux sont les plus affirmés. Ils sont très différents l'un de l'autre, avec environ 20 % des gènes différentiellement exprimés, et peuvent laisser penser qu'il s'agit de deux pathologies différentes [110]. Cette classification peut également comporter un **sous-type dit « normal »** dont les caractéristiques sont mal définies et que nous ne détaillerons pas.

### 2.3.3 Place des cellules souches cancéreuses dans la classification

La définition de sous-types moléculaires aide à dessiner la cime de l'arbre de classification du cancer du sein. L'identification de **racines communes à ces différents sous-types** permettrait d'avoir une vue plus globale du développement de la maladie, et le concept de cellule souche cancéreuse se propose d'apporter des éléments de compréhension. Ce concept n'est pas récent, et encore moins spécifique du cancer du sein. Cependant, il a fait l'objet d'un regain d'attention grâce à l'isolement, et la caractérisation, de **cellules souches cancéreuses en tant que cellules initiatrices de tumeurs** dans différents types de cancers. La théorie des cellules souches cancéreuses stipule simplement qu'au sein d'une tumeur, seul un groupe restreint de cellules sont responsables de l'initiation et la progression tumorale [111]. Les cellules tumorales restantes ne présentent, elles, qu'un faible potentiel tumorigénique. L'origine des cellules souches cancéreuses est encore inconnue, mais deux hypothèses sont actuellement débattues : celle d'une origine à partir d'une **cellule souche normale**, et celle à partir d'une **cellule normale différenciée**.

La hiérarchie cellulaire de la glande mammaire n'est pas bien définie comme celle du système hématopoïétique qui présente des marqueurs spécifiques. Principalement pour cette raison, les marqueurs utilisés pour identifier les cellules souches cancéreuses mammaires sont les mêmes que ceux utilisés pour les cellules souches cancéreuses en général. Une méthode qui s'est révélée fructueuse repose sur un tri d'une population  $CD44^{\text{high}}CD24$  (**Cluster of differentiation 24**)<sup>low</sup>. **CD44** est un récepteur pour les composants de la matrice extracellulaire, acide hyaluronique et collagène notamment, et **CD24** est une molécule d'adhésion. En d'autres termes, cette population cellulaire est sélectionnée sur des caractéristiques de la **transition épithélio-mésenchymateuse**, et il a été montré que 200 cellules issues de cette sélection pouvait générer des tumeurs aux caractéristiques semblables à celle de la tumeur d'origine (dans le cadre de xénogreffes sur des souris immunodéprimées) [112].

### 2.3.4 Limite de la classification : cas du cancer du sein triple négatif

Le cancer du sein triple-négatif est caractérisé par l'absence, ou la **faible expression des récepteurs hormonaux** (ER et PR) et d'HER-2. Cela représente entre 10 et 20 % des cancers du sein [113]. Ce sous-type représente un enjeu important dans le champ de recherche sur le cancer du sein, car à ce jour, **la chimiothérapie reste la seule option thérapeutique après la chirurgie et la radiothérapie**. Ces tumeurs sont cependant associées aux **résistances** à la chimiothérapie, à un fort risque de rechute, et à un mauvais pronostic. Les tumeurs mutées sur p53 ou BRCA1 se retrouvent fréquemment dans ce sous-type.

Le cancer du sein triple-négatif a longtemps été associé au sous-type basal-like, car toutes les tumeurs basal-like sont triples-négatives, cependant l'inverse n'est pas vrai [108]. Histologiquement, les tumeurs triples négatives sont à 90 % des carcinomes canaux infiltrant, avec un haut grade notamment du au fort index mitotique [113].

Récemment, des analyses de puces génomiques effectuées sur les lignées de cancer du sein triple-négatives, se sont attachées à caractériser ce sous-types d'un point de vue moléculaire [114]. Les auteurs de cette étude ont établi une stratification des tumeurs triple-négatives, représentée sur la figure 2.8.

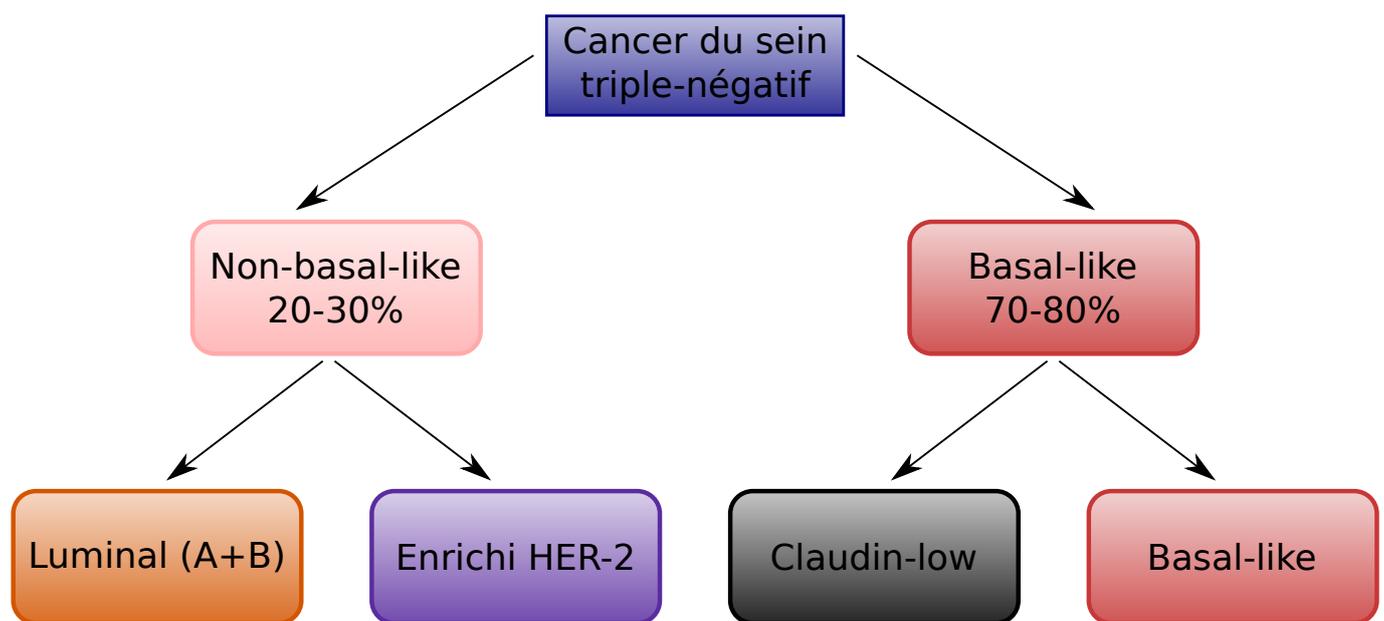


FIGURE 2.8 – Stratification des tumeurs triples-négatives [114].

Ainsi, le cancer sein triple-négatif présente donc une composante basal-like<sup>1</sup>, qui peut être divisés en claudin-low ou claudin-high. L'autre composante (non-basal-like) peut elle être divisée en luminal et enrichi en HER-2. Cette classification illustre la **difficulté du traitement** de ce type de cancer du sein, difficulté principalement due aux sous-types moléculaires qui le composent, et donc à une impossibilité de prédire l'efficacité du traitement sans examens complémentaires.

## 2.4 Stades et grades du cancer du sein

### 2.4.1 Les stades cliniques du cancer du sein

Les examens diagnostiques permettent de déterminer le stade du cancer du sein. Cela se base sur trois critères :

1. Le terme « composante » est utilisé ici pour désigner le fait que le cancer du sein triple-négatif présente plusieurs sous-sous-types de cancers différents.

- la **taille** et l'**infiltration** de la tumeur ;
- l'atteinte ou non des **ganglions lymphatiques** ;
- la présence ou non de **métastases**.

**La classification TNM (Tumor node metastasis)** La classification TNM concerne tous les types de cancer. Elle introduit différents niveaux de classification des critères précédemment cités, et s'applique uniquement aux carcinomes.

Le paramètre « **T** » renseigne sur la taille de la tumeur :

- TX, la tumeur ne peut être évaluée ;
- T0, pas de tumeur décelable ;
- Tis, carcinome *in situ* ;
- T1, tumeur de moins de 2 cm dans son plus grand diamètre ;
- T2, tumeur de plus de 2,0 cm et de moins de 5,0 cm dans son plus grand diamètre ;
- T3, tumeur de plus de 5,0 cm dans son plus grand diamètre ;
- T4, tumeur de toute taille avec extension à la paroi thoracique ou à la peau.

Le paramètre « **N** » renseigne sur l'atteinte des ganglions lymphatiques :

- NX, les adénopathies régionales ne peuvent être évaluées ;
- N0, pas d'adénopathie régionale métastatique ;
- N1, métastase ganglionnaire à un ou plusieurs ganglions ;
- N2, métastase(s) ganglionnaire(s) axillaire(s) ou métastase(s) ganglionnaire(s) mammaire(s) interne(s) ;
- N3, métastase(s) ganglionnaire(s) sous-claviculaire(s).

Le paramètre « **M** » renseigne sur la présence de métastases :

- MX, renseignements insuffisants pour classer la métastase à distance ;
- M0, absence de métastase à distance ;
- M1, présence de métastase(s) à distance.

**Les stades issus de la classification TNM** Cinq stades peuvent être définis à partir de la classification TNM : 0, I, II, III et IV. Le **stade 0** désigne les carcinomes du sein *in situ* (Tis :N0 :M0). Le **stade I** désigne les carcinomes infiltrants inférieurs ou égaux à 2 cm de diamètre (T1 :N0 :M0). Le **stade II** désigne les carcinomes infiltrants, sans métastases, dont le diamètre est soit supérieur à 2 cm et sans envahissement ganglionnaire (T2/T3 :N0 :M0), soit compris entre 0 et 5 cm et avec 1 à 3 ganglions envahis (T0/T1/T2 :N1 :M0). Le **stade III** désigne les carcinomes infiltrants sans métastase (T0/T1/T2/T3/T4 :N1/N2/N3 :M0). Enfin, le **stade IV** désigne les carcinomes métastatiques (T0/T1/T2/T3/T4 :N1/N2/N3 :M1).

## 2.4.2 Les grades anatomopathologiques du cancer du sein

Le grade permet de définir l'agressivité du cancer. L'anatomopathologiste le détermine en évaluant trois paramètres morphologiques microscopiques :

- l'**architecture tumorale**, qui caractérise le niveau de différenciation des cellules (plus une cellule est différenciée, moins elle est agressive) ;
- la **forme** et la **taille du noyau**, ;
- l'**activité mitotique** (*i.e.* le nombre de cellules en division), qui caractérise l'activité proliférative de la tumeur.

Une note, de 1 à 3, est attribuée à chaque paramètre. Pour l'architecture, la note augmente avec le nombre de cellules indifférenciées. Dans le cas du noyau, elle augmente avec la taille et l'aspect irrégulier de ce dernier. Enfin, dans le cas de l'activité mitotique, la note augmente avec le nombre de mitoses observées. Le grade correspond à la somme des trois notes. Le **grade I** est attribué aux tumeurs les moins agressives, c'est à dire un score entre 3 et 5, et le **grade III** aux tumeurs les plus agressives (score égal à 8 ou 9). Le **grade II** correspond quant à lui à un niveau intermédiaire (score égal à 6 ou 7).

## 2.5 Aspects pathologiques du cancer du sein

### 2.5.1 Épidémiologie du cancer du sein

Le cancer du sein est de très loin le **cancer le plus fréquent chez la femme** avec une estimation de 1,38 million de nouveaux cas dans le monde en 2008 [115]. Ceci représente 23 % des cancers, soit le second cancer le plus fréquent, après le cancer du poumon, dans le monde. Le cancer du sein est une maladie des pays développés. Son incidence varie de 19,3 pour 100 000 femmes, en Afrique de l'est, à 89,7 pour 100 000 femmes, en Europe de l'ouest. La mortalité associée au cancer du sein est bien moindre, entre 6 et 19 femmes sur 100 000, ce qui relègue cette maladie au cinquième rang de la mortalité causée par le cancer. Cependant le cancer du sein reste la cause la plus fréquente de mort induite par le cancer chez la femme.

En France, sur population d'environ 33 millions d'individus féminins, 53 000 nouveaux cas ont été estimés en 2011, avec des taux de survie à 5 et 10 ans estimés à 86 et 76 % respectivement [116]. Toujours en France, en 2008, le cancer du sein représentait 35,5 % des cancers, 19,4 % de la mortalité des cancers chez la femme [115]. La tendance est à une **augmentation à la fois de l'incidence et la survie** [116]. L'augmentation de la survie peut s'expliquer par les **avancées thérapeutiques** faites ces dernières années, mais c'est la prévention par **mammographie** et les techniques de détection qui explique les tendances. En effet, les mammographies précoces et systématiques effectuées ces dernières années font

que les cancers du sein sont détectés de plus en plus précocément, ce qui en augmentent l'incidence, et aussi la survie par une prise en charge plus efficace.

### 2.5.2 Facteurs de risque

L'incidence du cancer du sein varie substantiellement selon certains facteurs de risques bien établis. Parmi ces facteurs, le deux plus importants sont le **genre** et l'**âge**.

**Genre** L'incidence du cancer du sein est 100 fois **plus élevée pour les femmes que pour les hommes**. Ce ratio est relativement constant dans les différents pays du monde, bien que certaines études aient suggéré que les populations d'Afrique noir puissent être plus touchées. Cependant, ces études ne se basaient pas sur des populations africaines, mais sur des populations afro-américaines socialement mal classées. Aussi ces études sont à rapprocher des facteurs socio-économiques cités plus bas. Une nombre important de facteurs de risque ont été identifiés chez la femme. Le nombre réduit des cancers du sein masculins fait que les facteurs de risque pour l'homme sont beaucoup moins bien établis.

**Âge** L'**incidence du cancer du sein s'accroît énormément avec l'âge**, allant de moins de 10 cas pour 100 000 femmes entre l'âge 20 et 30 ans, à plus de 300 pour 100 000 après 60 ans. Les probabilités de développer un cancer du sein invasif sont de 0,48 %, 3,86 %, 3,51 %, 6,95 % et 12,28 % pour des femmes âgées de 39 ans (ou moins), de 40 à 59 ans, de 60 à 69 ans et 70 ans (ou plus) respectivement. Cependant, la corrélation entre l'âge et l'incidence n'est pas linéaire. La pente de corrélation est la plus raide pour les femmes les plus jeunes, et décroît fortement durant et peu de temps après la ménopause, pour ré-augmenter plusieurs années après. La médiane de l'âge au diagnostic du cancer du sein est de 64 ans aux États-unis, cependant dans d'autres parties du monde, où l'espérance de vie est plus courte, cette valeur diminue. La fréquence de mortalité liée à l'âge suit aussi ce profil.

**Facteurs socio-économiques et origine ethnique** Le cancer du sein est **plus fréquemment observé chez les femmes de haute classe sociale**, et de statut d'éducation élevé. Cette découverte est probablement liée au mode de vie, notamment l'alimentation, l'âge du première enfant, utilisation d'hormones exogènes, et la consommation d'alcool. Cependant, la mortalité est plus haute chez les femmes issues de groupes non privilégiés, suggérant que l'accès aux soins et à la thérapie reste un obstacle important pour un diagnostic et un traitement optimal. Les études s'intéressant au relations entre l'incidence et l'origine ethnique sont globalement circonscrites aux États-Unis, où les statistiques ethniques sont autorisées. Les **femmes caucasiennes sont les plus touchées**, suivies des femmes afro-américaines, les femmes les moins touchées étant les femmes natives du continent américain (Indiennes et Inuits).

**Facteurs génétiques** 11 des 30 % des femmes atteintes d'un cancer du sein ont un (ou plus) parent(s) du premier degré atteint d'un cancer du sein. De plus 40 % des femmes atteintes d'un cancer du sein ont un parent d'un quelconque type atteint. Enfin, Environ 4 à 9 % des cancers du sein sont considérés comme étant liés à l'hérédité. L'identification et le clonage de **BRCA1** et **BRCA2**, deux gènes associés aux cancers du sein familiaux (et aussi à d'autres types de cancers), ont montré l'importance de la prise en compte de l'histoire familiale dans l'évaluation initiale des facteurs de risques. BRCA1 et BRCA2 sont impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN. Les **cancers familiaux représentent environ 10 % des cancers du sein**, et ceux liés à BRCA1 ou BRCA2 représentent les deux tiers de ces cas. Les individus porteurs d'une mutation de l'un ou l'autre de ces gènes ont un risque d'avoir un cancer du sein de 40 à 85 %.

**Autres facteurs de risques** Il existe de nombreux autres facteurs de risques participant à l'apparition du cancer de sein ; le plus important restant à citer étant le rôle des oestrogènes et de la progestérone. En effet, ces **hormones endogènes** sont intimement à la biologie du cancer du sein (cf. plus haut), et des études suggèrent un lien entre elles et le développement du cancer du sein. D'autres facteurs de risques ont été identifiés. Certains plus ou moins spécifiques de ce type de cancer, comme la prise d'**hormones exogènes contraceptives**, d'autres plus généraux, environnementaux, comme l'activité physique, la consommation d'alcool ou l'obésité. La liste est impressionnante, et sachant que le cancer du sein est peut-être le type de cancer le plus étudié, cela reflète certainement notre incompréhension des mécanismes à l'origine de l'oncogenèse, de la même manière que le font la multiplication des sous-types moléculaires du cancer du sein.

## 2.6 Chimiothérapie utilisée dans le traitement du cancer du sein

La prise en charge du cancer du sein est complexe et dépend de nombreux facteurs. Généralement, la détection par mammographie impose une biopsie permettant de déterminer si la lésion est cancéreuse. La biopsie permettra également de déterminer les caractéristiques histologiques et moléculaires du tissu. En cas de tumeur, le traitement se composera de différentes approches entre résection chirurgicale, radiothérapie, thérapie ciblée ou chimiothérapie. Nous intéresserons ici aux aspects chimiothérapeutiques du traitement du cancer du sein. Les autres aspects ne seront pas détaillés.

### 2.6.1 Modes d'action

Le cancer du sein est modérément sensible aux agents cytotoxiques. Plusieurs catégories d'agents, avec différents mécanismes d'action ont une activité antitumorale substantielle chez les patiente at-

teintes d'un cancer du sein [103]. Les composés les plus actifs sont :

- les anthracyclines (doxorubicine, épirubicine) ;
- les agents alkylants (cyclophosphamide, sels de platine) ;
- les antimétabolites (méthotrexate, 5-fluorouracile, capecitabine, gemcitabine) ;
- les vinca-alcaloïdes (vinorelbine, vinblastine, vincristine) ;
- les dérivés de l'épothilone (ixabépilone) ;
- les taxanes (paclitaxel, docétaxel).

**Anthracyclines (généotoxiques)** Ce sont des composés qui, de par leur structure « plate » (noyaux benzéniques) s'intercalent entre les paires de bases, et perturbent les mécanismes régulant le métabolisme de l'ADN.

**Agents alkylants (généotoxiques)** Les agents alkylants et les sels de platine sont des composés électrophiles qui forment des liaisons covalentes qui avec des atomes riches en électrons. Dans les systèmes biologiques ces agents réagissent avec les atomes des protéines et de l'ADN. Les réactions les plus importantes pour la toxicité sont celles avec l'ADN. Elles induisent des liaisons fortes entre les brins, empêchent leur séparation et provoquent des cassures lors de la réplication.

**Antimétabolites (généotoxiques)** Les antimétabolites (puriques ou pyrimidiques), se substituent aux bases azotés lors de la production d'ADN en phase S, interfèrent avec la division et stoppent la prolifération. Cette caractéristique des antimétabolites les fait rentrer dans la catégories des composés dits cytostatiques.

**Poisons des microtubules (anti-mitotiques)** Les dérivés de l'épothilone, les vinca-alcaloïdes et les taxanes sont des composés qui modifient la dynamique des microtubules et empêchent la division cellulaire.

La durée de réponse à ces composés en agent simple est très courte, et la base de la chimiothérapie consiste à les combiner. L'idée est que la **combinaison d'agents** avec différents mécanismes d'action, et des toxicités non-chevauchantes, augmentera le bénéfice du traitement et retardera l'émergence de résistances sans effet sur la mortalité ou la qualité de vie. Depuis l'introduction des taxanes dans le traitement du cancer du sein, deux hypothèses s'opposent [103]. La première préconise l'**administration concurrente** d'au moins deux agents cytotoxiques pour empêcher ou minimiser l'apparition de résistances, et maximiser la réduction tumorale. La seconde propose l'**administration séquentielle** de plusieurs composés en agent simple, et à pleine dose, pour maximiser l'intensité et limiter la toxicité. En général l'administration séquentielle est mieux tolérée, mais son bénéfice n'est pas évident si les doses

optimales peuvent être injectées de manière concomitante.

## 2.6.2 Importance du paclitaxel

Plus d'une soixantaine de « régimes » de chimiothérapie sont utilisés dans le traitement du cancer du sein. Cette **diversité est due aux différentes combinaisons** entre les différents composés, ainsi qu'à leur mode et leur cinétique d'administration. Les **nombreux sous-types** de cancer du sein ajoute un niveau de complexité supplémentaire auquel il faut ajouter les caractéristiques intrinsèques du patient répertoriés lors que l'examen clinique.

Lister l'ensemble des traitements de chimiothérapie utilisés n'est pas une tâche aisée. Elle a été réalisée notamment par un site internet [117], qui a répertorié l'ensemble des traitements aux États-Unis, tous types de cancer confondus. Cette liste n'est pas exhaustive, mais regroupe les traitements les plus utilisés accompagnés des références des essais cliniques. Dans le cas du cancer du sein, les traitements sont classifiés en deux catégories : thérapie adjuvante (et néo-adjuvante) et traitement du cancer du sein métastatique. Ces deux catégories sont elles-mêmes sous-classifiées en :

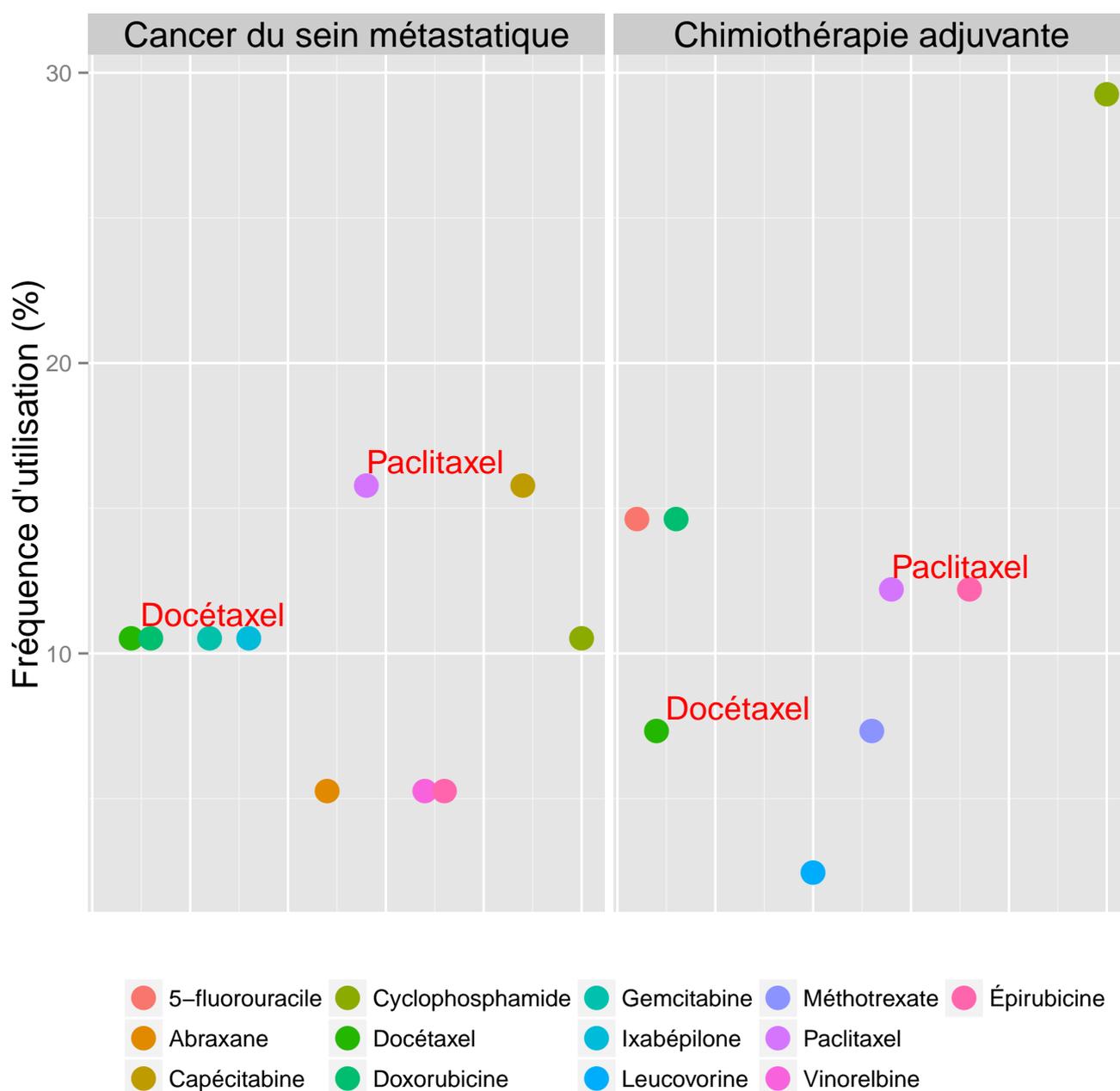
- thérapie hormonale ;
- chimiothérapie ;
- thérapie ciblée.

Afin d'évaluer l'importance du paclitaxel dans le traitement du cancer du sein, nous avons listé l'ensemble des composés de chimiothérapie utilisés dans chaque traitement, et déterminer sa fréquence d'utilisation en rapportant son nombre d'occurrences au nombre d'occurrences total (Figure 2.9).

Les thérapies hormonales et ciblées ont été exclues pour ne garder que la chimiothérapie classique, mais la distinction entre thérapie adjuvante et traitement du cancer du sein métastatique a été conservée. Nous pouvons constater que le **paclitaxel est fréquemment utilisé dans le traitement du cancer du sein métastatique**. Le paclitaxel est moins utilisé en chimiothérapie adjuvante, mais sa fréquence reste non négligeable. Nous constatons également l'importance du docétaxel, l'autre taxane utilisé en chimiothérapie. Nous avons effectué la même analyse dans le cas des thérapies hormonales et ciblées, et la fréquence d'utilisation du paclitaxel reste beaucoup plus basse comparé à d'autres composés.

## 2.7 Le paclitaxel dans le cancer du sein métastatique

La premier effet clinique significatif des taxanes a été démontré dans des études concernant des femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique. Le paclitaxel, en agent simple, présentait une ac-



**FIGURE 2.9 – Fréquence d'utilisation des composés de chimiothérapie dans le traitement du cancer du sein métastatique, et en thérapie adjuvante ou néo-adjuvante.**

tivité significative chez les patientes sensibles (fréquence de réponse de 35 à 55 %) et les patientes réfractaires (fréquence de réponse de plus de 20 %) à la doxorubicine [118, 119]. Dans ces deux études une dose précise d'administration n'avait pas été déterminée. Il est apparu par la suite qu'une administration intra-veineuse de 175 mg/m<sup>2</sup> sur 3 heures toutes les trois semaines paraissait une approche raisonnable [120].

Dans la plupart des essais randomisés, le paclitaxel fut administré toutes les trois semaines, cependant, une administration hebdomadaire pouvait affecter favorablement le ratio thérapeutique. Une thé-

rapie hebdomadaire à 80 mg/m<sup>2</sup> a donc été comparée à un protocole basé sur une administration de 175 mg/m<sup>2</sup> toutes les trois semaines [121]. La **thérapie hebdomadaire était associée à un meilleur taux de réponse**, ainsi qu'à une médiane de survie plus élevée. En contre partie, l'observation d'une **neuropathie associée au traitement** était aussi plus fréquente dans le cas de de la thérapie hebdomadaire, cependant l'évaluation du rapport bénéfice risque a amené les auteurs de cette étude à conclure que le traitement hebdomadaire était plus efficace pour les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique.

### 2.7.1 Le paclitaxel en agent simple

**Avant traitement par des anthracyclines** Le paclitaxel a été comparé à la doxorubicine dans un essai clinique concernant 331 femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique [122]. Dans cette étude, les patientes ont reçu 200 mg/m<sup>2</sup> de paclitaxel, ou 75 mg/m<sup>2</sup> de doxorubicine, 3 heures toutes les trois semaines en administration intra-veineuse. Ces traitements étaient donnés **en première ligne de défense** à des patientes n'ayant reçu aucun traitement par les anthracyclines. L'analyse des résultats montrèrent que la survie sans progression, ainsi que la médiane de survie étaient plus hautes dans le cas de la doxorubicine. L'administration de la doxorubicine était associée à une plus forte toxicité, mais cela était contrebalancé par un meilleur contrôle des symptômes. La conclusion des auteurs de cette étude était donc, qu'en première ligne de défense, **l'administration de la doxorubicine était plus efficace que celle du paclitaxel lorsqu'elle était effectuée une fois trois 3 heures toutes les trois semaines**. Une autre étude plus récente suggère que ce résultat pourrait être nuancé par le calendrier d'administration [123]. Dans cette étude, 739 femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique ont reçu 175 mg/m<sup>2</sup> de paclitaxel, ou 60 mg/m<sup>2</sup> de doxorubicine, ou les deux, toujours en première ligne de défense, mais cette fois en administration unique sur 24 heures. Les taux de réponses (complètes ou partielles) observés étaient de 36 %, 34 % et 47 % pour la doxorubicine, le paclitaxel ou la combinaison des deux, respectivement. Toujours dans le même ordre, les médianes de survie étaient elles de 5,8, 6 et 8 mois. Il ressort donc de cette étude que **la doxorubicine et le paclitaxel peuvent avoir le même profil d'efficacité lorsqu'ils sont administrés une fois sur 24 heures**, et que la combinaison des deux traitements a un effet supérieur.

Enfin, le paclitaxel a aussi été comparé à la combinaison cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracile et prédnisone [124]. Cette étude concernait 209 femmes, et a montré que le paclitaxel améliorait la survie comparativement à la combinaison des quatre composés précédemment cités.

**Après traitement par des anthracyclines** Il a été montré que le docétaxel, en agent simple, produisait un effet supérieur à la combinaison mitomycine-vinblastine, et aussi à la combinaison méthotrexate-5-

fluorouracile, chez des patientes qui avaient reçu un traitement préalable aux anthracyclines [125]. Le **paclitaxel quant à lui produisait un taux de réponse inférieur à la combinaison cisplatine-étoposide**, chez le même type de patientes [125]. Une étude clinique a comparé le docétaxel et le paclitaxel. Cette étude a été réalisée sur 449 femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique dont la progression se faisait en dépit d'un traitement préalable par des anthracyclines [126]. Les patientes ont reçu soit 100 mg/m<sup>2</sup> de docétaxel, ou 175 mg/m<sup>2</sup> de paclitaxel 3 heures toutes les trois semaines. Les taux de réponse entre les deux composés étaient semblables, mais le docétaxel produisait un meilleur temps jusqu'à la reprise de la progression.

### 2.7.2 Le paclitaxel en combinaison avec d'autres agents

**Combinaison avec des anthracyclines** Dans le cas du cancer du sein métastatique, la combinaison doxorubicine-docétaxel induit une meilleure réponse, en première ligne, que la combinaison de la doxorubicine avec d'autres composés comme le 5-fluorouracile et le cyclophosphamide [127]. Un meilleur effet de la combinaison doxorubicine-paclitaxel est elle moins évidente, car un tel effet n'a été observé que dans une seule étude [128]. Dans cette étude, 267 femmes ont reçu soit 50 mg/m<sup>2</sup> de doxorubicine, suivi de 220 mg/m<sup>2</sup> de paclitaxel 24 heures plus tard, ou bien un traitement à base de 5-fluorouracile (500 mg/m<sup>2</sup>), doxorubicine (50 mg/m<sup>2</sup>) et cyclophosphamide (500 mg/m<sup>2</sup>). Les deux traitements ont été administrés toutes les 3 semaines sur 8 cycles. Le **traitement contenant du paclitaxel produisait un taux de réponse significativement plus élevé** que le second traitement. La survie générale, ainsi que le temps jusqu'à la reprise de la progression, étaient aussi supérieurs.

**Combinaison avec des thérapies ciblées** Des études précliniques ont montré que des lignées cellulaires exprimant fortement HER-2 présentaient une résistance accrue au paclitaxel (près de 100 fois) [129], et que cette résistance était associée à l'expression de Mdr-1 (**M**ultidrug **r**esistance **p**rotein **1**). Cependant, des études cliniques ont montré une interaction favorable entre le trastuzumab, un anticorps humanisé dirigé contre HER-2, et le paclitaxel [130]. Le paclitaxel a aussi été évalué en combinaison avec le bevacizumab, un anticorps humanisé dirigé contre le VEGF (**V**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor) [131]. Dans cette étude, 722 femmes atteintes d'une rechute locale, ou d'un cancer du sein métastatique ont été traitées avec 90 mg/m<sup>2</sup> de paclitaxel, avec ou sans 10 mg/kg de bevacizumab. L'addition du bevacizumab a été associée à une meilleure réponse, bien que le taux de survie était semblable dans les deux groupes. Les effets secondaires, comme l'infection, étaient plus fréquents dans le groupe ayant reçu de la bevacizumab.

## 2.8 Le paclitaxel dans les stades précoces du cancer du sein

### 2.8.1 Le paclitaxel en tant que traitement adjuvant

Le bénéfice potentiel de combiner séquentiellement une thérapie à base d'anthracyclines avec du paclitaxel a été évalué [132, 133, 134]. Ces études ont montré une amélioration du taux de survie générale et sans récurrence. Une autre étude a comparé le paclitaxel et le docétaxel [135]. Dans cette étude, 4950 femmes atteintes d'un cancer du sein avec nodules lymphatiques ont reçu quatre cycles d'une combinaison doxorubicine-cyclophosphamide, suivis de paclitaxel (174 mgm<sup>2</sup> toutes les trois semaines, ou 80 mgm<sup>2</sup> hebdomadaire), ou de docétaxel (100 mgm<sup>2</sup> toutes les trois semaines, ou 30 mgm<sup>2</sup> hebdomadaire). Les auteurs ont conclu que **le traitement par du paclitaxel après la combinaison doxorubicine-cyclophosphamide améliorerait le taux de survie sans récurrence et général**. Il n'y avait pas de différences entre le paclitaxel et le docétaxel, ni entre le traitement toutes les trois semaines et hebdomadaire.

### 2.8.2 Le paclitaxel en tant que traitement néoadjuvant

Le bénéfice de l'ajout du paclitaxel avant la chirurgie n'a pas été évalué dans un essai clinique de phase III. Cependant cela a été fait pour le docétaxel. 163 femmes atteintes d'un cancer du sein en stade avancé, ont reçu quatre cycles d'une combinaison doxorubicine-cyclophosphamide-vincristine-prédnisolone [136]. Les patientes répondant au traitement ont alors reçu huit cycles de la même combinaison, ou quatre cycles de docétaxel. Les analyses ont révélé que le taux de rémission complète était deux fois plus élevé dans le groupe ayant reçu du docétaxel.

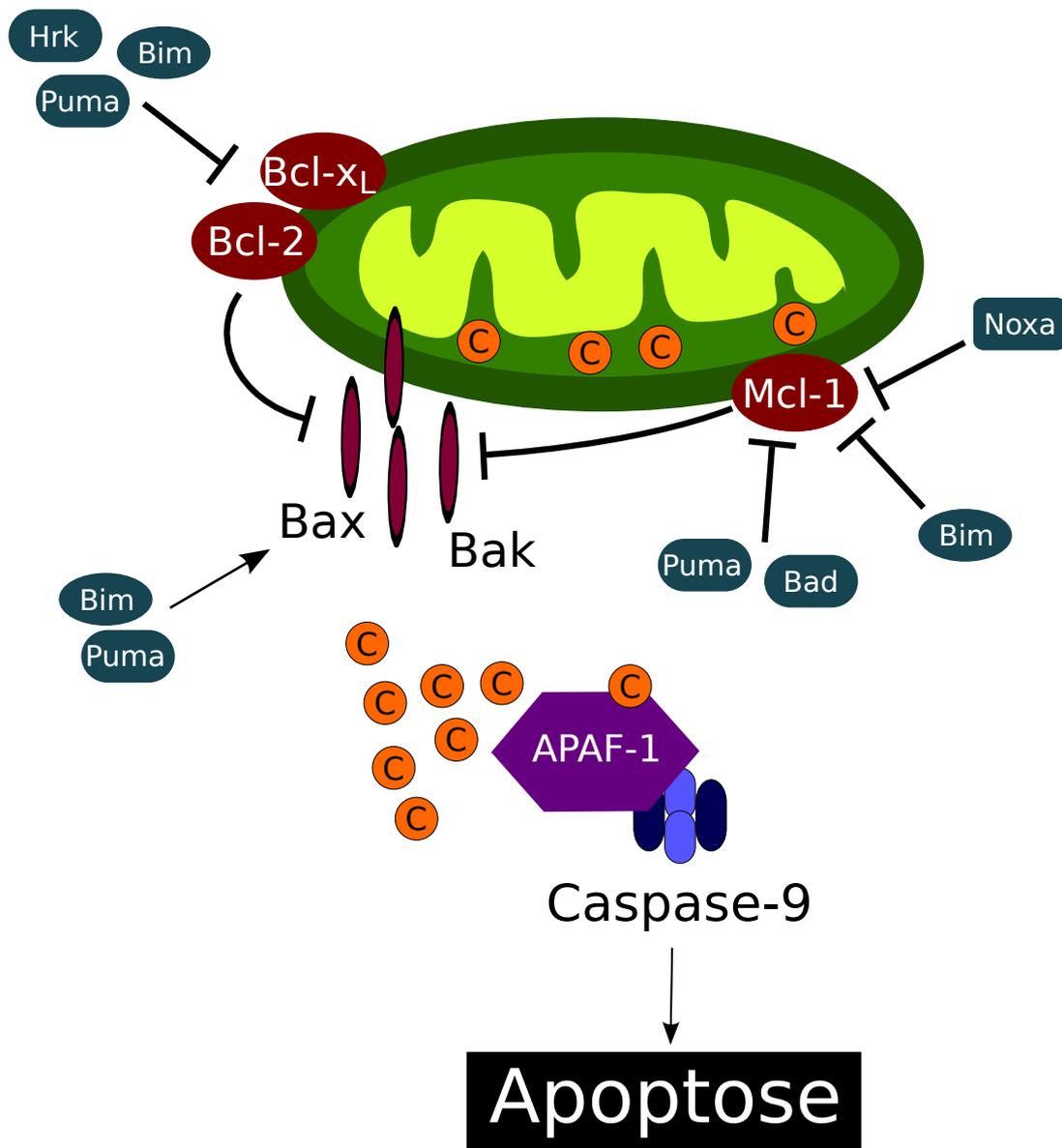
# Chapitre 3

## Les protéines de la famille de Bcl-2

L'apoptose est un processus actif de destruction cellulaire avec des caractéristiques morphologiques et biochimiques bien définies, et ses mécanismes sont fréquemment dérégulés dans les cancers. Jusqu'à présent deux voies majeures de l'apoptose ont pu être définies dans les cellules de mammifères : la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale. Les protéines de la famille de Bcl-2 sont les régulateurs les plus importants de la voie mitochondriale, et ce statut peut être étendu à l'apoptose elle-même dans la mesure où les signaux transmis par la voie des récepteurs de mort sont susceptibles d'être relayés à la voie mitochondriale via cette même famille de protéines. Il est de coutume de diviser la famille de Bcl-2 en pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Alors que les membres pro-apoptotiques agissent soit en tant que senseur des signaux de mort, soit comme exécuteurs du programme de mort, les membres anti-apoptotiques, eux, inhibent l'initiation du programme de mort. Les protéines de la famille de Bcl-2 sont conservées d'un point de vue évolutif, mais peuvent accomplir leurs tâches de manière différente. De plus, de multiples signaux cellulaires peuvent modifier l'activité et la localisation de ces protéines, formant ainsi un réseau de signalisation intracellulaire qui régit la délicate balance entre la mort et la survie cellulaire.

### 3.1 Régulation de l'apoptose par les protéines de la famille de Bcl-2

La survenue de l'apoptose est déterminée par la **balance entre les signaux de survie et les signaux de mort**. Les protéines de la famille de Bcl-2 constituent un centre décisionnel critique de l'apoptose, agissant en tant que **suppresseurs** (anti-apoptotiques à multidomaines, tels que Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1), **effecteurs** (pro-apoptotiques à multidomaines : Bax et Bak (**Bcl-2 associated k**)), **activateurs** (pro-apoptotiques à multidomaines ou BH3-only, tels que Bid (**BH3-interacting domain death agonist**), Bim (**Bcl2-interacting mediator of cell death**) et Puma) et **sensibilisateurs** (pro-apoptotiques BH3-only (**Bcl-2 homology 3-only**), tels que Bad (**Bcl-2 associated d**) et Noxa (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (**noxa** pour « dommage » en latin))) [4].



**FIGURE 3.1 – Régulation de l'apoptose par les protéines de la famille de Bcl-2.** Dans les cellules saines, APAF-1 est sous une forme auto-inhibée. À la suite d'un signal apoptotique, le niveau des protéines BH3-only augmente. Elles se lient aux protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pour lever leur effet inhibiteur, ou activent Bax directement. Cela mène à l'oligomérisation de Bax, ou Bak et déclenche la libération de cytochrome *c*. Le cytochrome *c* cytosolique se lie à APAF-1 pour induire la formation de l'apoptosome, menant à l'activation de la caspase-9 et à l'apoptose.

D'une manière générale, les anti-apoptotiques interagissent avec les effecteurs et les empêchent de **former des pores** dans la membrane externe de la mitochondrie, ce qu'on appelle la MOMP (Mitochondrial outer-membrane permeabilization). De leur côté, les sensibilisateurs coopèrent avec les inducteurs de mort, en cherchant principalement à lier les anti-apoptotiques pour les inhiber, donnant ainsi libre cours aux effecteurs; certains sensibilisateurs interagissent également avec les effecteurs de façon à potentialiser leurs fonctions. Enfin, les activateurs interagissent avec les effecteurs, et favorisent leur

passage vers une conformation active nécessaire à leur activité perméabilisatrice. La **perte d'intégrité de la membrane de la membrane mitochondriale externe**, causée principalement par les effecteurs, mène notamment à la **libération du cytochrome c** (nécessaire au fonctionnement de la chaîne respiratoire, et normalement présent dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie) dans le cytoplasme (Figure 3.1). Celui-ci agit en tant que cofacteur, avec APAF-1 (**Adaptater molecule apoptosis protease activating factor 1**), pour recruter la forme inactive de la caspase-9, et former ainsi l'**apoptosome** conduisant à son activation [137]. À son tour, la caspase-9 amorce de manière irréversible une **cascade amplificatrice d'activation de caspases effectrices**, comme la caspase-3, qui iront cliver leurs nombreux substrats. Ainsi, la régulation de l'apoptose dépend largement d'un équilibre entre les activités anti- et pro-apoptotiques de plusieurs homologues de Bcl-2. Un tel équilibre s'établit en tout premier lieu via une modulation de l'expression des divers homologues, selon le stimulus de survie et le type cellulaire concerné. Des modulations post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles (phosphorylation, séquestration...) viennent également contribuer à cet équilibre. Enfin, d'autres molécules jouant un rôle dans la décision ou l'exécution de l'apoptose ont été identifiées, comme les IAP (**Inhibitor of apoptosis**) cytosoliques, tel que XIAP (**X chromosome-linked IAP**), dont le rôle est d'inhiber les caspases, et les inhibiteurs des IAP (Smac (**Second mitochondria-derived activator of caspases**), Htra2/Omi (**High temperature requirement protein A2/Omi**)), libérés lors de la perte d'intégrité de la membrane mitochondriale externe.

## 3.2 Interactions des protéines de la famille de Bcl-2 et significativité fonctionnelle

### 3.2.1 Interactions parmi les protéines de la famille de Bcl-2

Les protéines de la famille de Bcl-2 peuvent interagir les unes avec les autres, et aussi avec d'autres protéines. La première protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2 découverte, Bax, a été clonée sur la base de son interaction avec Bcl-2 [138]. Beaucoup d'autres protéines de la famille ont été identifiées sur la base de cette interaction. L'interprétation des interactions protéine-protéine peut cependant être compliquée. Par exemple, nous savons maintenant que l'interaction *in vitro* entre Bax et Bcl-2 se produit seulement en présence de certains **détergents**, qui induisent un changement conformationnel de Bax [139]. Néanmoins, l'authenticité de l'interaction peut être vérifiée par des systèmes d'interaction *in vivo*, tels que le double hybride chez la levure, qui n'implique pas l'utilisation de détergents [140]. De plus, les interactions parmi les membres de la famille, telles que celle de Bax avec Bcl-2, se produisent *in vivo* au niveau des membranes lorsque les conformations sont adéquates [141].

Sur la base de ces études, un **profil général d'interactions** peut être défini (Figure 3.1). Le premier

Anti-apoptotiques	Pro-apoptotiques											
	Multi-domaines			Activateurs BH3			Sensibilisateurs BH3			BH3 mimétique		
	Bax	Bak	Bok	Bid	Bim	Puma	Bmf	Bik	Bad	Noxa	Hrk	ABT-737
Bcl-2	■			■	■	■	■	■	■		■	■
Bcl-x <sub>L</sub>	■	■		■	■	■	■	■	■		■	■
Mcl-1		■	■	■	■	■	■	■		■	■	
Bcl-w	■			■	■	■	■	■	■			■
Bcl-B	■											
Bfl-1	■		■	■	■	■						

**Tableau 3.1 – Interactions entre les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2.** Profils d'interaction illustrés de six anti-apoptotiques avec trois pro-apoptotiques multi-domaines, et huit BH3-only qui peuvent être divisés entre les activateurs et les sensibilisateurs. Les interactions avec l'ABT-737 ont aussi été représentées. Les interactions sont représentées par des carrés noirs. L'absence de carré signifie soit l'absence d'interaction, soit une interaction rapportée par un seul article, soit une interaction non testée.

type d'interaction, le plus commun, reste celui **entre un membre anti-apoptotique, tel que Bcl-2, et un membre pro-apoptotique comme Bax**. De cela peut résulter une action antagoniste de deux types de molécules, et peut ainsi réguler le programme de mort. De manière intéressante, toutes les molécules anti-apoptotiques n'interagissent pas avec toutes les molécules pro-apoptotiques. Il semble en effet que certains membres d'un groupe se lient préférentiellement à certains membres de l'autre groupe. Concernant le type d'interaction entre les membres multi-domaines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques, il semble que Bax est capable d'interagir avec tous excepté Mcl-1 [142]. Néanmoins cette interaction a déjà été observée précédemment en double hybride [140]. Bak quant à lui se lie préférentiellement à Mcl-1 et Bcl-x<sub>L</sub> [142]. Finalement, il a été montré que Bok (**Bcl-2-related ovarian killer**) se lie à Mcl-1 et A1 (**Bcl-2-related protein A1**), mais pas à Bcl-2 ni à Bcl-x<sub>L</sub>. Bien évidemment, toutes ces protéines ne peuvent inhiber que les protéines avec lesquelles elles sont en mesure d'interagir.

Les protéines BH3-only affichent également différentes capacités de liaison avec les membres anti-apoptotiques. En général, Bim et Puma se lient à tous les membres anti-apoptotiques, alors que les autres BH3-only montrent une certaine sélectivité. Noxa ne se lie qu'à Mcl-1, alors que Bad et Bmf (**Bcl-2-modifying factor**) se lient principalement à Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-w (**B cell lymphoma w**). Bid, Bik (**Bcl-**

2-interacting killer) et Hrk (**H**arakiri) se lie préférentiellement à Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-w par rapport à Bcl-x<sub>L</sub> ou Mcl-1. Bad se lie uniquement à Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-w. Bim, Puma et Bid sont de puissants inducteurs mort, car ils sont capables de neutraliser tous les membres anti-apoptotiques, alors qu'une combinaison de Noxa et Bad est nécessaire à un effet apoptotique maximale. Ces découvertes nous ont montré que l'efficacité de l'apoptose nécessite la neutralisation de multiples protéines anti-apoptotiques.

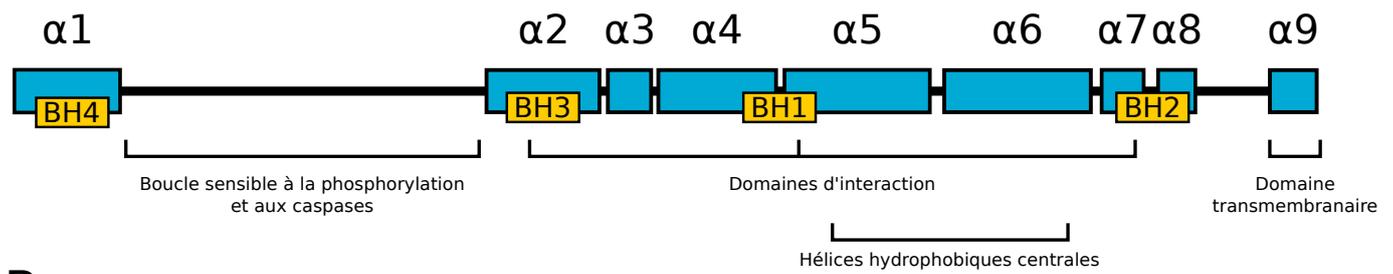
Le second type d'interaction se produit **entre deux membres au sein d'un même groupe fonctionnel**. Dans le groupe des protéines pro-apoptotiques, une protéine BH3-only peut interagir avec une protéine pro-apoptotique multi-domaine, par exemple Bid avec Bax [143] ou Bak [144]. Cela peut être important pour l'activation de Bax ou Bak. Des interactions entre membres anti-apoptotiques ont aussi été observées, notamment Bcl-B (**B**cl-2 protein **B**) avec Bcl-2 ou Bcl-x<sub>L</sub> [145].

Le troisième type d'interaction est la **dimérisation ou l'oligomérisation d'une même protéine**. Cela a été rapporté pour les membres anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> [140], mais surtout pour les membres pro-apoptotiques Bax [146] et Bak [144]. L'oligomérisation de Bax et Bak est indispensable à la libération de cytochrome *c*.

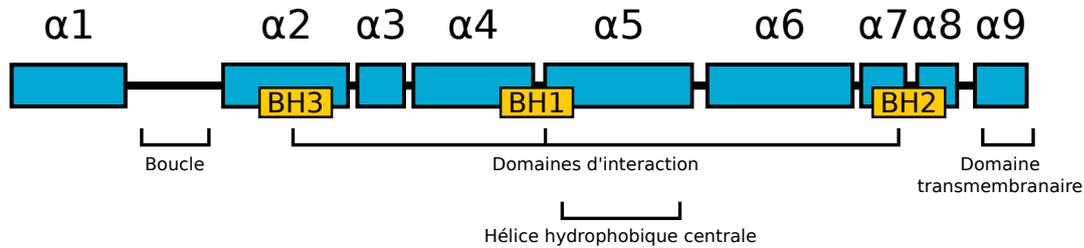
### 3.2.2 Importance des domaines BH dans les interactions protéiques

Les domaines BH (**B**cl-2 **h**omology) sont importants pour les interactions entre les membres de la famille de Bcl-2. À ce jour, nous ne disposons en revanche que de peu d'informations sur les structures responsables des interactions homotypiques. Les études structurales suggèrent que la **poche hydrophobe** formé par les domaines BH1 (**B**cl-2 **h**omology **1**), BH2 (**B**cl-2 **h**omology **2**) et BH3 (**B**cl-2 **h**omology **3**) des anti-apoptotiques sert d'accepteur pour le domaine BH3 des pro-apoptotiques (Figure 3.2) [147]. Les domaines impliqués dans les interactions entre membres pro-apoptotiques tels que Bid et Bax sont le **domaine BH3**, et la poche hydrophobique formée par les domaines BH1, BH2 et BH3 des multi-domaines [143]. Des mutations sur un des domaines peuvent habituellement annuler de telles interactions. Des résidus importants ont été identifiés dans chaque domaine BH, notamment la glycine 145 du domaine BH1 de Bcl-2, le tryptophane 188 du domaine BH2 de Bcl-2, et la glycine 94 du domaine BH3 de Bid [148, 143]. D'un autre côté, des régions extérieures aux domaines BH peuvent être également importantes pour les interactions [149].

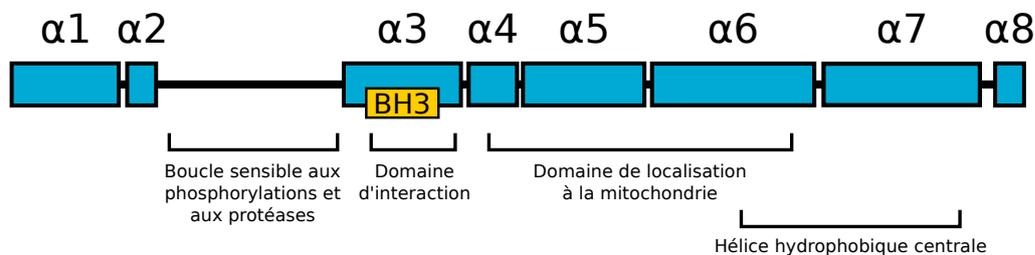
La liaison d'un membre anti-apoptotique à un membre pro-apoptotique peut nécessiter l'**exposition du domaine BH3** du membre pro-apoptotique. Cela peut ne pas être un problème pour la liaison d'un BH3-only tel que Bid, qui expose son domaine BH3 à la suite d'un clivage protéolytique [150], ou Bim, qui ne semble pas présenter de confinement structural [151]. Cependant, cela peut être un problème

Bcl-x<sub>L</sub>

## Bax



## Bid



**FIGURE 3.2 – Caractéristiques structurales des membres représentatifs de la famille de Bcl-2 [137].** Bcl-x<sub>L</sub>, Bax et Bid représentent les trois sous-groupes des protéines de la famille de Bcl-2 : les anti-apoptotiques multidomains, les pro-apoptotiques multidomains, et les BH3-only, respectivement. Bid est le seul BH3-only qui a une structure similaire à celle des multi-domains. D'autres BH3-only, tels que Bim, Bad et Bmf, sont intrinsèquement non structurés. Les structures de Bcl-2, Bax et Bid sont composées de multiples hélices alpha avec une ou deux hélices hydrophobiques centrales entourées par six ou huit hélices amphipathiques. Une grande et flexible boucle non structurée est présente entre les hélices α1 et α2. Cette boucle est connue pour être un domaine régulateur, sensible aux effets des protéase et des kinases. Les domaines BH sont distribués sur une ou deux hélices alpha. Ils sont impliqués dans les interactions protéine-protéine. D'autres hélices alpha sont impliquées dans la liaison aux membranes (le domaine transmembranaire de Bcl-x<sub>L</sub> et Bax, et les hélices alpha 4 à 6 de Bid) ou dans la formation de pores (les hélices alpha centrales hydrophobiques).

pour la liaison à Bax et Bak. En effet leur conformère non activé ne semblent pas se lier aux membres anti-apoptotiques [152]. Le domaine BH3 nécessite d'être exposé sous une **conformation active** pour la liaison [153].

### 3.2.3 Interactions entre les protéines de la famille de Bcl-2 et d'autres molécules

#### 3.2.3.1 Régulation des protéines de la famille de Bcl-2 par des protéines étrangères à la famille

Les protéines de la famille de Bcl-2 peuvent aussi interagir avec de nombreuses autres protéines. Certaines de ces interactions sont liées à leur fonction dans la mort cellulaire, d'autres mènent à des activités physiologiques différentes. Des protéines peuvent par exemple **séquestrer** des membres anti-apoptotiques pour empêcher leur activation. C'est le cas de 14-3-3, qui se lie à Bad phosphorylé et empêche sa translocation à la mitochondrie [154]. De la même manière, Bax peut être séquestré par 14-3-3 dans le cytoplasme, et libérer suite à la phosphorylation de 14-3-3 par JNK (**J**anuns **k**inase) [155]. Bak peut être séquestré à la mitochondrie par Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 [156], ou par VDAC2 (**V**oltage-**d**ependant **a**nion-selective **c**hannel **p**rotein **2**) [152]. Le déplacement des ces molécules par des BH3-only permet l'activation de Bak.

Des interactions avec d'autres protéines peuvent mener à l'**activation directe** des membres pro-apoptotiques. Un exemple est représenté par l'interaction de Bax et Bak avec Bif-1 (**B**ax-interacting **f**actor **1**), qui semble promouvoir leur oligomérisation [157]. **p53** est aussi un activateur très étudié. En plus d'induire la transcription de Puma, Noxa, Bid, Bad et Bax (voir plus bas), p53 cytoplasmique peut aussi participer directement à l'apoptose par liaison à Bax [158] et Bak [159], ce qui dissocie les interactions avec Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 respectivement.

#### 3.2.3.2 Participation des protéines de la famille de Bcl-2 à de multiples fonctions via des liaisons à d'autres protéines

Les protéines de la famille de Bcl-2 peuvent lier d'autres protéines pour réguler leur activité, et ainsi réguler indirectement la mort cellulaire. Par exemple, Bcl-x<sub>L</sub> peut se lier à BAR (**B**ifunctional **a**poptosis **r**egulator) et réguler l'activité de la caspase-8 (**C**ysteine **p**rotease **c**leaving **a**fter **a**sp **8**) [160]. Il a aussi été montré que les protéines de la famille de Bcl-2 affectaient la **morphologie mitochondriale** associée à l'apoptose, notamment via les interactions de Bak avec Mfn1 (**M**itofusin **1**) et Mfn2 (**M**itofusin **2**) [161].

L'interaction de Bcl-2 avec la calcineurine peut être responsable d'une inhibition du **cycle cellulaire** [162]. De plus, certaines protéines de la famille de Bcl-2 résident dans le noyau, et leur quantité augmente à la suite de l'exposition à des radiations ionisantes. Bcl-2 nucléaire peut interagir avec Ku70 et Ku86, via ses domaines BH1 et BH4 (**B**cl-2 **h**omology **4**), pour inhiber la recombinaison non homologue, menant ainsi à une accumulation de **dommages de l'ADN** et à l'instabilité génétique [163].

## 3.3 Régulation des protéines de la famille de Bcl-2

### 3.3.1 Régulation de l'expression transcriptionnelle

À cause de leurs puissants effets sur la balance survie/mort, les cellules imposent une régulation stricte de l'expression et de l'activité des protéines de la famille de Bcl-2. Alors que certains membres sont exprimés **constitutivement** dans les cellules, d'autres sont exprimés uniquement à la suite d'un **stimulus de mort**. Cela est particulièrement vrai pour certains membres pro-apoptotiques. Par exemple, les dommages de l'ADN peuvent induire l'expression de Puma, Noxa, Bid et Bad d'une manière dépendante de p53 [137]. De manière similaire, un carence en nutriments peut aussi induire l'expression de Bim ou Hrk [164].

L'expression de membres anti-apoptotiques peut aussi être induite par des **signaux de survie ou inflammatoire**. Par exemple, l'expression de Mcl-1 peut être augmentée par le GM-CSF (**G**ranulocyte **M**acrophage **CSF**) [165].

### 3.3.2 Régulation de l'épissage alternatif

Un autre moyen de régulation des protéines de la famille de Bcl-2 est l'épissage alternatif. En effet certaines de ces protéines peuvent être exprimées sous différentes formes. Ces différentes formes peuvent avoir des fonctions opposées, c'est le cas de Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-x<sub>S</sub> (**B** cell lymphoma extra **s**mall), et de Mcl-1L (**Mcl-1** long) et Mcl-1S (**Mcl-1** short) [166]. Pour d'autres, l'épissage alternatif n'altère pas la nature de leur fonction mais leur puissance. La forme longue de Bcl-2, Bcl-2 $\alpha$ , est plus puissante de la forme courte, Bcl-2 $\beta$  [167]. À l'inverse, la forme courte de Bim, Bim<sub>S</sub> (**Bim** short), est bien plus puissante que sa forme longue, Bim<sub>L</sub> (**Bim** long), ou sa forme extra-longue, Bim<sub>EL</sub> (**Bim** extra-long) [168].

### 3.3.3 Régulation par des modifications post-traductionnelles

Les modification post-traductionnelles sont probablement le mécanisme le plus important pour la régulation de l'activité des protéines de la famille de Bcl-2. Cela est particulièrement important pour les membres pro-apoptotiques qui sont normalement exprimés dans les cellules saines. Ces modifications se produisent souvent en réponse à des signaux de survie ou de mort, et sont principalement représentées par des clivages protéolytiques ou des phosphorylations. En outre, les changements de conformation, ou la dégradation, peuvent aussi être induits par des événements post-traductionnels.

### 3.3.3.1 Changements de localisations subcellulaires résultant de modifications post-traductionnelles

Une des principales issues des modifications post-traductionnelles, est la translocation de l'agoniste de mort modifié à la mitochondrie, comme c'est le cas pour Bax, Bid, Bim et Bad. Dans ces situations, les protéines de la famille de Bcl-2 servent de senseur pour des signaux externes de mort, et transmettent ces signaux à la mitochondrie.

Le premier type de modifications post-traductionnelles, est le changement de conformation, qui, pour Bax, est la première étape en réponse aux signaux de mort [139]. Ce changement peut être due à une élévation du pH (**P**otentiel **h**ydrogène) cytoplasmique [137]. Le changement de conformation permet l'exposition de l'extrémité C-terminale, donnant ainsi à la protéine la capacité de s'ancrer à la mitochondrie. La translocation de Bax peut aussi être régulée par plusieurs partenaires, tels que 14-3-3 $\zeta$  et Ku70 [137]. L'insertion de Bax à la mitochondrie semble aussi facilitée par la présence d'une autre molécule pro-apoptotique, Bid [169].

La translocation de Bid est dépendante de son clivage par la caspase-8 [169], qui est le second type de modification post-traductionnelle. Bid peut être activé par de multiples protéases suivant le scénario apoptotique. Le clivage se produit dans la région couvrant les résidus 43 à 77, produisant ainsi le fragment clivé de Bid, tBid (**t**runcated **BH3**-**i**nteracting domain **d**eath agonist). Ce fragment peut ensuite se localiser efficacement à la mitochondrie, et cette nouvelle capacité est due à l'exposition d'une surface hydrophobique obstruée avant le clivage.

Le troisième type de modification post-traductionnelle est la phosphorylation/déphosphorylation. Par exemple, Bcl-2 phosphorylé est largement présent au réticulum endoplasmique [170]. Cependant concernant ce type d'évènement régulateur, Bad est le membre de la famille le mieux étudié. En effet Bad est phosphorylé en présence de facteurs de croissance [154]. La protéine possède plusieurs sites de phosphorylation, mais ce sont les phosphorylations sur la sérine 112 et la sérine 136 qui régulent sa localisation. Lorsqu'il est phosphorylé, Bad se lie à 14-3-3 et est retenu dans le cytoplasme. La génération d'un signal de mort induit la déphosphorylation de Bad qui se dissocie de 14-3-3 et transloque à la mitochondrie. [154].

D'autres mécanismes peuvent induire la relocalisation des protéines de la famille de Bcl-2. Par exemple, Bim peut transloquer des microtubules vers la mitochondrie suite à un traitement par le paclitaxel [171].

### 3.3.3.2 Changements de fonction résultant de modifications post-traductionnelles

Bcl-2 peut être phosphorylé à la suite de l'induction de signaux de mort. Le paclitaxel est connu pour sa capacité à inactiver Bcl-2 par induction de sa phosphorylation [172]. La phosphorylation se produit sur des résidus sérine dans une région en la première et la seconde hélice alpha [173]. La phosphorylation aboutit à une diminution de l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> [174] à cause de leur capacité à interagir avec Bax [175]. Bcl-x<sub>L</sub> peut lui être phosphorylé sur les sérines 49 et 62, par Cdk1 et Plk3 (**P**olo **k**inase **3**) respectivement [176, 95]. Les phosphorylations touchant Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> seront traitées plus bas.

Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> peuvent tous deux être sujets à un clivage par les caspases [177, 178]. La caspase-3 est la principale caspase qui clive ces protéines, et le fait sur la même région entre les deux premières hélices alpha. Ce clivage ne fait pas qu'inactiver les protéines, il leur confère aussi une activité apoptotique. Ainsi les fragments issus du clivage (tBcl-2 (**t**runcated **Bcl-2**) et tBcl-x<sub>L</sub> (**t**runcated **Bcl-x<sub>L</sub>**)) sont capables d'induire l'apoptose. Il semblerait que tBcl-2 et tBcl-x<sub>L</sub> ne contribuent pas aux stades précoces de l'apoptose, car il n'apparaissent qu'après activation des caspases. Cependant, ces molécules peuvent accélérer le processus de mort.

De manière intéressante, les phosphorylations et clivages, que subissent Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>, ciblent toutes leur boucle T non structurée. Cette boucle relie les hélices  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ , et donc les domaines BH3 et BH4. La séquence en acides aminés de cette région est hautement variable parmi les membres de la famille de Bcl-2 [147]. De plus cette boucle ne concerne pas que les membres anti-apoptotiques, car elle est retrouvée chez Bax et Bid notamment. Ces informations suggèrent que cette région est importante dans la régulation des protéines de la famille de Bcl-2.

## 3.4 Mécanismes moléculaires du contrôle de l'activation de Bax et Bak à la mitochondrie

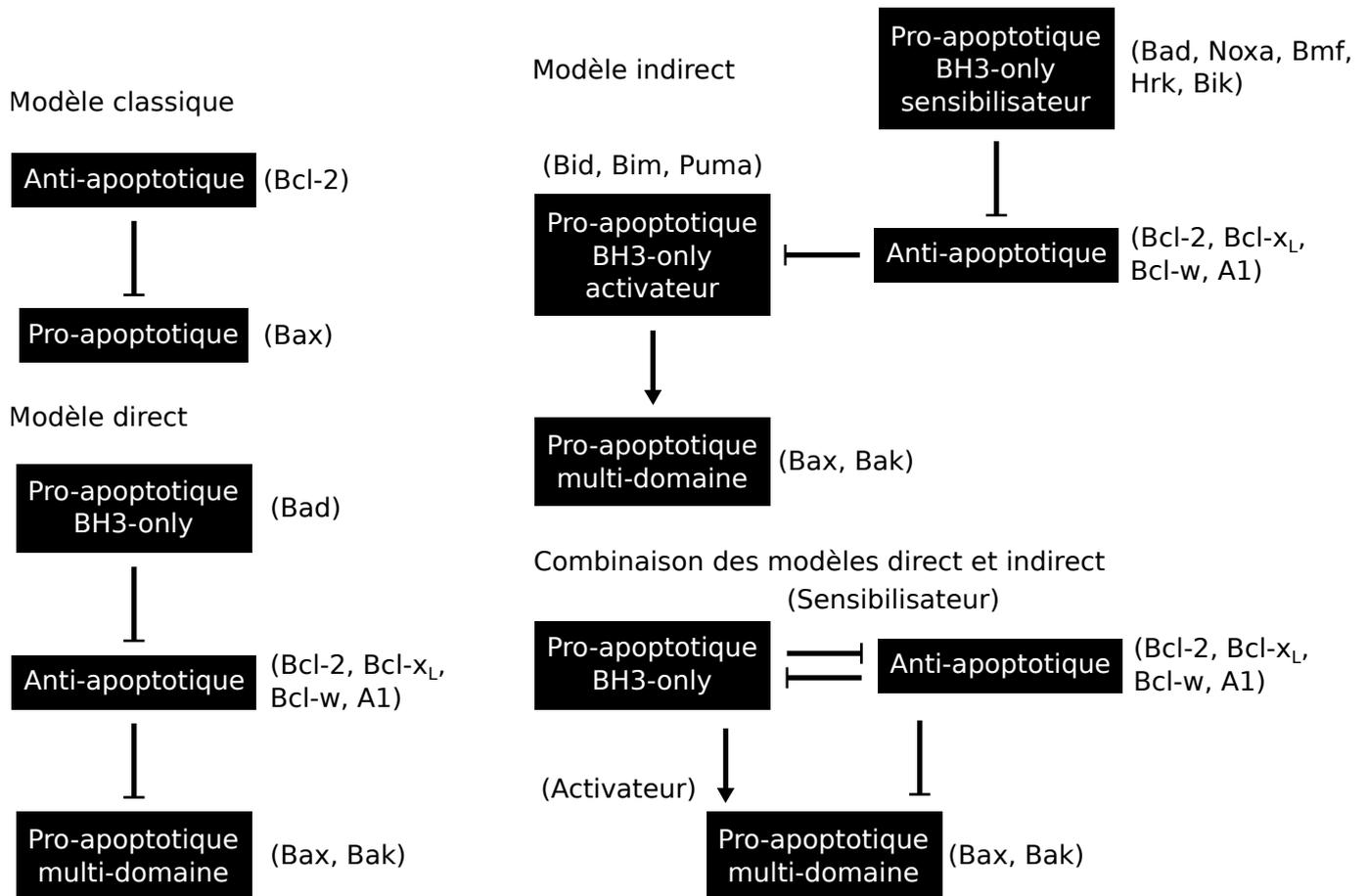
Bax et Bak sont responsables de l'induction de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. La délétion combinée de ces deux protéines rend les cellules complètement résistantes à tous les principaux signaux de mort passant par la mitochondrie : dommages de l'ADN, privation en facteurs de croissance, stress du réticulum endoplasmique, et aussi voie extrinsèque de l'apoptose relayée par Bid [179, 180, 181]. Il faut préciser que, cependant, Bax et Bak ne sont pas complètement redondants dans leur fonction. Dans certains cas Bax est plus sensible au stimulus apoptotique que Bak [182]. Dans d'autres cas, Bak, mais pas Bax, est nécessaire à l'apoptose dans des conditions telles que l'inhibition de

la synthèse protéique [183]. Bax est habituellement localisé dans le cytoplasme dans cellules saines, et transloque à la mitochondrie en réponse à un signal de mort. Bak, lui, réside constitutivement à la mitochondrie. Cette distinction peut contribuer à la stimulation différentielle de Bax et Bak dans certains cas [180, 181]. Les différentes protéines BH3-only agissent comme des sentinelles pour les différents signaux apoptotiques. Par exemple, Puma et Noxa sont principalement responsables de l'apoptose induite par les dommages de l'ADN, Bid est responsable des signaux induits par les protéases, et Bad et Bim sont engagés dans l'apoptose induite par la privation en facteurs de croissance. La manière dont Bax et Bak sont activés, et surtout comment les membres anti-apoptotiques inhibent cette activation, n'est pas totalement clair. Un autre fait important est que puisque les deux protéines présentent un profil d'interactions différent, l'induction d'une apoptose dépendante de l'une ou l'autre pourrait être régulée par des protéines distinctes. Par exemple, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, Noxa et Bik pourraient être particulièrement important pour l'apoptose induite par Bak.

Les protéines BH3-only agissent en amont de Bax et Bak car elles ne peuvent induire l'apoptose dans des cellules délétées pour Bax et Bak [181, 180]. La manière dont Bax et Bak sont activés, et surtout comment les membres anti-apoptotiques empêchent cette activation ne sont pas totalement clairs. Actuellement deux modèles, « direct » et « indirect » ont été proposés pour expliquer l'activation de Bax et Bak par les BH3-only (Figure 3.3).

Dans le modèle direct, les BH3-only peuvent activer directement les multi-domaines comme Bax ou Bak, qui seront nommé **effecteurs**, pour initier la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. Il sont ainsi regroupés sous le terme d'**activateurs**, et comprennent Bid, Bim et Puma. D'autres BH3-only, tels que Bad, Noxa et Bmf, peuvent se lier aux membres anti-apoptotiques pour libérer les activateurs. Ce groupe est celui des **sensibilisateurs**. La capacité du sensibilisateur à dissocier l'activateur de sa liaison avec l'anti-apoptotique est dépendante de son affinité avec ce dernier. Ces types de relations, couplés avec la capacité des anti-apoptotiques à inhiber la mort, montrent l'importance de comprendre le réseau d'interactions au niveau cellulaire. Une distinction peut être faite entre un anti-apoptotique lié à un activateur, dit « **amorcé** », de celui sans partenaire, dit « **vide** ». Ces deux états peuvent avoir une signification clinique en ce qu'uniquement les anti-apoptotiques amorcés peuvent induire la mort par libération de l'activateur [184].

Le modèle direct n'explique pas tous les phénomènes. Ainsi, le modèle indirect avance qu'une fois que les BH3-only ont transloqué à la mitochondrie, ils n'affectent pas Bax ou Bak directement, mais plutôt se lient à un anti-apoptotique pour inhiber sa fonction, ou le convertir en une molécule s'engageant dans l'oligomérisation de Bax ou Bak. Dans ce cas, Bax et Bak sont tenus en respect par les



**FIGURE 3.3 – Modèles pour l'activation des pro-apoptotiques multi-domaines de la famille de Bcl-2.** Le modèle classique est basé sur Bcl-2 et Bax, il indique que Bcl-2 inhibe l'oligomérisation de Bax, et ainsi les niveaux d'expression relatifs de ces protéines dictent le devenir cellulaire. La découverte de membres supplémentaires au sein de la famille a fait émerger les modèles direct et indirect. Ces deux modèles diffèrent principalement sur la manière dont Bax et Bak sont activés, et aussi sur la séquestration des pro-apoptotiques par les anti-apoptotiques. La combinaison des deux modèles suggère que les anti-apoptotiques et les pro-apoptotiques s'inhibent mutuellement pour activer les pro-apoptotiques effecteurs.

anti-apoptotiques eux-mêmes étant inactivés par les BH3-only. Les BH3-only agissent en tant que sensibilisateurs uniquement dans ce modèle.

La différence majeure entre les deux modèles est de savoir si Bax ou Bak sont directement activés par Bid, Bim et Puma (modèle direct), ou indirectement activés par la dissociation d'un anti-apoptotique (modèle indirect). L'activation indirecte implique que Bax et Bak soient capables d'activation **spontanée**, ou peuvent être préactivés par d'autres molécules pour les convertir vers une **conformation amorcée**. Ce modèle suggère que Bax ou Bak peuvent avoir deux conformations :

1. amorcée, avec leur domaine BH3 exposé ;
2. non amorcée, avec leur domaine BH3 caché.

Bien que le signal d'amorçage ne soit pas connu, il est possible que l'environnement membranaire four-

nisse les conditions nécessaires au changement de conformation.

## 3.5 Rôles physiologiques des protéines de la famille de Bcl-2

Les rôles physiologiques des protéines de la famille de Bcl-2 sont principalement :

- la régulation de l'apoptose ;
- la régulation du cycle cellulaire ;
- la régulation de la réponse au stress du réticulum endoplasmique ;
- la régulation de l'autophagie ;
- l'organisation du réseau mitochondriale.

Cette liste n'est pas exhaustive, nous aurions pu par exemple rajouter la régulation de la réparation des dommages de l'ADN. Ne seront traités ici que les rôles dans la régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire.

### 3.5.1 Rôle dans la régulation de l'apoptose

L'inactivation des gènes de Bcl-x<sub>L</sub> ou Mcl-1 mène à la **mort embryonnaire**. Alors que Bcl-x<sub>L</sub> semble important pour le développement des systèmes neuronaux et hématopoïétiques [185], Mcl-1 est lui nécessaire au développement du trophoctoderme, qui est important pour l'implantation de l'embryon dans l'utérus [186] et pour le développement des cellules souches hématopoïétiques [187]. Bien que la délétion de Bcl-2 chez la souris aboutit à une mort partielle, les souris survivantes présentent néanmoins des défauts de développement [188]. Ces défauts peuvent être annulés par la délétion concomitante de Bim [189].

Alors que des souris déficientes pour Bak ne présentent pas de phénotype délétère observable, une grande partie des souris double K.O. pour Bax et Bak meurt durant l'embryogenèse, ou après la naissance [179]. Ces souris présentent des défauts de développement qui corrélaient avec des problèmes de mort cellulaire. Les cellules double K.O. sont résistantes à la plupart des formes d'apoptose induites par le stress [180], ou à la mort induite par la surexpression de BH3-only [181]. Ces résultats montrent que les activités de Bax et Bak sont **chevauchantes** d'un point de vue fonctionnel, et sont **essentiels** à l'apoptose mitochondriale.

Un certain nombre de défauts non létaux ont été aussi observés dans des modèles génétiques où d'autres gènes de la famille de Bcl-2 ont été délétés. Par exemple, des souris mâles déficientes en Bcl-w et Bax, bien que vivantes, sont **stériles** à cause d'une anomalie dans la spermatogenèse [190, 191].

Les souris déficientes pour les BH3-only ont des **phénotypes variés**. Les souris déficientes pour Puma et Noxa ne sont pas affectées du point de vue du développement, mais sont résistantes à l'apoptose induite par les dommages de l'ADN dépendante de p53 [192, 193]. Puma semble essentiel à l'apoptose induite par les radiations  $\gamma$ , alors que Noxa semble essentiel pour l'apoptose induite par des radiations UV (**U**ltra-**violet**) [194]. Des cellules double déficientes pour Puma et Noxa sont résistantes à l'irradiation  $\gamma$ , de manière équivalente à la perte de p53 [195]. Puma est aussi important pour l'apoptose indépendante de p53, induite par la privation en facteurs de croissance.

Des souris déficientes pour Bim présentent des défauts du système immunitaire [196]. Ces souris présentent aussi une mauvaise réponse des signaux de mort. Bid étant activé par la caspase-8, les souris K.O. pour Bid sont résistantes à l'apoptose induite par Fas (**A**ppoptosis **s**timulating **f**ragment) [197]. La délétion de Bad ne semble pas induire un défaut majeur d'apoptose, mais elle cause un défaut de la sécrétion d'insuline [198]. Les souris délétées pour Bik, Hrk et Bmf sont normales du point de vue du développement et de l'apoptose [137]. Enfin, la double délétion de Bim et Bik induit la stérilité chez les souris mâles, ce qui n'est pas observé dans le cas d'une délétion simple, suggérant que ces deux protéines ont des fonctions chevauchantes ou compensatrices [137].

### 3.5.2 Rôle dans la régulation du cycle cellulaire

Il a été rapporté que les protéines de la famille de Bcl-2 pouvaient réguler la progression du cycle cellulaire de la phase **G<sub>1</sub> vers la phase S** [199]. En effet, cette progression peut être inhibée par les anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, et Mcl-1 [200], mais peut être favorisée par des molécules pro-apoptotiques comme Bax [191], Bad [201] et Bid [202]. Cela a été montré dans différents types cellulaires.

Le mécanisme n'est pas totalement compris bien qu'il y ait plusieurs possibilités [203]. Une possibilité serait la **régulation de la machinerie cellulaire classique**, tel que p27<sup>kip1</sup>, la cycline E, et le membre de la famille de pRb, GM-130. Des cellules surexprimant Bcl-2, les niveaux de p27<sup>kip1</sup> et de GM-130 augmentent à la suite d'une stimulation par des mitogènes. La délétion de Bid [202], ou la surexpression de Bcl-2 [204], ne semblent pas affecter l'expression de Mcl-1, mais elles changent la cinétique d'expression de la cycline E. Une autre possibilité est la **régulation de la signalisation de prolifération** le long de la voie Raf (**R**apidly **a**ccelerated **f**ibrosarcoma)-ERK (**E**xtracellular signal **r**egulated **k**inase) [203].

Une série d'analyses par mutagenèse de Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> a montré que les fonctions de mort cellulaire et celles sur la prolifération n'étaient pas séparées [205, 206], suggérant que les protéines de la famille de Bcl-2 pourraient réguler ces deux fonctions via des **mécanismes comparables**. En outre, il est possible que de la même manière que leur régulation sur l'apoptose, les pro-apoptotiques et les anti-

apoptotiques pourraient agir sur des cibles semblables avec des activités de régulation opposées.

### 3.6 Rôle des protéines de la famille de Bcl-2 dans la biologie du cancer et le développement des stratégies thérapeutiques basées sur les BH3

Apoptose et développement du cancer sont étroitement associés. La capacité des membres anti-apoptotiques à maintenir la survie cellulaire sur une longue période peut être dangereux si elle n'est pas régulée. En effet, l'expression anormale de ces molécules peut mener à l'oncogenèse. L'expression dérégulée des pro- et des anti-apoptotiques a été montrée dans de nombreux types de cancers [207]. Cette découverte a mené à la définition d'un nouveau type de proto-oncogène, représenté par Bcl-2, qui agit en faveur de la survie [153].

Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, et/ou Mcl-1 sont **surexprimés** dans beaucoup de cancers, et cela corrèle avec un faible taux de survie, une progression accélérée de la maladie, et une résistance à la thérapie [4]. Certains cancers présentent même une **dépendance** vis à vis de cette famille de protéines [4]. Ainsi, ces protéines représentent des cibles idéales pour une thérapie anti-cancéreuse, et plusieurs stratégies ont été développées.

Une des premières approches a été l'utilisation d'**oligonucléotides antisens** pour réduire les niveaux d'expression de Bcl-2. L'oblimersen, un oligonucléotide antisens dirigé contre Bcl-2, a été testé cliniquement pour plusieurs cancers, mais les résultats ne furent pas ceux escompté [207]. Cela était peut-être dû au fait que l'oblimersen n'inhibe pas la fonction de Bcl-2, mais réduit juste son expression. De plus, les cellules cancéreuses pouvant surexprimer également Bcl-x<sub>L</sub> et/ou Mcl-1, cibler uniquement Bcl-2 peut ne pas être suffisant.

Une approche plus récente est basée sur l'utilisation de domaines BH3 pour inhiber les membres anti-apoptotiques. Des peptides BH3 synthétiques ont été « designés ». Ces peptides sont perméants, résistants aux protéases, et capables d'induire l'apoptose [208]. Plus largement testés sont les petites molécules organiques mimant les peptides BH3. Un **mimétique** bien caractérisé est l'ABT-737 (Composé **737** des laboratoires **Abott**), développé sur la base d'une relation structure-fonction par RMN (**Résonance magnétique nucléaire**) [209]. L'ABT-737 mime le domaine BH3 de Bad et se lie à Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-w avec une faible affinité. Cette molécule engage un groupement carboxyle avec l'arginine 149, et un groupement phényle avec la tyrosine 101, la leucine 108, la valine 126 et la phenylalanine 146 [209]. Il est

intéressant de constater que les résidus engagés avec le groupement phényle sont les mêmes qui sont occupés par l'asparagine 83 et la leucine 78 de Bak. Le succès de l'ABT-737 a entraîné le développement d'une molécule utilisable en clinique, l'ABT-263 (Composé **263** des laboratoires **Abott**), mais cette molécule a montré des effets secondaires, notamment sur les cellules hématopoïétiques. Le développement de BH3-mimétiques spécifiques des différents membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 représente un enjeu important. Dans cet objectif, une avancée importante a été faite récemment, avec le développement d'un BH3-mimétique spécifique de Bcl-2, l'ABT-199 (Composé **199** des laboratoires **Abott**).

### 3.7 Rôle des protéines de la famille de Bcl-2 dans la résistance au paclitaxel

De nombreuses études se sont intéressées à l'implication des protéines de la famille de Bcl-2 dans la résistance au paclitaxel. Il a été montré que la surexpression de Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> contribue à la résistance au paclitaxel [210, 211, 212]. Ces études suggéraient l'existence d'un **seuil d'expression** au delà duquel Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> confèrent la résistance au paclitaxel, car les niveaux d'expression nécessaires à la résistance étaient variables. Une autre étude a été réalisée sur la lignée de cancer du sein MCF-7 (**Michigan cancer foundation-7**) [213]. Dans cette étude le paclitaxel induisait la mort uniquement en présence de faibles concentrations d'estradiol. La présence de fortes concentrations d'estradiol inhibait cet effet, même en présence d'une concentration plus élevée en paclitaxel. L'estradiol induisait une élévation des niveaux de Bcl-2, sans effet sur les niveaux de Bax, ce qui supporte la notion que Bcl-2 confère une résistance au paclitaxel.

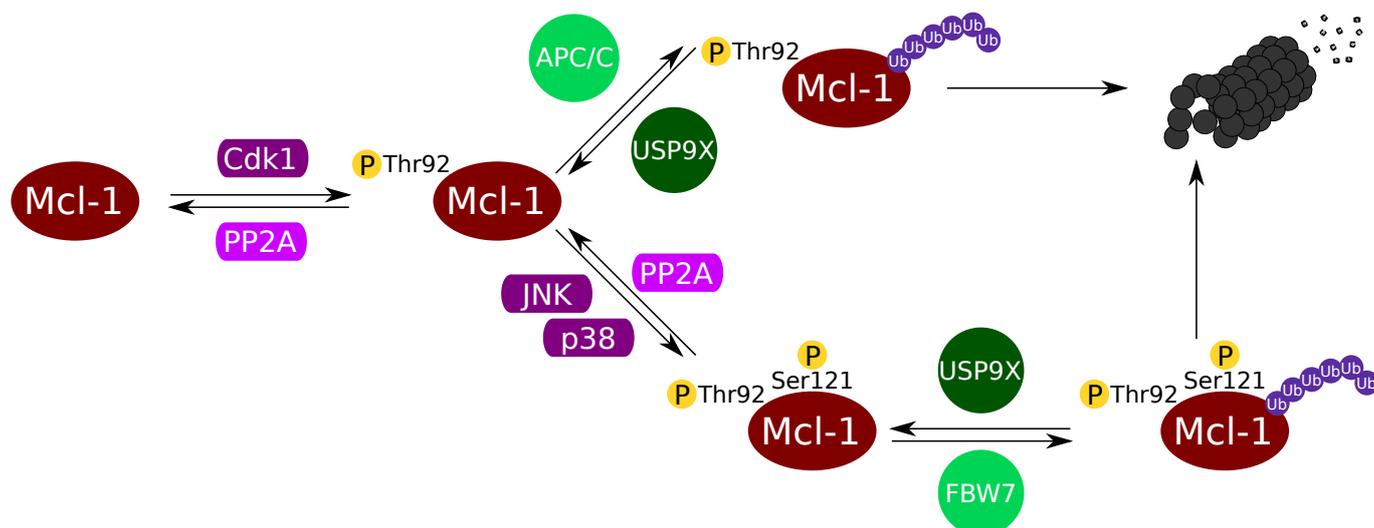
D'autres études se sont, elles, intéressées à l'implication de Bax et Bad. L'une d'entre elles a utilisé les lignées de cancer du sein MCF-7 et MDA-MB-231 (**M.D. Anderson metastatic breast 231**) [214]. Le traitement de ces lignées au paclitaxel induisait l'**hyperphosphorylation** de Bcl-2, l'expression de Bax, et la mort. Une augmentation des niveaux de Bcl-2 avait un effet protecteur en présence de faibles concentrations de paclitaxel. Ces résultats sont appuyés par d'autres, qui montrent que l'augmentation de l'expression Bax augmente la sensibilité au paclitaxel [215]. De la même manière, la transfection de Bad induit aussi une sensibilité au paclitaxel [216].

### 3.8 Rôle des protéines de la famille de Bcl-2 durant l'arrêt mitotique et l'échappement à l'arrêt mitotique

Nous avons détaillé, dans la première partie de l'introduction, le modèle des réseaux compétitifs. Dans ce modèle, la balance survie/mort est en compétition avec la dégradation de la cycline B1 pendant l'arrêt mitotique pour induire la mort mitotique, ou l'échappement à l'arrêt mitotique. Étant donné le rôle central que les protéines de la famille de Bcl-2 jouent dans la régulation de l'apoptose, plusieurs études ont été menées pour éclaircir leur implication durant l'arrêt mitotique.

L'équipe de Kanaga Sabapathy a mis en évidence un **rôle de Bim dans l'induction de la mort mitotique** induite par le paclitaxel [88]. Le rôle de Bim n'est pas l'élément central de ces travaux, qui s'intéressent plutôt au rôle de p73. Kanaga Sabapathy et son équipe ont en effet observé que l'extinction de p73 protégeait de la mort mitotique induite par le paclitaxel. La même observation a été faite pour Bim. L'induction de Bim, au niveau protéique, a été également observée sous traitement par le paclitaxel. Cette induction de Bim n'était pas dépendante de p73, et l'acteur en étant responsable n'a pas été trouvé. À ce jour, Bim reste le seul membre pro-apoptotique de la famille de Bcl-2 mis en cause dans la mort mitotique. Des études ont montré l'**implication de Bax, Bak et Bmf** dans la résistance au paclitaxel [217, 218, 219], cependant elles se sont intéressées uniquement à l'effet général du paclitaxel, et ne différenciaient pas arrêt mitotique et échappement à l'arrêt mitotique.

*A contrario*, nous disposons de beaucoup plus d'informations sur le rôle des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 pendant l'arrêt mitotique. Il semblerait en effet que Mcl-1 joue un rôle central dans la régulation de la mort mitotique. Cela pouvait ne pas paraître surprenant, *a priori*, compte tenu de la demi-vie de Mcl-1 qui est d'approximativement 30 minutes, la plus courte parmi les membres anti-apoptotiques dont les demies-vies s'approchent des 24 heures. Sachant qu'une mitose prolongée est source de dommages de l'ADN, il aurait été logique de penser que l'instabilité intrinsèque de Mcl-1 puisse servir de senseur de la durée de la mitose, durée qui n'excède pas 1 heure. **Mcl-1** sert effectivement de **senseur** de la durée de la mitose grâce à l'activité de Cdk1 caractéristique de la mitose. Dans les faits, Cdk1 phosphoryle Mcl-1 sur la thréonine 92, ce qui le rend sensible à l'ubiquitination par APC/C via Cdc20, et induit sa **dégradation par le protéasome** (Figure 3.4) [220]. Cette phosphorylation inhibe également l'interaction de Mcl-1 avec PP2A (**Protein phosphatase 2 A**), et promeut la phosphorylation sur la sérine 121 par JNK ou p38 (**Protein 38 kDa**). Finalement, la phosphorylation sur la sérine 121 induit la polyubiquitination via la ligase E3 FBW7 (**F-box/WD repeat-containing protein 7**) [221]. Nous ajouterons qu'une **couche supérieure de régulation** peut être représentée par la phosphatase PP2A [222], et USP9X (**Ubiquitin specific peptidase 9 x-linked**) [223], qui respectivement déphosphoryle et



**FIGURE 3.4 – Modifications post-traductionnelles régulant les niveaux d'expression de Mcl-1 pendant l'arrêt mitotique.** Durant l'arrêt mitotique, Cdk1 phosphoryle Mcl-1 sur la thréonine 92, ce qui le rend sensible à l'ubiquitination par APC/C. Cela empêche également l'interaction de Mcl-1 avec PP2A, et favorise sa phosphorylation sur la sérine 121 par JNK et p38. Cette seconde phosphorylation induit l'ubiquitination de Mcl-1 par FBW7, synonyme de dégradation par le protéasome. De par son activité déubiquitinase, USP9X protège Mcl-1 de la dégradation.

déubiquitine Mcl-1. Mcl-1 est donc hautement régulé au cours de l'arrêt mitotique.

Concernant Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>, leur implication dans la survie pendant la arrêt mitotique n'est pas aussi évidente que dans le cas de Mcl-1. Les preuves directes d'une implication de Bcl-2 ou Bcl-x<sub>L</sub> dans la survie pendant l'arrêt mitotique sont représentées par deux études montrant l'effet synergique de l'association du paclitaxel avec l'ABT-263 (forme orale de l'ABT-737) pour induire la mort mitotique [224, 225]. Les mécanismes moléculaires sous-jacents restent cependant obscurs. Il a été montré que **Cdk1 phosphoryle Bcl-2 sur la thréonine 56** [226], **et Bcl-x<sub>L</sub> sur la sérine 62** [95, 227]. Ces sites de phosphorylation se localisent sur la boucle non structurée qui lie les domaines BH3 et BH4, et ne sont pas directement impliqués dans la liaison via les domaines BH3. Néanmoins, il a été également montré que des mutants de Bcl-x<sub>L</sub>, phospho-défectifs pour le résidu 62, sont dans l'incapacité de se dissocier de Bax en réponse à des anti-mitotiques, protégeant ainsi les cellules de la mort [227]. Comme dans le cas de Mcl-1, JNK, p38 mais aussi des kinases de la voie de ERK et les polokinases peuvent contribuer à l'hyperphosphorylation de Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> pendant l'arrêt mitotique [228, 229, 230, 176]. Enfin, de la même manière que PP2A, PP1 (**P**rotein **p**hosphatase **1**) est en mesure de déphosphoryler Bcl-2 durant l'échappement à l'arrêt mitotique [231].

Nous avons représenté l'ensemble des modifications post-traductionnelles pouvant réguler les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 sur la figure 3.5. Nous y avons ajouté deux éléments de régula-

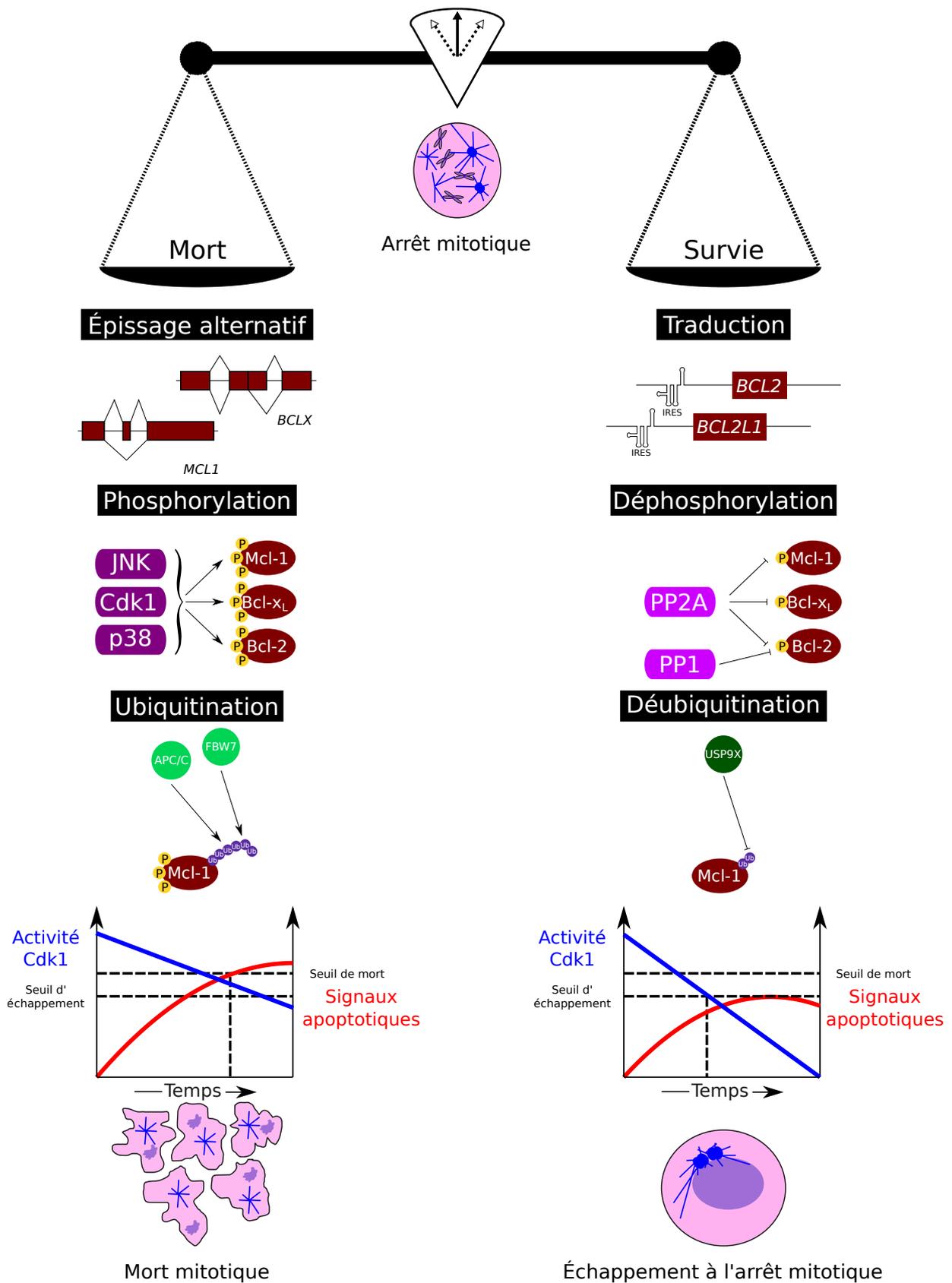


FIGURE 3.5 – Régulation des membres de la famille de Bcl-2 pendant l'arrêt mitotique. Durant l'arrêt mitotique, les niveaux d'expression membres de la famille de Bcl-2 sont régulés par l'épissage alternatif, la traduction indépendante de la coiffe, et des événements de phosphorylation et d'ubiquitination. Ces événements de régulations, combinés à l'activité de Cdk1, déterminent le devenir cellulaire suite à l'arrêt mitotique.

tions intervenant possiblement pendant l'arrêt mitotique. Le premier fait opposition aux phénomènes de dégradation active, observés par exemple dans le cas de Mcl-1. Il s'agit de la **traduction indépendante de la coiffe** pouvant survenir pendant l'arrêt mitotique, et induisant une augmentation au niveau protéique. Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> présentent en effet un séquence IRES (**I**nternal **r**ibosome **e**entry **s**ite) au sein de leur ARNm (**ARN** **m**essenger) [232]. Dans ce sens, une étude montre que le facteur de transactivation dépendante des séquences IRES, DAP5 (**D**eath-**a**ssociated **p**rotein **5**) empêche la mort mitotique en maintenant des niveaux élevés de Bcl-2 [233]. Le second élément s'affranchit également de l'inhibition de la transcription propre à la mitose, c'est l'**épissage alternatif**. Pour preuve, de nombreux régulateurs de la progression en mitose sont impliqués dans l'épissage alternatif de Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 [234].

Toujours sur figure 3.5, nous présentons une vision plus personnelle du modèle des réseaux compétitifs, où les signaux de mort et l'activité de Cdk1 ne seraient pas des variables **indépendantes**, mais bien **liées** [99]. Ainsi, alors que l'activité de Cdk1 diminuerait avec le temps passé en mitose, l'intensité des signaux de mort résulterait de l'intégration de l'activité de Cdk1 au cours du temps. La résultante de cela serait des signaux mort qui, dans un premier temps, augmenteraient rapidement, avant de diminuer à un moment qui dépend de l'activité de Cdk1.

Pour finir, l'échappement étant une issue probable de l'arrêt mitotique, l'implication des protéines de la famille de Bcl-2 dans la survie suite à l'échappement à l'arrêt mitotique se doit d'être considérée. Les travaux de Richard Bertrand il montrent l'implication de Bcl-x<sub>L</sub> dans l'échappement [235]. Plus précisément, Bcl-x<sub>L</sub> est en mesure d'interagir avec APC/C ce qui régule la progression vers la cytokinèse. Cette interaction nécessite la phosphorylation de Bcl-x<sub>L</sub> par Plk3 sur la sérine 49. Toujours dans ce sens, la même équipe a montré que l'interaction entre Cdk1 et Bcl-x<sub>L</sub> impactait sur l'activité de Cdk1, en plus de phosphoryler Bcl-x<sub>L</sub> [236]. Concernant maintenant la survie post-échappement, il a été montré qu'elle pouvait être régulée par p53 via Bax, puisque de cellules K.O. pour ces deux protéines génèrent des cellules polyploïdes [84]. La difficulté d'obtenir des cellules ayant échappé à l'arrêt mitotique, a amené l'utilisation de procédés générant des cellules tétraploïdes, qui par définition est l'état d'une cellule échappée. Un de ces procédés est l'utilisation d'inhibiteurs chimiques d'Aurora B dont l'action empêche cette protéine de jouer son rôle dans cytokinèse, et produit des cellules tétraploïdes [237]. De l'utilisation de cette méthode ressort l'observation d'une addiction des cellules tétraploïdes à Bcl-x<sub>L</sub> [237].

# Chapitre 4

## Justification du sujet

Au cours de cette introduction nous avons cherché à mettre en lumière le fait que les taxanes, et particulièrement le paclitaxel, sont essentiels dans le traitement du cancer du sein. Ils sont utilisés en traitement adjuvant (et néo-adjuvant), en combinaison avec le trastuzumab (thérapie ciblée), et sont indispensables dans le traitement du cancer du sein métastatique, et triple-négatif. Cependant, deux phénomènes peuvent limiter leur utilisation :

- la neurotoxicité ;
- les phénomènes de résistance innée ou acquise.

Le paclitaxel est un composé qui se lie à la tubuline  $\beta$  des microtubules, et empêche leur dépolymérisation. Cela perturbe l'équilibre dynamique des microtubules et allonge ces derniers. Sous paclitaxel, les microtubules ne peuvent séparer les chromatides soeurs, cela empêche la levée du point de contrôle mitotique. Dans ces conditions, le couple APC/C-Cdc20 ne peut dégrader la cycline B, et Cdk1 conserve un haut niveau d'activité : la cellule est bloquée en mitose. Ce blocage en mitose peut mener à plusieurs devenir cellulaires possibles, dont la mort mitotique et l'échappement à l'arrêt mitotique (sortie de mitose sans division cellulaire). Le modèle des réseaux compétitifs se propose d'expliquer la survenue de l'un ou l'autre de ces devenir cellulaires mutuellement exclusifs. Dans de ce modèle, des signaux de mort d'un côté, et des signaux de sortie de mitose de l'autre, déterminent l'apparition de la mort mitotique, si les signaux de mort sont plus importants que les signaux de sortie de mitose, et l'apparition de l'échappement à l'arrêt mitotique, si l'inverse se produit. L'échappement à l'arrêt mitotique peut constituer un facteur de résistance, car la cellule ne meurt pas, et d'agressivité, car la cellule devient polyploïde. Par conséquent, une amélioration des traitements par le paclitaxel peut passer par une meilleure compréhension des mécanismes gouvernant la décision cellulaire entre mort mitotique et échappement, et/ou par l'identification de nouvelles cibles permettant d'induire l'arrêt mitotique de manière plus efficace. Les protéines de la famille de Bcl-2 sont des régulateurs majeurs de l'apoptose, et donc des signaux de mort. Cette famille se divise en membres pro- et anti-apoptotiques. Les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 peuvent agir à de multiples niveaux au cours de l'arrêt mitotique :

- en favorisant la survie pendant l'arrêt mitotique ;
- en favorisant l'échappement à l'arrêt mitotique ;
- en favorisant la survie des cellules ayant échappé à l'arrêt mitotique.

Tout cela justifie l'étude de cette famille de protéines dans un contexte d'arrêt mitotique prolongé, ou d'échappement à l'arrêt mitotique, et les divers mode d'actions présentés délimitent le champ d'étude à couvrir.

Au cours de nos expériences, nous avons tenté de :

1. caractériser la mort mitotique dans un modèle de cancer du sein triple-négatif, la lignée MDA-MB-231 ;
2. déterminer quelles protéines de la famille de Bcl-2 sont impliquées dans la survie, ou la mort, qui suit l'arrêt mitotique ;
3. analyser les mécanismes de régulation de ces protéines au cours de l'arrêt mitotique.

Les travaux présentés dans les pages suivantes traitent de l'implication du membre anti-apoptotique de la famille de Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> dans la régulation de la mort mitotique. Ils montrent que Bcl-x<sub>L</sub> est important pour la survie, pendant l'arrêt mitotique, de cellules tumorales mammaires triple-négatives. Ce rôle dépend d'une modification post-traductionnelle : sa phosphorylation sur la sérine 62, qui module son interaction avec Bax. Nous nous sommes également intéressés à la survenue, ou non, de la MOMP pendant la mort mitotique, ainsi qu'à la résistance au paclitaxel. L'ensemble de ces travaux justifie le ciblage de Bcl-x<sub>L</sub> en combinaison avec le paclitaxel.

## **Deuxième partie**

### **Matériel et méthodes**

# Chapitre 1

## Culture cellulaire et traitements

Nos travaux ont nécessité l'utilisation de six lignées cellulaires :

- MDA-MB-231 ;
- CAL-51 (**C**entre **A**ntoine **L**acassagne **51**) ;
- MCF-7 ;
- MCF-7-YFP (**Y**ellow **f**luorescent **p**rotein) ;
- MCF-7-YFP-Bcl-x<sub>L</sub> ;
- HeLa (**H**enrietta **L**acks).

Toutes ces lignées, exceptée la lignée CAL-51, ont été obtenues de l'ATCC (**A**merican **t**ype **c**ulture **c**ollection) (Rockville, Maryland, États-Unis), excepté les lignées MCF-7-YFP et MCF-7-YFP-Bcl-x<sub>L</sub> qui ont été sélectionnées dans notre laboratoire par Sophie De Carné.

Les références des milieux de culture, des additifs et de la trypsine sont répertoriés dans le tableau 1.1. Les flasques, et plaques, utilisés était de la marque Nunc<sup>®</sup>, les pipettes et les tubes de la marque Falcon<sup>®</sup>.

Produit	Marque	Référence
DMEM	Life Technologies™ Gibco®	21969-035
RPMI	Life Technologies™ Gibco®	31870-025
Pénicilline/Streptomycine	Life Technologies™ Gibco®	15140-122
L-Glutamine	Life Technologies™ Gibco®	25300-054
Trypsine	Life Technologies™ Gibco®	25030-024

**Tableau 1.1 – Produits pour la culture cellulaire.**

Les composés chimiques utilisés pour les traitements, et leur concentration sont répertoriés dans le tableau 1.2.

Composé	Marque	Référence	Concentration
Paclitaxel		Fournit par l'Institut René Gauducheau	70 nmol/l
ABT-737	Selleck Chemicals®	S1002	1 µmol/l
Q-VD-OPh	R& D Systems®	OPH001-01M	5 µmol/l
AZD1152	Bio Vision®	1583-5	200 nmol/l

**Tableau 1.2 – Molécules chimiques utilisées pour les traitements.**

# Chapitre 2

## ARN interférence

Le réactif de transfection utilisé est le *Lipofectamine® RNAiMAX Reagent* (Life Technologies™ Invitrogen™, 13778-150). Les cellules sont transfectées à une confluence d'environ 70 %, dans de l'Opti-MEM®. Les quantités utilisées sont les suivantes :

- Pour un puit de plaque 24 puits : 6 pmol de siRNA (**S**mall **i**nterfering **R**NA) et 1 µl de réactif de transfection, dans un volume total de 600 µl ;
- Pour un puit de plaque 6 puits : 30 pmol de siRNA et 5 µl de réactif de transfection, dans un volume total de 2,5 ml.

La quantité de siRNA est triplée dans le cas des cellules MDA-MB-231. Le milieu de culture est remplacé 6 heures après transfection. L'ensemble des siRNA utilisés sont détaillés dans le tableau 2.1.

siRNA	Marque	Référence
Contrôle	Thermo Scientific™ Dharmacon®	D-001810
Bcl-2	Integrated DNA Technologies®	#60018360
Bcl-x <sub>L</sub>	Thermo Scientific™ Dharmacon®	L-003458-00
Mcl-1	Life Technologies™ Ambion®	25300-054
Bax	Integrated DNA Technologies®	#60730232
Bim	Cell Signaling Technology®	#6461
Noxa	Life Technologies™ Ambion®	AM16104
Cdc20	Life Technologies™ Ambion®	AM51331

**Tableau 2.1 – siRNA utilisés.**

# Chapitre 3

## « Reverse transcription quantitative polymerisation chain reaction »

Pour chaque échantillon, les cellules sont trypsinées entre 2 et 5 minutes à 37 °C, centrifugées 5 minutes à 500 g, et reprises dans du PBS (**P**hosphate **b**uffered **s**aline) [NaCl 137 mmol/l, KCl 2,7 mmol/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,8 mmol/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mmol/l, pH 7,2] à 4 °C. Les ARN sont ensuite extraits grâce au kit *RNeasy plus minit kit* (Qiagen, 74136).

### 3.1 « Reverse Transcription »

Pour la RT (**R**everse **t**ranscription), le kit *Maxima™ First Strand cDNA Synthesis RT-qPCR* (Thermo Fisher Scientific, 1033-4500) est utilisé. Ce kit contient deux solutions :

- une solution contenant la transcriptase inverse et un inhibiteur des RNases, que nous appelons solution A ;
- une solution contenant un tampon de réaction, des dNTP (**D**eoxyribonucleotide **t**riphosphate), des oligo(dT)<sub>18</sub> (**O**ligo **d**eoxythymine (**18**)), et des « random hexamer primers ».

Pour chaque échantillon, 500 ng d'ARN sont prélevés, auxquels sont ajoutés 2 µl de la solution A et 4 µl de la solution B. De l'eau est ensuite ajoutée à l'échantillon pour atteindre un volume de 20 µl. Les échantillons sont ensuite incubés dans le thermocycleur avec le programme suivant :

- 10 minutes à 25 °C (hybridation des oligo(dT)<sub>18</sub> et des « random hexamer primers » ;
- 15 minutes à 50 °C (élongation) ;
- 5 minutes à 85 °C (dénaturation de la transcriptase inverse).

Pour chaque expérience, un contrôle ne contenant pas d'ARN, mais de l'eau, est réalisé.

## 3.2 qPCR

La qPCR (**Q**uantitative **p**olymerisation **c**hain **r**eaction) est réalisée à l'aide du kit *Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X), ROX solution provided* (Thermo Fisher Scientific, 1186-3823). Ce kit permet la préparation d'un mélange, que nous appellerons mélange de qPCR, dont la composition n'est pas fournie, mais qui doit contenir :

- de la *hot start taq polymerase*;
- du MgCl<sub>2</sub>;
- des dNTP;
- du ROX™ et du SYBR® Green.

Pour chaque échantillon, deux points sont réalisés. Chaque point contient :

- 4 µl des ADNc (**A**cide **d**ésoxyribonucléique **c**omplémentaire) dilués vingt-cinq fois;
- 1 µl d'une solution contenant les amorces sens et anti-sens à des concentrations de 1,5 µmol/l.
- 5 µl de mélange de qPCR.

Un contrôle ne contenant pas d'ADNc, mais de l'eau, est également réalisé. Enfin, la qPCR est réalisée sur un appareil *Stratagene Mx3005P* (Agilent Technologies) avec le programme suivant :

- 1 cycle de dénaturation initiale (15 minutes à 95 °C);
- 40 cycles de dénaturation (10 secondes à 95 °C) et d'hybridation/élongation (30 secondes à 60 °C).

Les amorces utilisées sont les suivantes :

- RPLP0 (**R**ibosomal **p**rotein **l**arge **P**0) :
  - sens : 5'-AACCCAGCTCTGGAGAAACT-3'
  - antisens : 5'-CCCCTGGAGATTTTAGTGGT-3'
- HPRT1 (**H**ypoxanthine **p**hosphoribosyltransferase 1) :
  - sens : 5'-ATGCTGAGGATTTGGAAAGG-3'
  - antisens : 5'-GATGTAATCCAGCAGGTCAGC-3'
- ACTB1 (**A**ctin **β**1) :
  - sens : 5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3'
  - antisens : 5'-CAGAGGCGTACAGGGATAGC-3'
- CDC20 (**C**ell-**d**ivision-**c**ycle **20** homologue gene) :
  - sens : 5'-GGCGCTCCCATGGCACAGTT-3'
  - antisens : 5'-CGGTCACCGCCAGGTTTGCT-3'
- NOXA (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (**n**oxa pour « dommage » en latin) gene) :
  - sens : 5'-GCTGGAAGTCGAGTGTGCTA-3'

- antisens : 5'-CCTGAGCAGAAGAGTTTGGGA-3'
- SIX1 (Sine oculis homeobox homolog 1 gene) :
  - sens : 5'-ACCGGAGGCAAAGAGACCGGG-3'
  - antisens : 5'-ACATGAGCGGCTTGCCCCCT-3'

# Chapitre 4

## Immunoblot

L'analyse par immunoblot se réalise sur des lysats protéiques. Les cellules sont trypsinées entre 2 et 5 minutes à 37 °C, centrifugées 5 minutes à 500 g, et reprises dans du PBS à 4 °C. Après un lavage au PBS, les culots obtenus sont lysés par addition de tampon de ChIP (**Chromatin immunoprecipitation**) [NaCl 150 mmol/l, EDTA (Acide éthylène **d**iamine **t**étraacétique) 2 mmol/l, Tris 20 mmol/l, Triton-X100 1 %, leupeptine 1 µg/ml, aprotinine 1 µg/ml, PMSF (**p**henyl**m**ethylsulfon**y**l **f**luoride) 1 µmol/ml, pH 8,1], puis subissent trois sonications aux ultrasons, à 4 °C, de 10 à 15 minutes chacune. Ensuite, les protéines sont dénaturées (5 minutes à 95 °C), et isolées par électrophorèse sur un gel SDS (**Sodium dodecyl sulfate**)/polyacrylamide. S'ensuit alors un transfert liquide sur une membrane de PVDF (**Polyvinylidene fluoride**), et un blocage de 30 dans une solution de TBS (**T**ris **b**uffered **s**aline)[Tris 25 mmol/l, NaCl 150 mmol/l, KCl 2 mmol/l, pH 7,4]-BSA (**B**ovine **s**erum **a**lbumine) 3 %. Les protéines sont détectées par un immunomarquage, via un anticorps primaire (Tableau 4.1) et un anticorps secondaire couplé à la HRP (**H**orseradish **p**eroxidase). Le complexe antigène/anticorps ainsi formé est mis en évidence par l'addition d'un substrat de la HRP (Kit **Clarity™ Western ECL Substrate**, 170-5060, Bio-Rad™). Enfin l'analyse de la chemiluminescence est réalisée numériquement sur un appareil *Universal Hood III* (Bio-Rad™).

Anticorps	Marque	Référence	Dilution
Bcl-2	Integrated DNA Technologies®	#60018360	1/500
Bcl-x <sub>L</sub>	Thermo Scientific Dharmacon	L-003458-00	1/1000
pBcl-x <sub>L</sub> S62	Chemicon International®	AB3573	1/500
Mcl-1	Life Technologies™ Ambion®	25300-054	1/1000
Bax	Integrated DNA Technologies®	#60730232	1/500
Bim	Cell Signaling Technology®	#6461	1/500
Noxa	Life Technologies™ Ambion®	AM16104	1/500
Cdc20	Life Technologies™ Ambion®	AM51331	1/500

**Tableau 4.1 – Anticorps utilisés pour les immunoblots.**

# Chapitre 5

## Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Cette analyse repose sur un double marquage avec un anticorps MPM-2 (**Mitotic protein monoclonal 2**)-FITC (**F**luorescein **i**sothiocy**a**nate) (Upstate<sup>®</sup>, #16-155) et par l'iodure de propidium. Les cellules sont récupérées par trypsination entre 2 et 5 minutes à 37 °C, et centrifugation 5 minutes à 500 g. Les cellules sont ensuite reprises dans du PBS à 4 °C, mises dans la glace et comptées. Puis 2 000 000 sont récupérées et fixées sur la nuit dans une solution de PBS-SVF (**S**érum de **v**eau **f**étal) 12,5 %-éthanol 20 %. Suite à cela, les cellules sont récupérées par centrifugation, lavées, et perméabilisées 15 minutes sur glace, dans une solution de PBS-saponine 0,1 %. Les cellules sont ensuite lavées deux fois au PBS, et reprises dans 200 µl d'une solution de PBS-SVF 2 % supplémentée de 0,25 µl dans d'anticorps MPM-2-FITC. Les échantillons sont alors incubés 1 heure à 4 °C sous agitation. Après deux lavages au PBS, les cellules sont reprises dans 200 µl d'une solution de PBS-iodure de propidium (13 µg/ml). Enfin, 15 minutes plus tard, les échantillons sont analysés par cytométrie en flux sur appareil *FACSCalibur*<sup>®</sup> (BD Biosciences<sup>®</sup>).

# Chapitre 6

## Analyse de l'apoptose par cytométrie en flux

### 6.1 Simple marquage APO2.7

La récupération des cellules s'effectue par trypsination entre 2 et 5 minutes à 37 °C, et centrifugation 5 minutes à 500 g. Les cellules sont ensuite reprises dans du PBS à 4 °C, mises dans la glace et comptées. Puis 1 000 000 sont récupérées et incubées 15 minutes dans une solution composée de 50 µl de PBS et 2 µl d'anticorps APO2.7-phycoérythrine<sup>1</sup> (IOTest®, IM2088U), à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après deux lavages au PBS, les cellules sont fixées 10 minutes dans une solution de PBS-formaldéhyde 1 %, lavées et analysées par cytométrie en flux.

### 6.2 Double marquage annexine V-iodure de propidium

La récupération des cellules s'effectue par trypsination entre 2 et 5 minutes à 37 °C, et centrifugation 5 minutes à 500 g. Les cellules sont ensuite reprises dans du PBS à 4 °C, mises dans la glace et comptées. Puis les cellules sont culotées (5 minutes à 500 g), et reprises dans du tampon 1X (kit Miltenyl Biotec®, 130-092-052) à 4 °C, dans des proportions de 1 000 000 de cellules pour 100 µl de tampon selon les besoins. 10 µl de la solution d'anticorps Annexin-FITC sont ensuite ajoutés aux échantillons<sup>2</sup>, et les préparations sont incubées 15 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées deux fois dans 250 µl de tampon 1X, et reprises dans 200 µl de tampon 1X (le tout à 4 °C). Enfin, de l'iodure de propidium est ajouté à une concentration de 13 µg/ml juste avant analyse par cytométrie en flux<sup>3</sup>.

---

1. Concentration non indiquée par le fournisseur.

2. La concentration de la solution d'anticorps n'est pas fournie par la documentation du kit.

3. La documentation du kit préconise d'ajouter 5 µl de leur solution d'iodure de propidium (concentration inconnue), mais alternativement nous avons utilisé des solutions autres à cette concentration.

# Chapitre 7

## Profilage BH3

### 7.1 Exposition aux peptides BH3

La récupération des cellules s'effectue par trypsination entre 2 et 5 minutes à 37 °C, et centrifugation 5 minutes à 500 g. Les cellules sont ensuite reprises dans du tampon DTEB (**D**erived from **t**rehalose **e**xperimental **b**uffer)[Tréhalose 135 mmol/l, KCl 50 mmol/l, EDTA 20 µmol/l, EGTA (Acide éthylène glycol tétraacétique) 20 µmol/l, acide succinique 5 mmol/l, BSA 0,1 %, HEPES (Acide 4-(2-**h**ydroxy**é**thyl)-1-pipérazine **é**thane sulfonique)-KOH 10 mmol/l, pH 7,5], mises dans la glace et comptées. Puis 250 000 cellules sont reprises dans 100 µl de tampon DTEB, et 100 µl d'une solution, composée de 98 µl de DTEB-digitonine 0,002 % et de 2 µl de la solution contenant le peptide BH3, est ajoutée. Les 200 µl du mélange cellules/digitonine/peptides sont ensuite incubés 1 heure à température ambiante. S'ensuit l'ajout de 200 µl d'une solution de PBS-formaldéhyde 8 %, et une incubation de 15 minutes à température ambiante. Suite à cela, 50 µl d'une solution de PBS-glycine 2,5 mol/l est ajoutée, et le mélange est incubé 5 minutes à température ambiante.

### 7.2 Marquage du cytochrome c

Après incubation avec la glycine, les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500 g, puis reprises dans une solution contenant l'anticorps dirigé contre le cytochrome c (directement couplé Alexa Fluor<sup>®</sup>, Santa Cruz Biotechnologies<sup>®</sup>, sc-13561 AF647) dans du PBS-BSA 1 %-saponine 0,05 %. Enfin, les échantillons sont incubés à 4 °C, sur la nuit, à l'abri de la lumière, et 450 µl de PBS sont ajoutés avant l'analyse par cytométrie en flux sur un appareil *LSRFortessa*<sup>®</sup> (BD Biosciences<sup>®</sup>).

### 7.3 Contrôles et calcul de la libération de cytochrome c

Deux contrôles sont effectués :

- un échantillon cellulaire mise en contact avec du DMSO (**Diméthylsulfoxyde**) plutôt qu'avec un peptide BH3, et que sera marqué avec le contrôle isotypique de l'anticorps dirigé contre le cytochrome *c*;
- un échantillon mis en contact avec une forme inactive du peptide BH3 et Puma, Puma2A, et qui sera marqué avec l'anticorps dirigé contre le cytochrome *c*.

Ces deux contrôles permettent de calculer le pourcentage de libération du cytochrome *c*. La perte de cytochrome *c* correspond au ratio entre la moyenne de l'échantillon et la moyenne (ou médiane) de la condition n'induisant pas de libération de cytochrome *c* (Puma2A ou DMSO). La soustraction par la valeur de l'isotype permet de retirer le bruit de fond.

$$\% \text{ Perte de cytochrome } c = 1 - \frac{\text{Moyenne/Médiane}_{\text{Echantillon}} - \text{Moyenne/Médiane}_{\text{Isotype}}}{\text{Moyenne/Médiane}_{\text{Puma2A/DMSO}} - \text{Moyenne/Médiane}_{\text{Isotype}}}$$

# Chapitre 8

## Analyse par vidéomicroscopie

### 8.1 Analyse dynamique du devenir cellulaire par vidéomicroscopie

#### 8.1.1 Infection

250 000 cellules, dans 2 ml de milieu, sontensemencées dans un puit de plaque 6 puits. 24 heures plus tard, les lentivecteurs H2B-RFP (**R**ed **f**luorescent **p**rotein) sont ajoutés au milieu (MOI (**M**ultiplicity **o**f **i**nfection)=3). Les cellules sont lavées 6 heures plus tard, laissées à proliférer 48 heures. Les cellules sont ensuite trypsinées, lavées, etensemencées dans une plaque 24 puits, à raison de 30 000 par puits. Si l'expérience le nécessite, un infection avec des lentivecteurs shRNA (**S**mall **h**airpin **R**NA) contrôle, ou codant pour Bcl-x<sub>L</sub> coexprimé avec la RFP, est réalisée 24 heures plus tard (6 heures de contact dans la milieu de culuture puis lavage.

#### 8.1.2 Acquisition

Après infection, les cellules subissent un double blocage à la thymidine à une concentration de 2,5 mmol/l : 24 heures de blocage, suivis de 16 heures de relargage, puis 24 heures de blocage de nouveau. Les cellules sont ensuite relarguées par trois lavages et l'ajout de 500 µl de milieu de culture. Enfin les cellules sont immédiatement traitées, et analysées au vidéomicroscope pendant 72 heures à raison d'une prise de vue toutes les 10 minutes. Pour chaque puits deux à trois champs d'acquisition (x10) sont sélectionnés, chacun contenant environ 100 cellules. Aux canaux de fluorescence nécessaires, est ajoutée une acquisition en fond clair, *i.e.* sans fluorescence. L'acquisition est réalisée sur un vidéomicroscope *DMI 6000B* (Leica®).

## 8.2 Analyse dynamique de la perméabilisation mitochondriale par vidéomicroscopie confocale

### 8.2.1 Infection et ensemencement

250 000 cellules, dans 2 ml de milieu, sont ensemencées dans un puit de plaque 6 puits. 24 heures plus tard, les lentivecteurs codant pour MTS (**M**itochondrial **t**argeting **s**equences)Htra2/OmimCherry (**M**onomeric **c**herry) sont ajoutés au milieu (MOI=3). Les cellules sont lavées 6 heures plus tard, laissées à proliférer 48 heures. Les cellules sont ensuite trypsinées, lavées, et 150 000 cellules sont ensemencées dans une chambre Cytoo® contenant une lame du même nom. Les cellules sont laissées à adhérer 4 heures, puis un lavage au PBS est effectué, et 200 µl de milieu de culture est ajouté. Enfin les cellules sont traitées.

### 8.2.2 Acquisition

Après ensemencement et traitement, la chambre Cytoo® est placée dans le microscope confocal. Trois canaux sont nécessaires à l'acquisition : un pour les protéines MTS-Htra2/Omi-mCherry, un pour la fibronectine de la lame (fluorescente), et un fond clair. Deux prises de vue sont effectuées, x20 et x40, sur une vingtaine de champs, la prise de vue x40 étant centrée sur une seule cellule. L'acquisition est réalisée sur 24 heures, à raison d'une prise de vue toutes les 5 minutes sur trois plan focaux, sur un appareil *ECLIPSE Ti* (Nikon®).

## Chapitre 9

# Analyse d'interactions par « Bioluminescence Resonance Energy Transfer »

Les cellules sontensemencées dans une plaque 6 puits, et transfectées avec 200 ng (pour chaque puits) de plasmides donneurs pRluc-Bax, et 1 µg (pour chaque puit) de plasmides accepteurs (peYFP-Bcl-x<sub>L</sub>, peYFP-Bcl-x<sub>L</sub>S62A, peYFP-Bcl-x<sub>L</sub>S62D, pCMV-Bcl-x<sub>L</sub>). 24 heures plus tard, les cellules sont trypanées etensemencées dans une plaque 96 puits blanche. Après 24 heures, les cellules sont traitées 16 heures (paclitaxel 70 nmol/l et ABT-737 1 µmol/l), et les émissions à 485 et 530 nm sont mesurées, après ajout de la coelenterazine H (substrat de la luciférase, 5 µmol/l), au détecteur de fluorescence-luminescence *Mithras LP 940*.

## **Troisième partie**

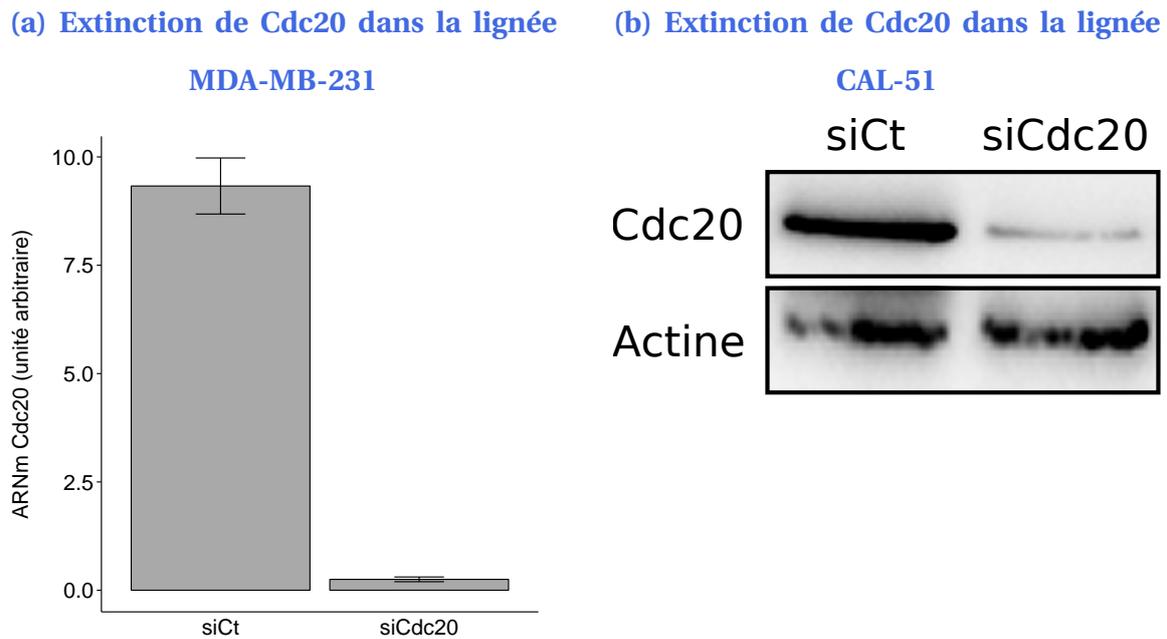
### **Résultats**

# Chapitre 1

## Arrêt mitotique et induction de mort par l'extinction de Cdc20 ou le traitement au paclitaxel

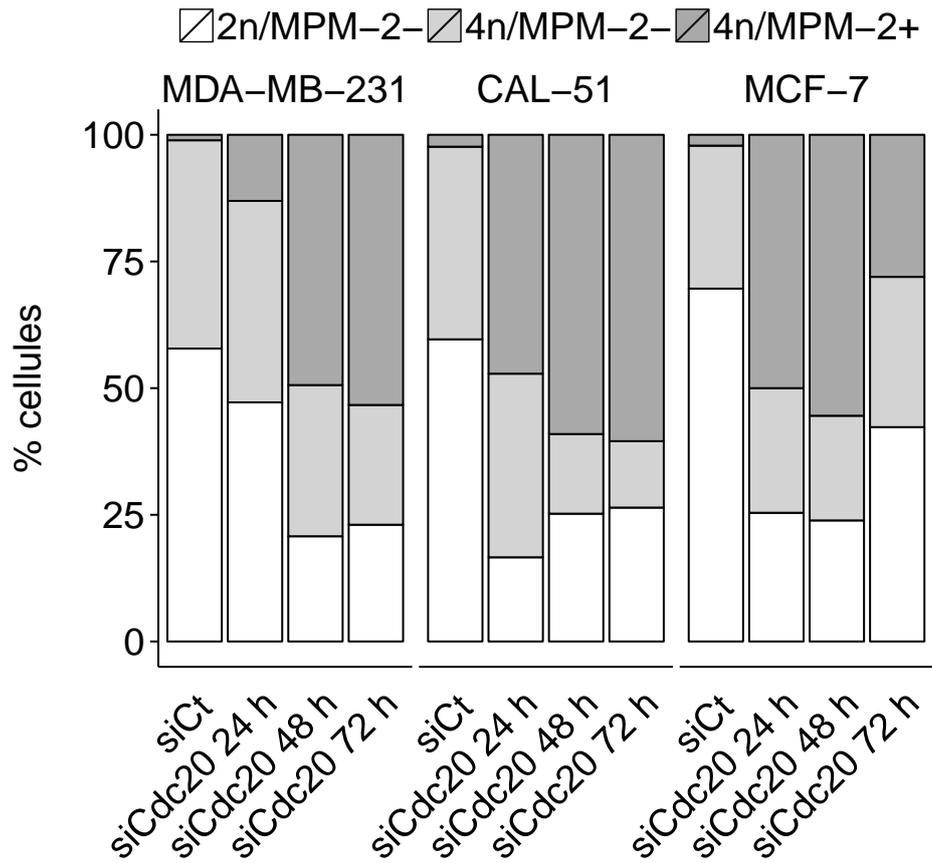
### 1.1 Détection quantitative de l'arrêt mitotique

Il apparaît évident qu'étudier l'arrêt mitotique nécessite, avant tout autre chose, une méthode d'induction du blocage en mitose. En outre, cette méthode se doit d'induire l'arrêt mitotique par le biais du point de contrôle mitotique. Les méthodes les plus populaires sont l'utilisation des poisons des microtubules, comme le paclitaxel ou le nocodazole. Le nocodazole se fixe également sur la tubuline  $\beta$  des microtubules, cependant à l'inverse du paclitaxel il agit en faveur du raccourcissement de ces derniers. Plus récemment, le ciblage de Cdc20 est apparu comme une alternative à l'utilisation des poisons des microtubules. En effet, l'extinction de cette protéine par ARN interférence empêche l'induction de sortie de mitose par maintien de l'activité de Cdk1. Cela mime en quelque sorte une non levée du point de contrôle mitotique qui n'a plus les moyens d'exercer sa fonction. Cette méthode a l'avantage d'induire un arrêt mitotique direct, et plus physiologique, en ce qu'il ne touche pas les microtubules. Il nous a donc semblé intéressant d'utiliser cette méthode, et de la comparer au paclitaxel. Des cellules MDA-MB-231 et CAL-51 ont été transfectées avec des siRNA dirigés contre Cdc20, et récupérées 48 heures plus tard (Figure 1.1). Nous avons rencontré des difficultés de détection de Cdc20 par immunoblot dans les MDA-MB-231, possiblement à cause de la qualité de l'anticorps, ou d'une trop faible expression de cette protéine dans ces cellules. L'efficacité de l'extinction a donc été vérifiée par RT-qPCR (**R**everse **t**ranscription **q**uantitative **p**olymerisation **c**hain **r**eaction) (Figure 1.1a). Cdc20 était en revanche détectable par immunoblot dans le cas des CAL-51, et nous avons pu constater l'efficacité de l'extinction (Figure 1.1b).



**FIGURE 1.1 – Extinction de Cdc20 par ARN interférence.** Des cellules MDA-MB-231 (a) et CAL-51 (b) ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCt) ou un siRNA dirigé contre Cdc20 (siCdc20). Les niveaux d'expression de l'ARNm de Cdc20 ont été analysés par RT-qPCR dans le cas des MDA-MB-231 (a), et l'extinction a été vérifiée par immunoblot dans le cas des CAL-51 (b).

La principale conséquence fonctionnelle de l'extinction de Cdc20 est censée être l'induction de l'arrêt mitotique. Se pose alors la question de la détection de l'arrêt mitotique, et plus généralement de la mitose. La découverte de la mitose est consubstantielle à son aspect visuel. C'est en effet après un marquage de l'ADN que Walther Flemming a été en mesure d'observer cette période critique de la vie de la cellule. Aujourd'hui encore, l'étude de la mitose reste intimement liée à la microscopie. La microscopie a d'ailleurs été longtemps l'unique méthode de détection de la mitose, mais de nos jours elle se destine plutôt à l'évaluation de paramètres plus fins, et la détection quantitative est aujourd'hui faite par cytométrie en flux. La quantification par cytométrie en flux repose sur le marquage du matériel génétique, avec de l'IP (Iodure de propidium) ou du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) par exemple. Cela permet d'identifier les cellules ayant achevé (4n) ou non (2n) la réplication. Néanmoins, la population 4n représentant à la fois les cellules en mitose, les cellules en phase G2 et les cellules tétraploïdes, il est d'usage d'ajouter un marquage de l'activité des kinases mitotiques. Le second marquage cible donc généralement soit la sérine 10 de l'histone H3, soit MPM-2. MPM-2 est un phospho-épitope spécifique de la phosphorylation par Cdk1 et Plk1. Ainsi un co-marquage IP/MPM-2 permet de détecter spécifiquement les cellules en mitose. Ce co-marquage a été réalisé après extinction de Cdc20 dans les lignées MDA-MB-231, CAL-51 et MCF-7 (Figure 1.2), trois lignées de cancer du sein (triple négatif pour les deux premières, et ER+ pour la dernière). Cette expérience comporte un aspect cinétique rendu possible par

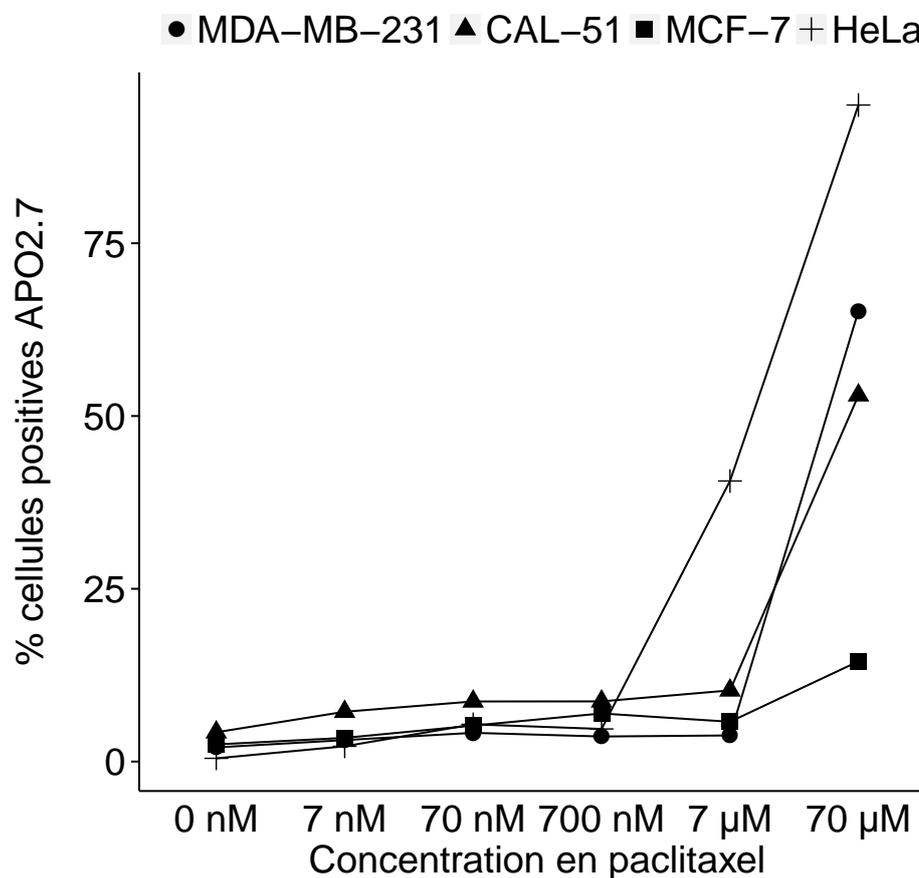


**FIGURE 1.2 – L’extinction de Cdc20 induit une accumulation des cellules en arrêt mitotique dans les lignées MDA-MB-231, CAL-51 et MCF-7. Les cellules MDA-MB-231, CAL-51 ou MCF-7 ont été transfectées avec un siRNA contrôlé (siCt) ou un siRNA dirigé contre Cdc20. Les cellules ont ensuite été récupérées aux temps indiqués, marquées à l’iodure de propidium et avec un anticorps dirigé contre MPM-2. Enfin, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux via un double marquage IP/MPM-2.**

la récolte des cellules 24, 48 et 72 heures après transfection. Nous pouvons observer l’efficacité fonctionnelle de l’extinction de Cdc20 qui augmente la population 4n/MPM-2+, représentant les cellules en arrêt mitotique, dans les trois lignées testées. En moyenne, la population 4n/MPM-2+ passe de moins de 2 % (en conditions normales) à un peu plus de 50 % 48 heures après transfection. Nous observons également que le nombre de cellules mitotiques augmente au cours du temps ; c’est dans la lignée CAL-51 que cela est le plus visible. Toujours au cours du temps, on peut voir que la population mitotique ne diminue pas, excepté dans le cas des cellules MCF-7 à 72 heures. Cette expérience suggère que l’extinction de Cdc20 induit une accumulation des cellules en arrêt mitotique, et que cette arrêt mitotique n’aboutit pas à de l’échappement sur la durée de l’expérience. Cette interprétation ne peut rigoureusement pas être appliquée à la lignée MCF-7, du fait de la diminution à 72 heures. Cependant l’échappement des cellules MCF-7 à l’arrêt mitotique ne peut être conclu, car la mort mitotique pourrait produire le même résultat, *i.e* une diminution de la population mitotique en faveur des deux autres.

## 1.2 L'extinction de Cdc20 induit un arrêt mitotique soutenu et le paclitaxel un arrêt mitotique transitoire

Nous avons ensuite voulu comparer l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 à celui induit par le paclitaxel. Il a été montré que de fortes concentrations en paclitaxel pouvait induire un regroupement des microtubules en paquets, et ainsi provoquer la mort indépendamment d'une action sur le point de contrôle mitotique [76]. Les toxicités de différentes concentrations en paclitaxel ont donc été évaluées sur les quatre lignées précédentes (Figure 1.3). Pour cela un marquage de l'APO2.7 (épitope mi-



**FIGURE 1.3 – Détermination d'une concentration minimale de paclitaxel.** Les cellules MDA-MB-231, CAL-51, MCF-7, HeLa ont été traitées au paclitaxel aux concentrations indiquées. Les cellules ont ensuite été récupérées à 24 h, marquées pour l'APO2.7, et analysées par cytométrie en flux.

tochondrial exposé lors de l'apoptose) a été réalisé après 48 h de traitement à des concentrations croissantes de paclitaxel, et analysé par cytométrie en flux. Dans le cas des lignées MDA-MB-231 et CAL-51, les réponses sont semblables. Ces deux lignées ne sont marquées qu'à la plus forte concentration de paclitaxel (70 µmol/l), et le sont de manière équivalente (environ 50 %). La lignée HeLa semble plus

sensible, c'est la seule dont le marquage augmente à 7  $\mu\text{mol/l}$ . Enfin la lignée MCF-7 reste très peu marquée quelque soit la concentration. Faire référence à de « faibles » concentrations en paclitaxel désigne généralement les concentrations inférieures à 20 nmol/l [76]. Dans nos expériences, 70 nmol/l était la concentration la plus basse permettant d'obtenir une proportion optimale de cellules 4n/MPM-2+, c'est à dire environ 30 % (données non montrées). C'est cette concentration qui a été utilisée par la suite.

Afin de comparer l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 à celui induit par le paclitaxel, un co-marquage IP/MPM-2 a été réalisé dans ces deux conditions sur la lignée MDA-MB-231, à 24, 48 et 72 heures (Figure 1.4). Sous extinction de Cdc20, les résultats sont similaires à ceux de la première

(a) Analyse de l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 dans la lignée MDA-MB-231

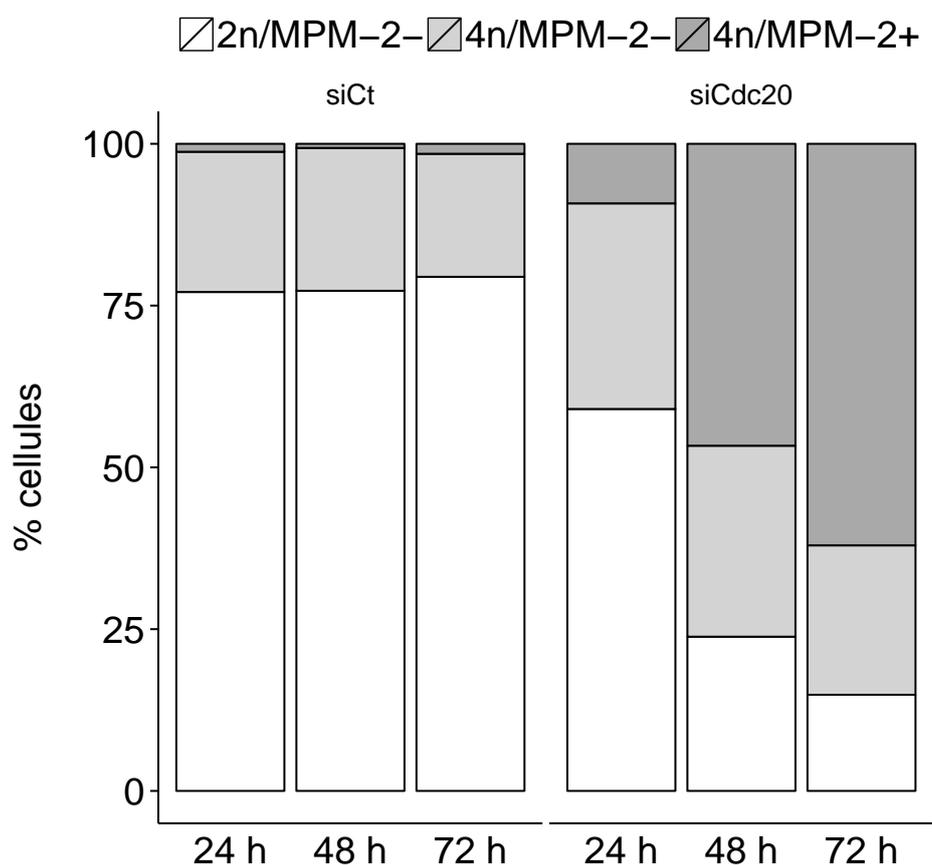
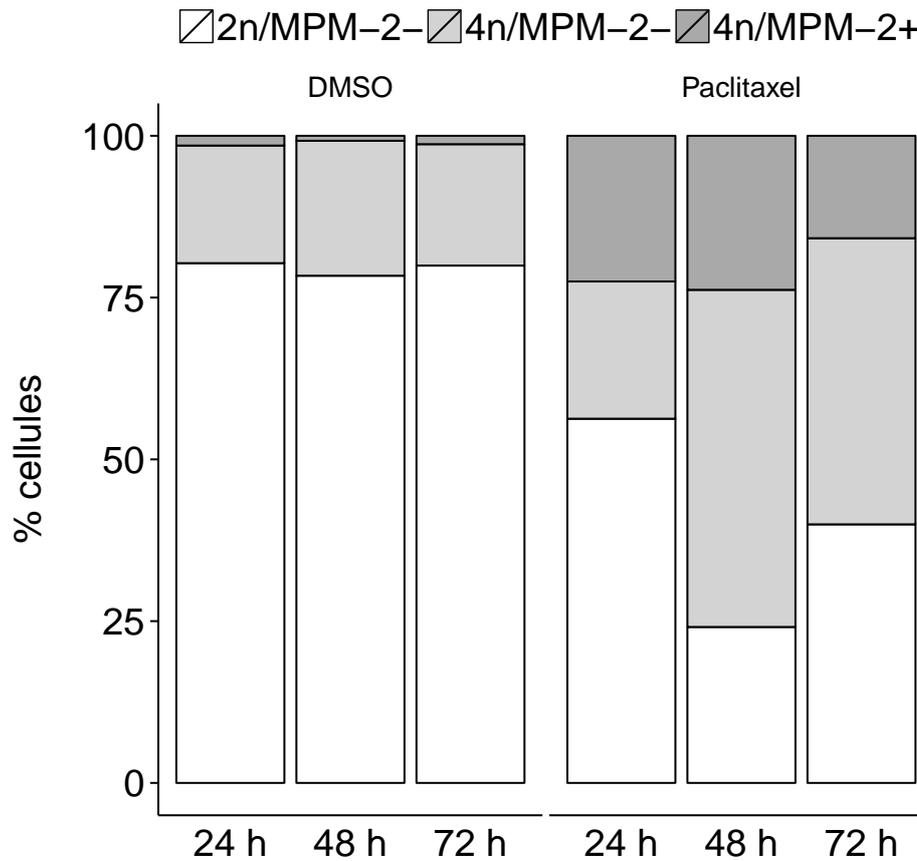


FIGURE 1.4 – L'extinction de Cdc20 provoque un arrêt mitotique plus durable que le traitement par le paclitaxel.

expérience (Figure 1.4a). La réponse des cellules au paclitaxel est quant à elle différente de celle à l'extinction de Cdc20 (Figure 1.4b). D'une part, nous pouvons voir que le nombre de cellules en mitose est moins élevé sous paclitaxel (20 % en moyenne), et ceci à tous les temps de récupération. D'autre part,

(b) Analyse de l'arrêt mitotique induit par le traitement au paclitaxel



**FIGURE 1.4 – L'extinction de Cdc20 provoque un arrêt mitotique plus durable que le traitement par le paclitaxel (suite).** Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCt) ou un siRNA dirigé contre Cdc20 (a). Alternativement, les cellules ont été traitées au paclitaxel (70 nmol/l), le DMSO faisant office de contrôle (b). Les cellules ont ensuite été récupérées aux temps indiqués, marquées à l'iodure de propidium et avec un anticorps dirigé contre MPM-2. Enfin, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux.

nous pouvons voir que la population mitotique diminue avec le temps, ici à 72 heures. Ces résultats suggèrent que dans la lignée MDA-MB-231, et à l'inverse de l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20, l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel est transitoire, et aboutit à un échappement des cellules à 72 h.

## 1.3 L'arrêt mitotique induit par Cdc20 aboutit à la mort cellulaire partielle

Après nous être assurés de l'induction de l'arrêt mitotique par l'extinction de Cdc20 et le traitement au paclitaxel, nous nous sommes intéressés à la toxicité des ces deux types d'arrêt sur les cellules. L'épitope 7A6 est un épitope mitochondrial utilisé pour détecter l'apoptose, car il est exposé durant ses stades précoces [238]. La fiabilité de l'utilisation de l'expression du 7A6 en tant que marqueur d'apoptose est actuellement discutée. Il a en effet été montré que l'exposition du 7A6 ne nécessiterait pas la rupture du potentiel de membrane mitochondriale, mais serait plutôt due à l'activation des caspases et à la détérioration subséquente de la mitochondrie par ces dernières [239]. À l'inverse, une autre équipe a montré que l'exposition du 7A6 n'était pas influencée par l'inhibition des caspases via le Q-VD-OPh (Quinoline-Valine-Asparatate(D)-O-phenoxy) [240]. L'expression du 7A6 reste néanmoins utilisée pour la détection d'un mécanisme actif de mort, et c'est pour cette raison qu'elle reste courante de nos jours, grâce à l'anticorps APO2.7. L'utilisation de cet anticorps peut être faite avec ou sans perméabilisation préalable des cellules. La perméabilisation est censée permettre la détection de l'apoptose précoce, car elle lui donne accès à son épitope. Elle ne doit cependant pas être trop importante au risque de toucher également la membrane externe de la mitochondrie, et demande donc une utilisation fine du détergent souvent dépendante du type cellulaire. L'absence de perméabilisation permet quant à elle de détecter l'apoptose tardive, et c'est cette méthode que nous avons utilisé. Ainsi, un marquage de l'épitope 7A6 par l'anticorps APO2.7 a été réalisé sur les lignées cellulaires MDA-MB-231, CAL-51, MCF-7 et HeLa (Figure 1.5). Dans cette expérience, les cellules ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre Cdc20, puis récupérées à 24, 48, 72 et 96 heures pour être immuno-marquées. Nous pouvons constater que l'extinction de Cdc20 induit une augmentation du marquage dans les quatre lignées au cours du temps. Les pourcentages de cellules marquées sont semblables dans les lignées MDA-MB-231, CAL-51 et HeLa. Le marquage des cellules MCF-7 est lui bien moindre. Cela pourrait être expliqué par le fait que la lignée MCF-7 présente une délétion sur le gène de la caspase-3 [241]. Combinés avec les précédents, ces résultats suggèrent que l'extinction de Cdc20 induit la mort mitotique des cellules sur lesquelles elle a été réalisée. Nous ne pouvons cependant pas qualifier cette mort de processus apoptotique sur la base du seul marquage du 7A6, et nous avons tenté de mieux la caractériser, comme nous le verrons par la suite.

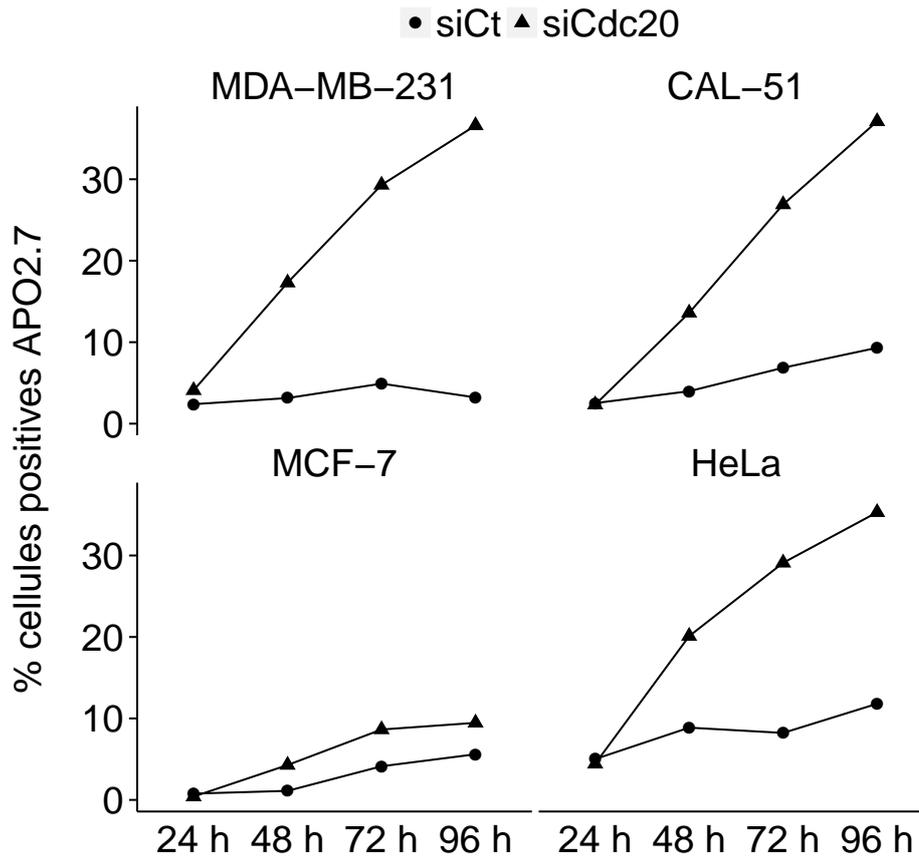


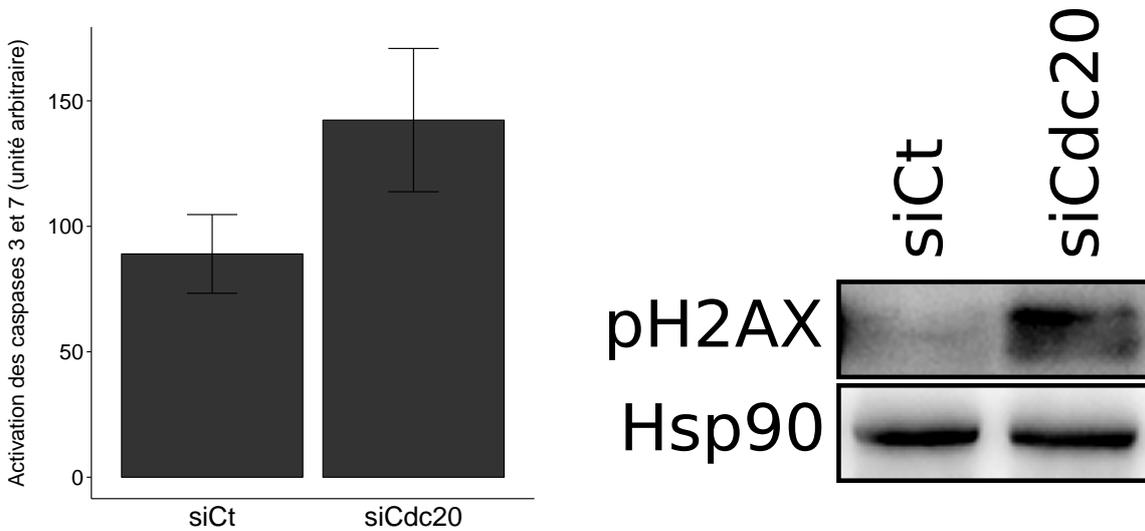
FIGURE 1.5 – L'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 aboutit à la mort cellulaire. Les cellules MDA-MB-231, CAL-51, MCF-7 et HeLa ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCt) ou un siRNA dirigé contre Cdc20. Les cellules ont ensuite été récupérées aux temps indiqués et marquées à l'APO2.7. Enfin, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux.

## 1.4 L'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 provoque une mort indépendante des caspases

Nous avons ensuite voulu déterminer si l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 induisait l'activation des caspases (Figure 1.6). Des cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec un siRNA contrôle, ou un siRNA dirigé contre Cdc20. Ces cellules ont été récupérées 48 heures plus tard, et une analyse de l'activation de la caspase-3 et la caspase-7 (Cysteine protease cleaving after asp 7) a été réalisée (Figure 1.6a). Nous avons pu ainsi constater que l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 provoquait une activation des deux caspases citées précédemment.

De manière intéressante, il a été suggéré que la mort mitotique pouvait être due à l'accumulation de dommages de l'ADN pendant la mitose [93]. Il avait déjà été suggéré que l'extrême condensation du matériel génétique pendant la mitose pouvait induire des dommages spontanés favorisant ainsi le

(a) Analyse de l'activation des caspases suite à l'extinction de Cdc20 (b) Analyse de l'expression de pH2AX suite à l'extinction de Cdc20



(c) Analyse de l'influence des caspases sur la mort induite par l'extinction de Cdc20

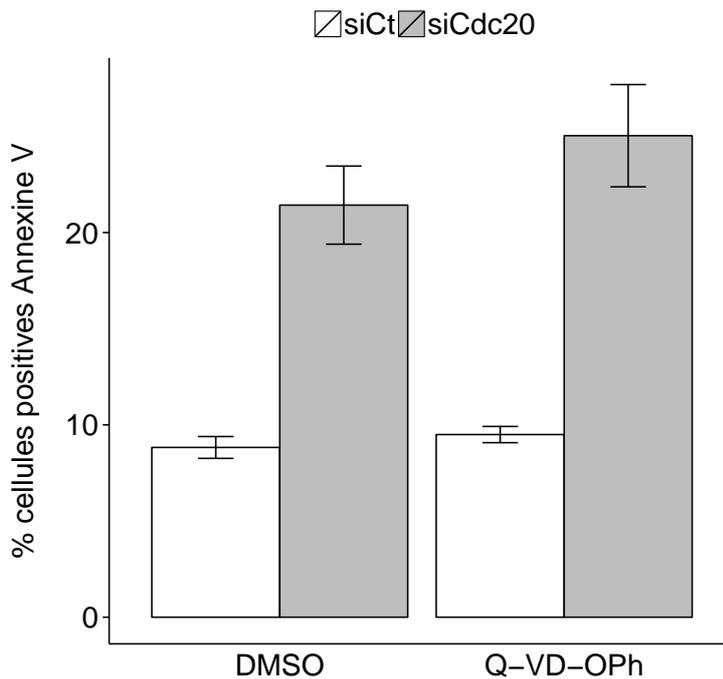


FIGURE 1.6 – L'arrêt mitotique induit une mort indépendante des caspases. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCt), ou un siRNA dirigé contre Cdc20. Après 48h, les cellules ont été récupérées, et une analyse de l'activation de la caspase-3, et de la caspase-7 a été réalisée (a). Alternative-ment une analyse de l'expression de pH2AX (sérine 139) a été effectuée (b). (c) Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec un siCt, ou un siCdc20, en présence ou non de Q-VD-OPh (5 µmol/l). Les cellules ont été récupérées 48h plus tard, immunomarquées pour l'annexine V, et analysées par cytométrie en flux.

## 1.4 L'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 provoque une mort indépendante des caspases

stress mitotique. De là, un arrêt mitotique prolongé pouvait induire une accumulation des dommages et déclencher l'apoptose après échappement. L'équipe de Timothy Mitchison est allée plus loin en montrant que ces dommages de l'ADN peuvent être générés de manière active pendant la mitose via CAD, dont l'activation dépend de la dégradation d'ICAD (Inhibitor of CAD) par les caspases [93]. Nous avons donc recherché si l'extinction de Cdc20 induisait des dommages de l'ADN. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec un si (Small interfering) Ct ou un siCdc20 pendant 48 heures, puis analysées, par immunoblot, pour l'expression de p<sup>H</sup>2AX (Phosphorylated histone 2AX) (sérine 139) (Figure 1.6b). Nous avons observé que l'extinction de Cdc20 induisait un marquage significatif de p<sup>H</sup>2AX comparé à la condition contrôle. Cette observation soutient le fait qu'une activation des caspases se produit suite pendant l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20.

Suite à cela, nous avons voulu déterminer si cette activation des caspases était impliquée dans la mort induite par l'extinction de Cdc20. En effet dans certains cas, l'activation des caspases peut être sub létale, autrement dit une activation tolérée par la cellule et n'induisant pas la mort. C'est effectivement ce que nous avons observé. Des cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec un siCt ou un siCdc20, pendant 48 heures, en présence ou non de l'inhibiteur pan-caspase Q-VD-OPh. Un marquage de l'annexine V a ensuite été réalisé, et les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (Figure 1.6c). Les résultats montrent que l'extinction de Cdc20 induit la mort, mais que cette dernière n'est pas inhibée le Q-VD-OPh.

L'ensemble de ces résultats indiquent que l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 provoque une activation sub létale des caspases, et une mort indépendante des caspases.

## Chapitre 2

# Implication des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 dans l'arrêt mitotique

### 2.1 L'arrêt mitotique module l'amorçage cellulaire et révèle une dépendance à Bcl-x<sub>L</sub>

Nous avons établi que l'extinction de Cdc20 induit la mort mitotique des cellules. Les protéines de la famille Bcl-2 sont des régulateurs majeurs de l'apoptose. Elles régulent la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie par un réseau complexe d'interactions via un domaine spécialisé, le domaine BH3. Fonctionnellement, les protéines de cette famille sont généralement catégorisées en anti-apoptotiques, effectrices, activatrices, et sensibilisatrices. Plus précisément, les effectrices possèdent la capacité de former des pores dans la membrane externe de la mitochondrie, et c'est la fonction des anti-apoptotiques que de les en empêcher. S'ajoute à cela un niveau « supérieur » de régulation formé par les activatrices, qui sont en mesure d'inhiber les anti-apoptotiques, ou d'activer directement les pro-apoptotiques. Le rôle des sensibilisatrices est quant à lui moins bien défini. Ceci étant posé, nous avons logiquement voulu déterminer si cette famille de protéines était impliquée dans la mort que nous observons suite à l'extinction de Cdc20. Pour cela, nous avons utilisé la technique du profilage BH3 [242].

La méthode du profilage BH3 est indissociable du concept d'amorçage (« priming »). Plus précisément, l'idée est qu'un réseau mitochondrial amorcé, et par extension une cellule amorcée, répondra de manière plus robuste à une stimulation apoptotique [243]. Elle sera en quelque sorte plus disposée à s'engager dans une voie d'apoptose, et donc répondra mieux aux composés de chimiothérapie. Ce concept est actuellement incontournable dans l'étude de l'apoptose, car il est intimement lié à la clinique, et a donc des applications directes. L'évaluation de l'amorçage de cellules de patients pourrait en effet aider à prédire la réponse à la chimiothérapie [244].

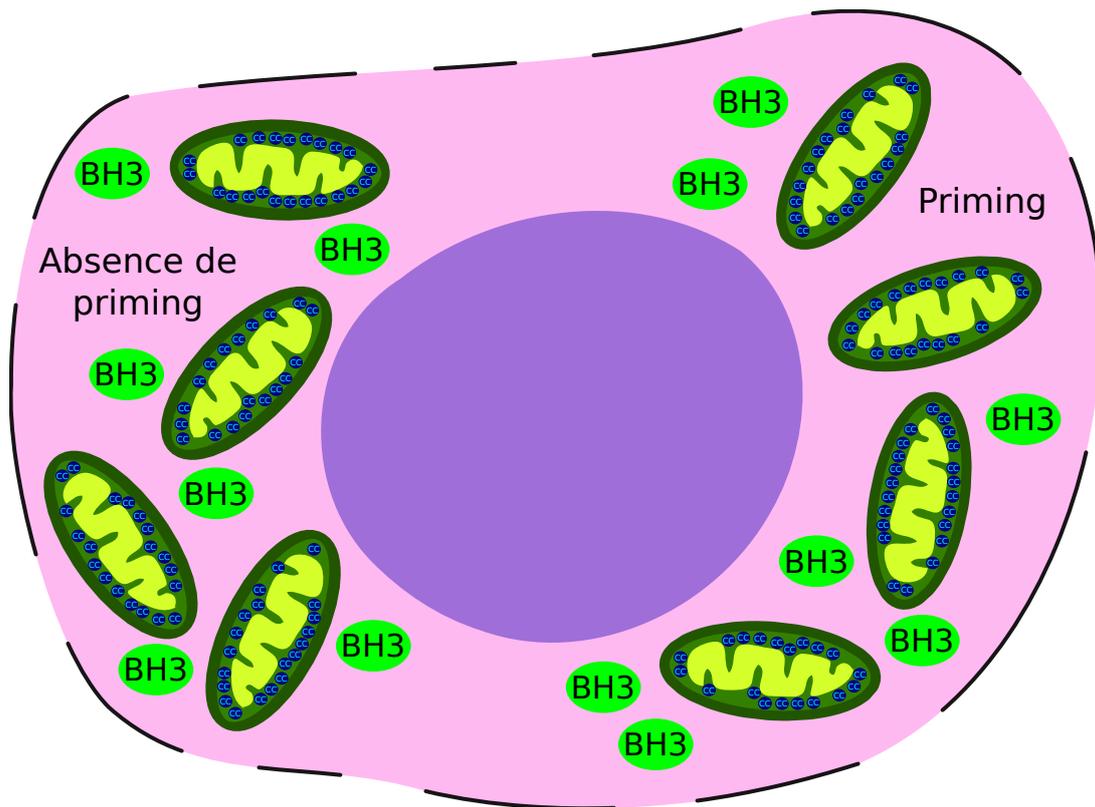
Expérimentalement, l'amorçage des cellules se traduit par une sensibilité accrue aux peptides activateurs ou sensibilisateurs issus des protéines de la famille de Bcl-2. Ainsi, le profilage BH3 s'attache à déterminer si une population cellulaire est sensible à une batterie de peptides. Ces peptides sont issus des domaines BH3 des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 capables d'interagir avec Bax ou Bak. La sensibilité est quant à elle quantifiée par immuno-marquage du cytochrome *c*. Les grandes étapes de la technique sont illustrées dans la figure 2.1. Les cellules subissent une première perméabilisation, qui a pour but de détériorer uniquement la membrane plasmique, permettre l'entrée des peptides (Figure 2.1a). Les cellules sont ensuite mises en contact avec les peptides BH3. S'il y a amorçage, et que les cellules sont sensibles au peptide BH3 d'intérêt, cette étape va induire la MOMP, et le cytochrome *c* sera libéré. À l'inverse, s'il n'y a pas d'amorçage, les mitochondries resteront intactes et conserveront leur cytochrome *c*. S'ensuit une étape de lavage et de fixation, puis l'immunomarquage du cytochrome *c* est effectué (Figure 2.1b), et les cellules sont lavées et fixées de nouveau (Figure 2.1c). Enfin, l'analyse par cytométrie en flux permet de déterminer l'absence, ou la présence d'amorçage. L'absence d'amorçage sera caractérisée par une positivité du marquage (Figure 2.1d), car il n'y aura pas eu perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, l'amorçage sera caractérisé par une négativité du marquage (Figure 2.1e), car les cellules auront perdu leur cytochrome *c*. La variable analysée est donc un **pourcentage de perte du cytochrome *c***, qui est obtenue par normalisation (cf. la partie matériel et méthode pour le calcul) à l'aide de deux contrôles :

- négatif : une forme inactive du peptide BH3 de Puma, Puma2A, qui n'induit pas la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. Ceci représente la condition où le marquage est le plus fort (Figure 2.1d), c'est à dire où il y a 0 % de perte du cytochrome *c*, sa valeur est donc à 0 ;
- positif : le contrôle isotypique de l'anticorps, qui simule une absence de marquage (Figure 2.1e), et donc 100 % de perte du cytochrome *c*. Il permet de retirer le bruit de fond, et sa valeur est à 1.

De cette manière, le profilage BH3 permet de savoir si une population cellulaire est amorcée pour l'apoptose. Et, en confrontant le profil au tableau du réseau d'interactions des peptides avec les protéines de la famille de Bcl-2 (Tableau 2.1), il est aussi possible de déterminer l'importance de telle ou telle protéine anti-apoptotique.

Afin de savoir si l'arrêt mitotique avait des effets sur l'amorçage des cellules, et aussi d'identifier de possibles acteurs anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, j'ai procédé à un profilage BH3 dans le laboratoire du Dr. Letai à Boston. Des cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des siCdc20 (Figure 2.2a), ou traitées au paclitaxel (Figure 2.2b), puis récupérées 48 heures après pour être profilées. Nous pouvons constater que les cellules MDA-MB-231 étaient amorcées en absence de traitement, car libé-

## (a) Perméabilisation et mise en contact avec les peptides BH3



## (b) Marquage du cytochrome c et fixation

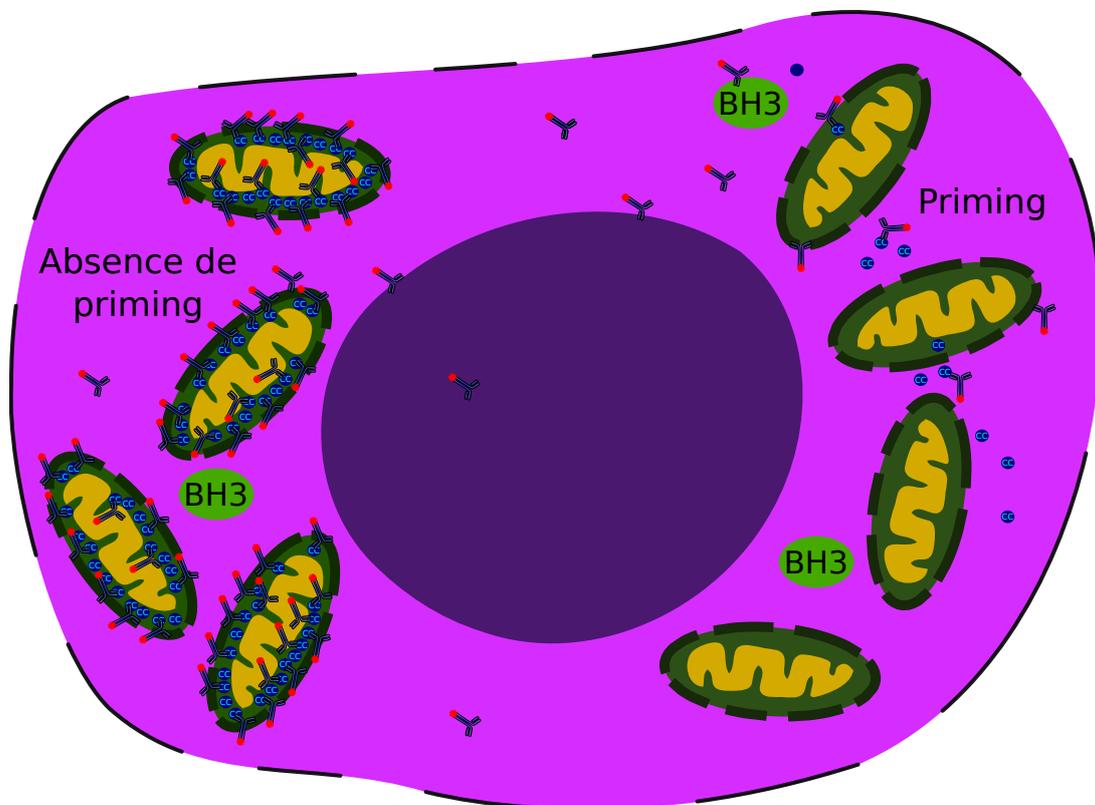
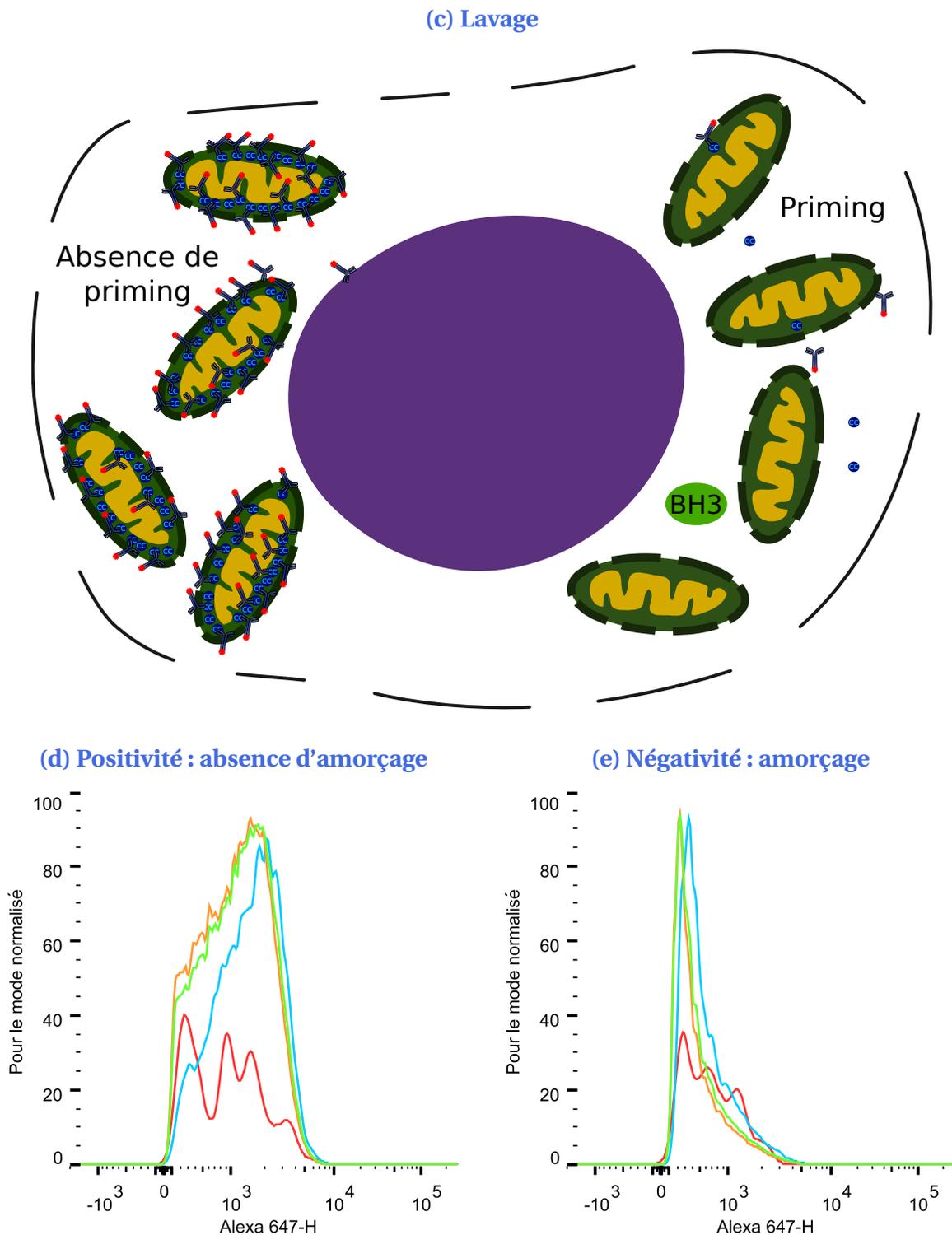


FIGURE 2.1 – Technique du profilage BH3.



**FIGURE 2.1 – Technique du profilage BH3.** Après récupération, les cellules subissent une perméabilisation de leur membrane plasmique, et sont mises en présence des peptides BH3 (a). Puis, après une première fixation, l'immunomarquage du cytochrome *c* est effectué (b). Enfin, les cellules sont lavées, de nouveau fixées, et analysées par cytométrie en flux. La positivité du marquage indique une absence d'amorçage (c), et la négativité indique la mise en place d'un amorçage (d).

rant du cytochrome *c* en réponse à la présence des peptides BH3 de Bid et Bim. L'extinction de Cdc20, et le traitement par le paclitaxel, n'amplifiaient par l'amorçage par rapport aux conditions contrôles.

	Activators		Sensitizers					
	BIM	BID	BAD	BIK	NOXA	HRK	PUMA	BMF
BCL-2	Red	Red	Red	Yellow	Green	Green	Red	Red
BCL-XL	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red
BCL-w	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red
MCL-1	Red	Red	Green	Yellow	Red	Green	Red	Red
BFL-1	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Green

**Tableau 2.1 – Réseau d'interactions entre les peptides BH3 et les protéines de la famille de Bcl-2.**

Néanmoins, nous avons pu constater que ces deux traitements modulaient le profil des cellules de manière semblable. En effet, dans les deux cas les peptides BH3 de Bad et Hrk augmentent la libération de cytochrome *c* par rapport à la condition contrôle. Cependant, il est notable de constater que la réponse au peptide issu d'Hrk est plus importante dans le cas de l'extinction de Cdc20. Le peptide BH3 de Puma augmentent également la libération de cytochrome *c*, mais uniquement dans le cas de l'extinction de Cdc20. Enfin, la sensibilité au peptide BH3 d'Hrk suggère une implication de Bcl-x<sub>L</sub>, Hrk n'étant censé interagir qu'avec ce dernier (Tableau 2.1) [243].

Ces données suggèrent que l'arrêt mitotique n'amorce pas strictement les cellules de la lignée MDA-MB-231, car nous n'observons pas de réponse aux peptides issus de Bim et Bid qui sont les seuls activateurs directs. Nous pouvons néanmoins conclure que l'arrêt mitotique modifie le profil de sensibilité aux peptides issus des BH3-only. Le traitement par le paclitaxel présente la même tendance que l'extinction de Cdc20 (Figure 2.2b). Ces résultats étant issus d'expériences réalisées sur l'ensemble des cellules transfectées ou traitées, nous avons tenté de séparer les cellules en arrêt mitotique des autres par « shake-off », afin de gagner en sensibilité. Cependant une qualité suffisante de séparation n'a pu être atteinte pour permettre une analyse par profilage.

## 2.2 Dans un contexte d'arrêt mitotique, les extinctions de Bcl-x<sub>L</sub> ou Mcl-1 convertissent la mort en apoptose classique (« switch »)

Dans le but de confronter les résultats du profilage BH3 à des preuves fonctionnelles, nous avons décidé d'évaluer l'effet de la déplétion des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 pendant l'arrêt mitotique. Les lignées MDA-MB-231, CAL-51 et HeLa ont été transfectées avec des siRNA dirigés contre Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 (Figure 2.3). Nous avons pu observer que les trois extinctions étaient effectives dans les trois lignées. En outre, cette expérience permet de visualiser les différences d'expression des lignées entre elles pour les trois protéines. Il en ressort que les cellules MDA-MB-231 expriment for-

(a) Profilage BH3 des cellules MDA-MB-231 suite à l'extinction de siCdc20

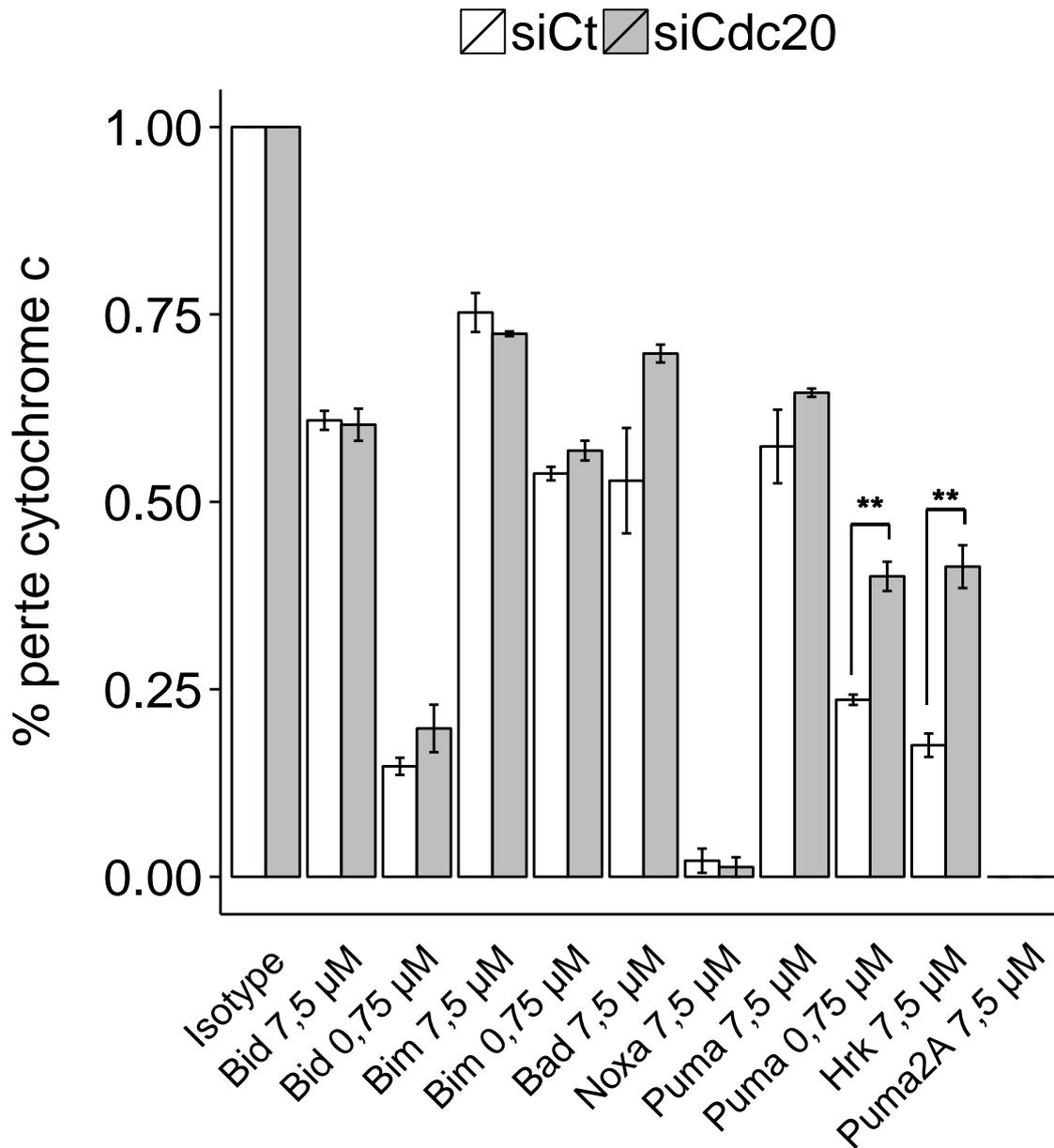
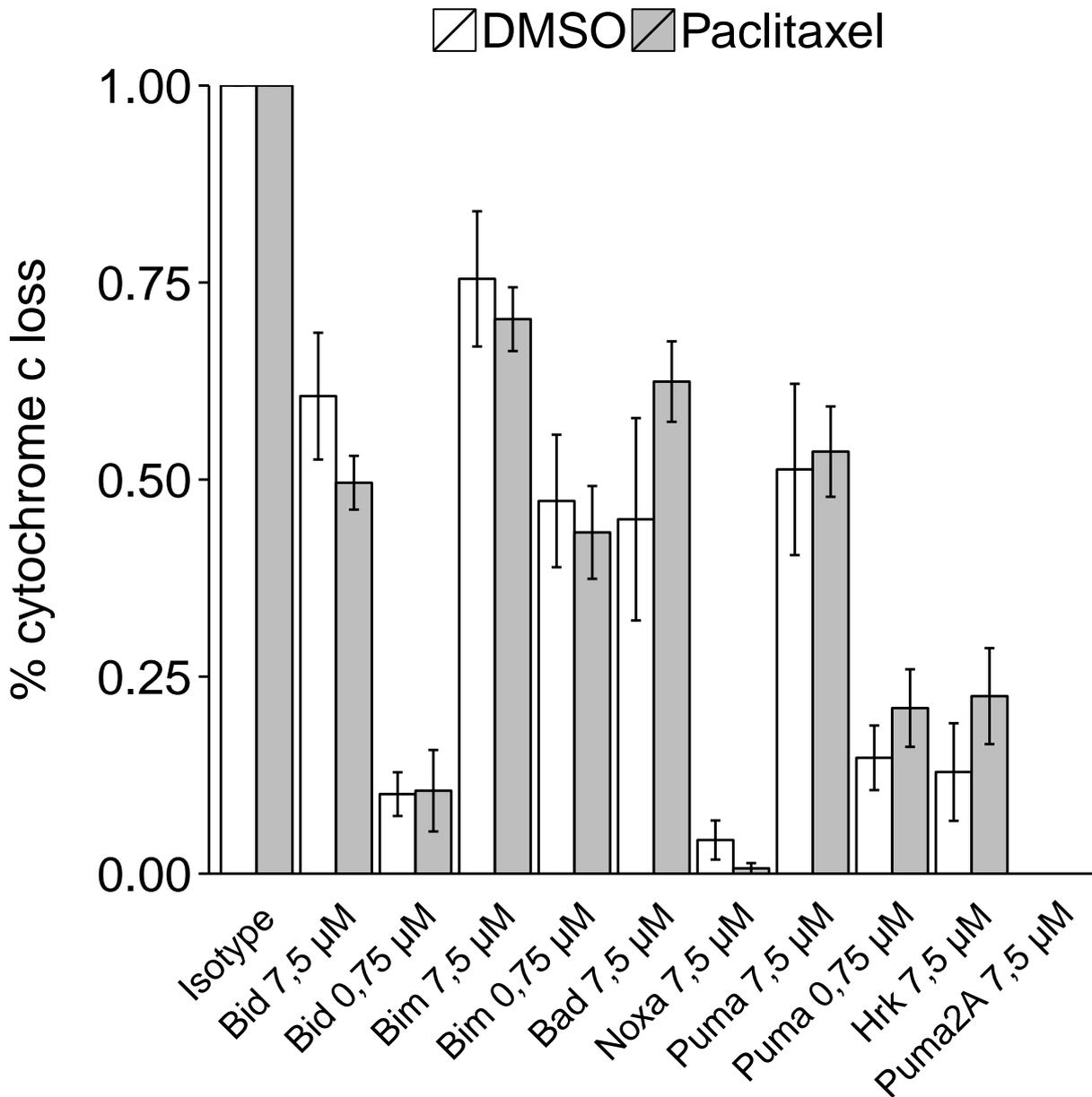


FIGURE 2.2 – L'arrêt mitotique promeut l'amorçage des cellules MDA-MB-231.

tement Bcl-x<sub>L</sub>, mais n'expriment que faiblement Bcl-2 et Mcl-1. Les cellules HeLa n'expriment que très peu Bcl-x<sub>L</sub>, mais expriment très fortement Mcl-1. Enfin la lignée CAL-51 exprime très fortement Bcl-x<sub>L</sub>.

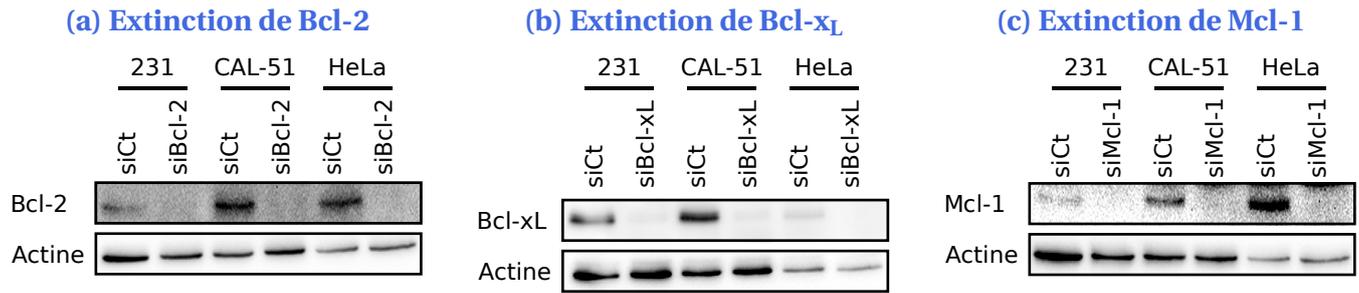
Suite à cela, les lignées MDA-MB-231 et CAL-51 ont d'abord été transfectées avec des siBcl-2, siBcl-x<sub>L</sub> et siMcl-1 (Figure 2.4). Puis, 24 heures plus tard, les cellules ont été transfectées avec un siCdc20, ou avec un siCt, en présence ou non de l'inhibiteur pan-caspase Q-VD-OPh. Les cellules ont été récoltées 48 heures après transfection et un marquage de la phosphatidylsérine par l'annexine V a été réalisé pour

(b) Profilage BH3 des cellules MDA-MB-231 suite au traitement par le paclitaxel



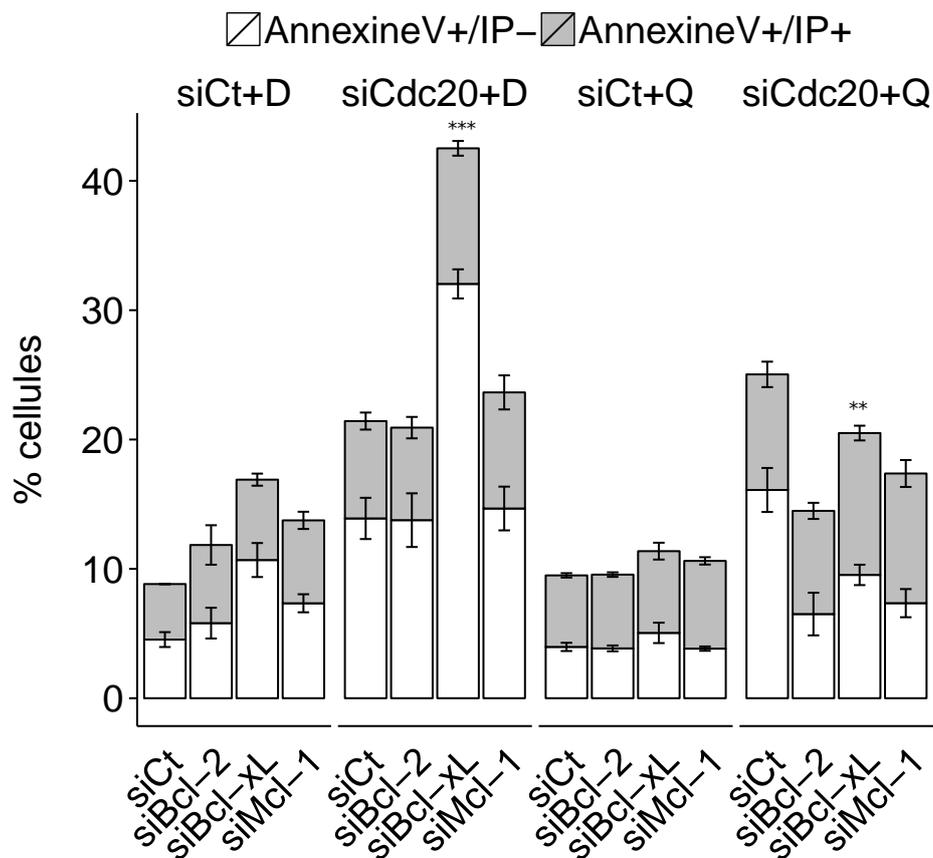
**FIGURE 2.2 – L'arrêt mitotique promeut l'amorçage des cellules MDA-MB-231 (suite).** Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCt) ou un siRNA dirigé contre Cdc20 (a). Alternative-ment, les cellules ont été traitées au paclitaxel (70 nmol/l), le DMSO faisant office de contrôle (b). Après 48 h les cellules ont été récupérées, mises en contact avec les peptides, puis marquées pour le cytochrome c avant analyse par cytométrie en flux. Test de student bilatéral, \*\*\*, \*\* et \* correspondent respectivement à des valeurs p inférieures à 0,001, 0,01, et 0,05.

détecter l'apoptose. Le marquage de l'annexine V est en effet classique pour la détection de l'apoptose, apoptose durant laquelle la rupture de flux membranaire permanent induit une externalisation de la phosphatidylsérine sur la membrane plasmique. Nous avons combiné ce marquage avec un second par



**FIGURE 2.3 – Extinction de Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 par ARN interférence.** Les cellules MDA-MB-231, CAL-51 et HeLa ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCt) ou un siRNA dirigé contre Bcl-2 (a), Bcl-x<sub>L</sub> (b) ou Mcl-1 (c). Les cellules ont été récupérées 48 h plus tard, et les niveaux d'expression ont été évalués par immunoblot.

**(a) Analyse de l'influence des anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 sur la mort induite par l'extinction de Cdc20, dans les cellules MDA-MB-231**



**FIGURE 2.4 – Les extinctions de Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 sensibilisent les cellules à la mort induite par l'extinction de Cdc20.** "D" : DMSO, "Q" : Q-VD-OPh.

(b) Analyse de l'influence des anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 sur la mort induite par l'extinction de Cdc20, dans les cellules CAL-51

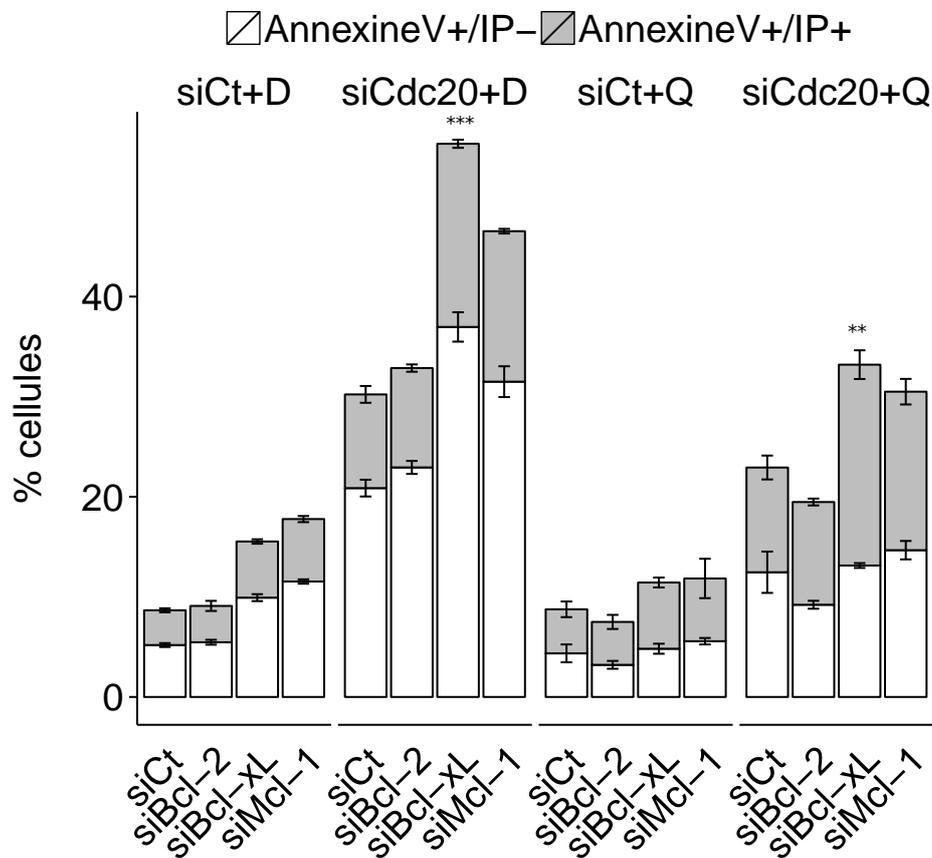


FIGURE 2.4 – Les extinctions de Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 sensibilisent les cellules à la mort induite par l'extinction de Cdc20 (suite). Les lignées MDA-MB-231 (a) et CAL-51 (b) ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCt) ou un siRNA dirigé contre Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> ou Mcl-1. 24 heures plus tard les cellules ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCt) ou un siRNA dirigé contre Cdc20 et traitées au Q-VD-OPh ("Q", 5 μmol/l) ou au DMSO ("D"). Les cellules ont été récupérées 48 h plus tard, marquées à l'Annexine V et à l'iodure de propidium, pour enfin être analysées par cytométrie en flux. Test de student bilatéral, \*\*\*, \*\* et \* correspondent respectivement à des valeurs p inférieurs à 0,001, 0,01, et 0,05.

l'iodure de propidium afin de détecter la perméabilisation membranaire, et donc l'apoptose tardive.

Nous avons observé des réponses différentes entre les deux lignées. La lignée MDA-MB-231 est exclusivement sensible à la déplétion de Bcl-x<sub>L</sub> qui entraîne une forte augmentation de la mort induite par l'arrêt mitotique (Figure 2.4a), mort dont il est important de préciser qu'elle est principalement constituée d'un marquage positif pour l'annexine V et négatif pour l'iodure de propidium. La lignée CAL-51 est elle aussi sensible à la déplétion de Bcl-x<sub>L</sub> en arrêt mitotique, mais également à celle de Mcl-1, et dans des valeurs comparables (Figure 2.4b). Les mêmes dépendances sont observables en absence de

synchronisation. En effet, en absence de traitement, les extinctions de Bcl-x<sub>L</sub> pour les MDA-MB-231, et de Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 pour les CAL-51, induisent la mort des cellules.

Il est intéressant de constater que, sous déplétion de Cdc20, la mort accentuée par la déplétion de Bcl-x<sub>L</sub>, ou Mcl-1, est inhibée par le Q-VD-Oph alors que la mort induite par la déplétion de Cdc20 seul ne l'est pas. Cela suggère que la mort induite par l'arrêt mitotique seul est indépendante des caspases, mais qu'elle devient dépendante des caspases lorsqu'elle est accentuée par la déplétion de Bcl-x<sub>L</sub> ou Mcl-1.

La dépendance aux protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 a ensuite été testée durant l'arrêt mitotique partiel induit par le paclitaxel (Figure 2.5). La lignée MDA-MB-231 a été transfectée

(a) Analyse de l'influence des anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 sur la mort induite par le paclitaxel, dans les cellules MDA-MB-231

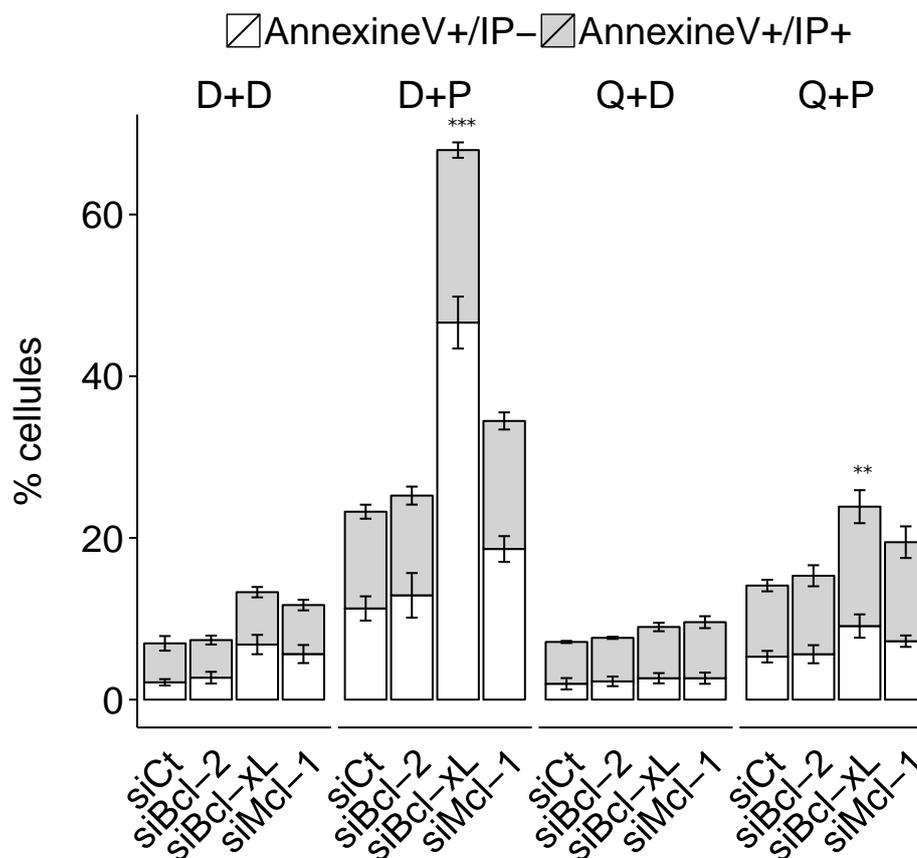
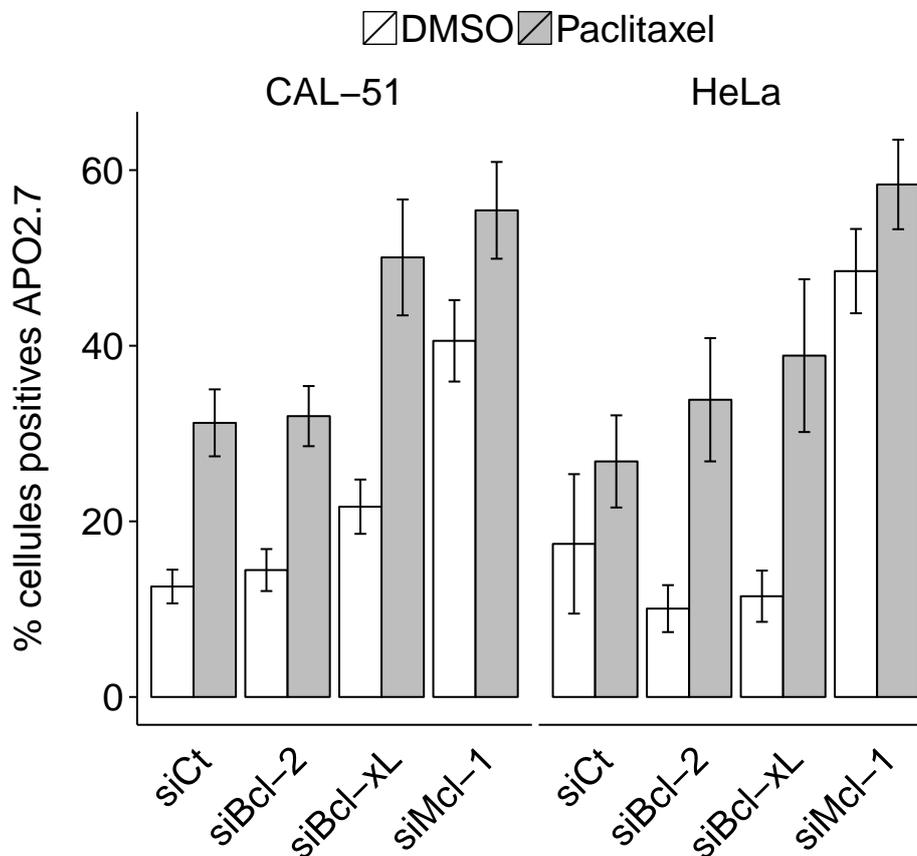


FIGURE 2.5 – Les extinctions de Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 sensibilisent les cellules à la mort induite par le paclitaxel. "D" : DMSO, "P" : Paclitaxel.

avec des siBcl-2, des siBcl-x<sub>L</sub> ou des siMcl-1, puis 24 heures après, traitée au paclitaxel et au Q-VD-Oph

(b) Analyse de l'influence des anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 sur la mort induite par le paclitaxel, dans les cellules CAL-51 et HeLa



**FIGURE 2.5 – Les extinctions de Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 sensibilisent les cellules à la mort induite par le paclitaxel (suite).** Les lignées MDA-MB-231 (a), CAL-51 et HeLa (b) ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCt) ou un siRNA dirigé contre Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> ou Mcl-1. 24 heures plus tard les cellules ont été traitées au DMSO ("D") ou au paclitaxel ("P", 70 nmol/l) et au Q-VD-OPh ("Q", 5 μmol/l) dans le cas de la lignée MDA-MB-231. Les cellules ont été récupérées 48 h plus tard, marquées à l'APO2.7, ou à l'Annexine V et à l'iodure de propidium, pour enfin être analysées par cytométrie en flux. Test de student bilatéral, \* \* \*, \* \* et \* correspondent respectivement à des valeurs p inférieurs à 0,001, 0,01, et 0,05.

pour une durée de 48 heures, pour enfin être marquée pour l'annexine V et à l'iodure de propidium (Figure 2.5a). Il est frappant de constater que les cellules MDA-MB-231 répondent de la même manière que lors d'un arrêt mitotique induit par la déplétion en Cdc20. Nous retrouvons la dépendance exclusive à Bcl-x<sub>L</sub>, ainsi que la dépendance aux caspases. Comme précédemment, la mort est principalement représentée par une population cellulaire positive pour l'annexine V et négative pour l'iodure de propidium. La même expérience a été réalisée sur les lignées CAL-51 et HeLa, et le marquage utilisé fut l'APO2.7 (Figure 2.5b). Nous retrouvons la double dépendance des CAL-51 à Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1. La lignée HeLa est plus sensible à l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel, et la mort qu'il provoque est poten-

tialisée par la déplétion de Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>. À noter que ces deux dernières lignées sont toutes deux très dépendantes à Mcl-1, mais d'une manière qui n'est pas dépendante du cycle.

Enfin, nous avons utilisé l'ABT-737 pour tester l'implication de Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> dans l'arrêt mitotique. L'ABT-737 est un inhibiteur chimique de Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>. Son mode d'action est de mimer le domaine BH3<sup>1</sup>, et ainsi d'inhiber les interactions entre les membres de la famille de Bcl-2. L'ABT-737 inhibe notamment les interactions de Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> avec Bax ou Bak. Cela libère Bax et Bak qui, sous réserve d'activation, sont alors libres de former des pores dans la membrane externe de la mitochondrie et d'induire l'apoptose.

Les cellules MDA-MB-231 ont été soit traitées au paclitaxel, soit transfectées avec des siCdc20 pendant 48 heures, en présence ou non d'ABT-737 ou de Q-VD-Oph (Figure 2.6). Les cellules ont finalement été récoltées, et marquées par l'annexine V et l'iodure de propidium. Les cellules répondent de la même manière aux deux types d'arrêt mitotique. La présence de l'ABT-737 potentialise la mort mitotique. Cette potentialisation s'effectue d'une manière dépendante des caspases, et la mort est toujours principalement représentée par une population de cellules positives pour l'annexine V et négative pour l'iodure de propidium. Les cellules sont également sensibles au traitement par l'ABT-737 en agent simple lorsque qu'il est suivi d'une transfection.

L'ensemble des résultats de ce chapitre concourent à démontrer l'implication de Bcl-x<sub>L</sub> au cours de l'arrêt mitotique. Ils suggèrent que l'arrêt mitotique seul provoque une mort partielle qui possède des caractéristiques apoptotiques, car elle est marquée Annexine V + / IP -, mais qui diffère de l'apoptose classique car elle n'est pas dépendante des caspases (Figure 2.4a). Cette mort peut être amplifiée, et convertie en apoptose classique dépendante des caspases par l'extinction de Bcl-x<sub>L</sub>, nous parlerons de « switch » apoptotique.

Nous ajouterons que dans le contexte d'une combinaison de l'arrêt mitotique avec un traitement par l'ABT-737, l'extinction de Cdc20 est plus efficace que le traitement par le paclitaxel (Figure 2.6). En effet les méthodes induisent des pourcentages semblables, or une transfection est moins efficace (cible moins de cellules) qu'un traitement par un composé chimique. Cette observation rejoint celle faite sur le maintien de l'arrêt mitotique, qui est plus fort dans le cas de l'extinction de Cdc20 et empêchant l'échappement. Les cellules seraient plus vulnérables en arrêt mitotique, qui est un état de haute fragilité, qu'après échappement.

---

1. L'ABT-737 présente un profil d'interaction similaire au domaine BH3 de Bad [245]

(a) Analyse de l'effet de l'ABT-737 sur la mort cellulaire induite par l'extinction de Cdc20

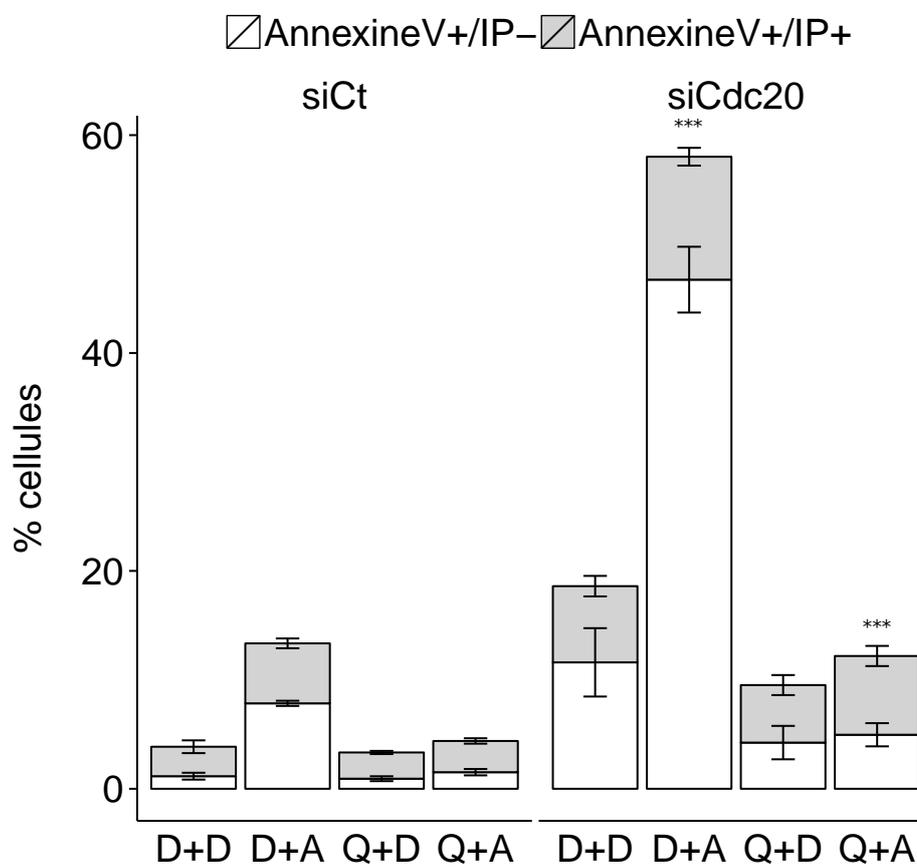


FIGURE 2.6 – L'ABT-737 mime les effets de l'extinction de Bcl-x<sub>L</sub> dans les cellules MDA-MB-231. "D" : DMSO, "A" : ABT-737, "Q" : Q-VD-OPh.

(b) Analyse de l'effet de l'ABT-737 sur la mort cellulaire induite par le paclitaxel

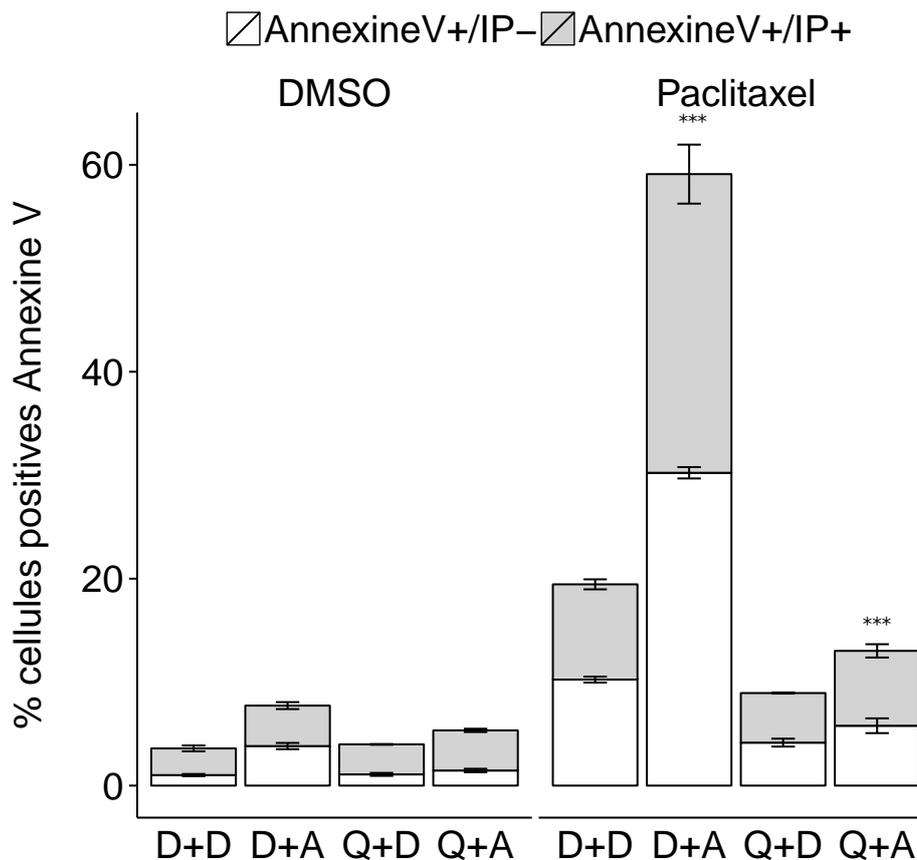


FIGURE 2.6 – L'ABT-737 mime les effets de l'extinction de Bcl-x<sub>L</sub> dans les cellules MDA-MB-231 (suite). Les cellules ont été transfectées avec un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre Cdc20 (a). Alternativement les cellules ont été traitées au DMSO ou au paclitaxel (70 nmol/l) (b). La transfection et le traitement par le paclitaxel ont été réalisés en présence ou non de Q-VD-OPh ("Q", 5 µmol/l), et d'ABT-737 ("A", 1 µmol/l). Les cellules ont été récupérées 48 h plus tard, marquées à l'Annexine V et à l'iodure de propidium, pour enfin être analysées par cytométrie en flux. Test de student bilatéral, \* \* \*, \*\* et \* correspondent respectivement à des valeurs p inférieures à 0,001, 0,01, et 0,05.

# Chapitre 3

## Bcl-x<sub>L</sub> protège la mort mitotique et de la mort post-échappement

### 3.1 Observation de la mort mitotique et de l'échappement à l'arrêt mitotique par vidéomicroscopie

L'implication de Bcl-x<sub>L</sub> dans l'arrêt mitotique ayant été établi précédemment, nous nous sommes intéressés à l'aspect cinétique de la mort mitotique. Dans ce but nous nous sommes tournés vers une approche par vidéomicroscopie (Figure 3.1). Cette approche a été rendue possible par l'utilisation de

#### (a) Double infection des cellules par des lentivecteurs : H2B-RFP et shRNA/GFP

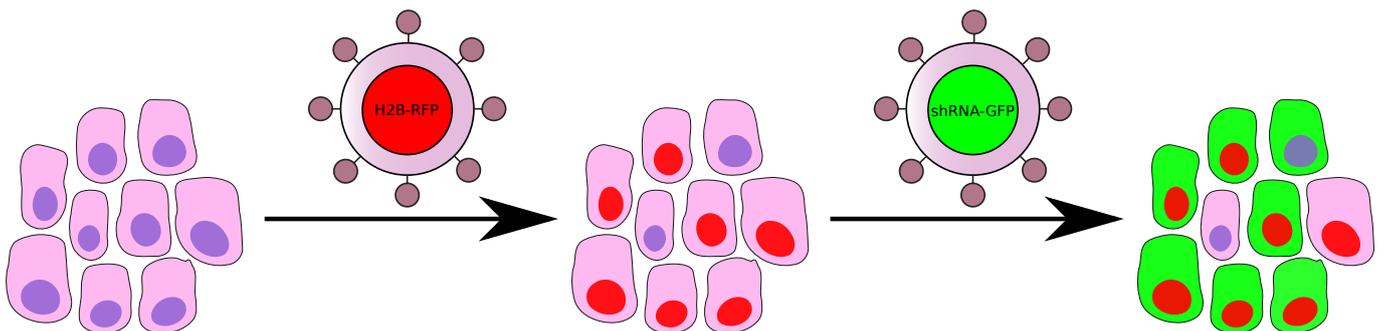
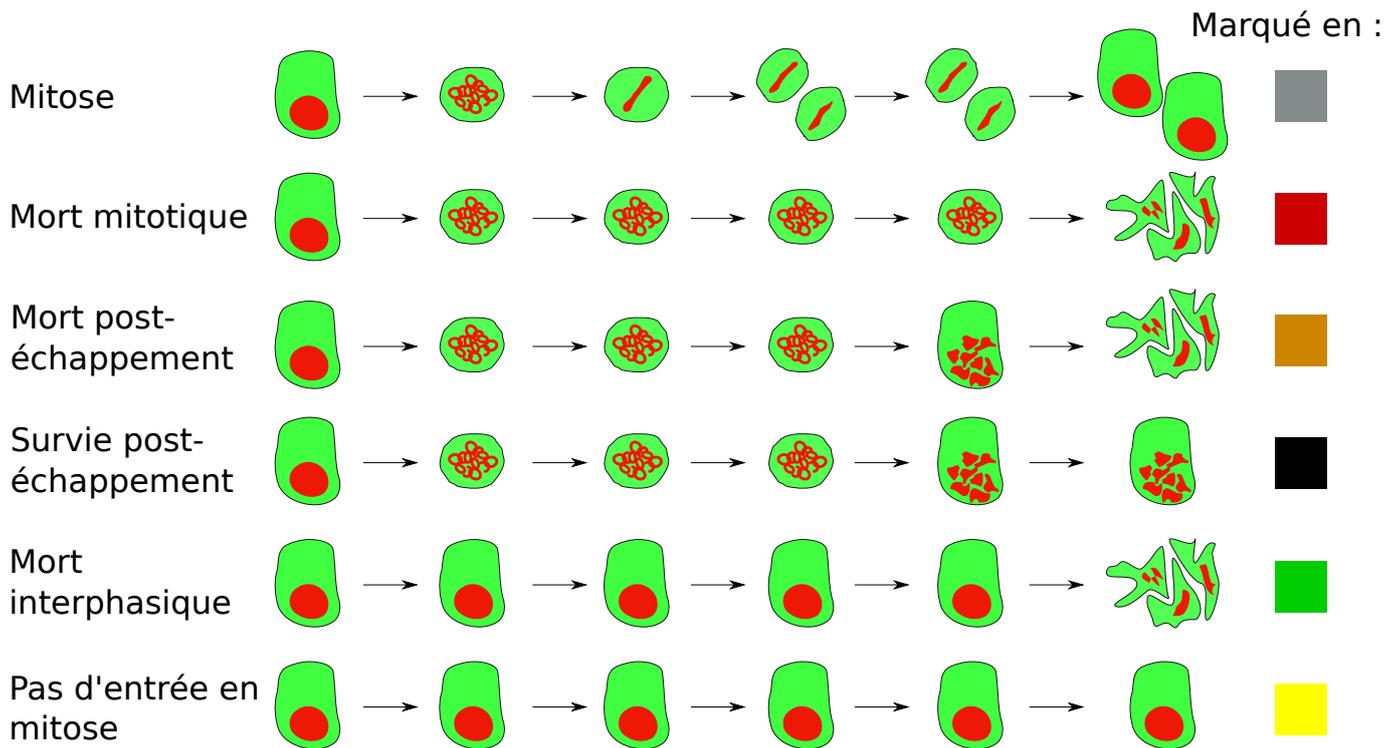


FIGURE 3.1 – Analyse du devenir cellulaire par vidéomicroscopie.

vecteurs lentiviraux codant pour l'histone H2B fusionnée à la RFP, et induisant un marquage fluorescent de la chromatine des cellules infectées (Figure 3.1a). Couplé à la vidéomicroscopie ce marquage permet la détection des mouvements chromatiniens, et par extension la distinction entre l'interphase et les différentes phases de la mitose. À partir de là, il devient donc aisé d'identifier les différents devenir cellulaire que sont notamment la mort, la mort mitotique et l'échappement à l'arrêt mitotique (Figure 3.1b). Nous pouvons définir ainsi les caractéristiques visuelles des différents devenir cellulaire :

(b) Caractéristiques visuelles des différents devenir cellulaires



**FIGURE 3.1 – Analyse du devenir cellulaire par vidéomicroscopie (suite).** (a) Les cellules sont séquentiellement infectées par un lentivecteur codant pour l'histone H2B fusionné à la RFP (H2B-RFP), permettant la visualisation des mouvements chromatiniens, et un lentivecteur codant pour un shRNA coexprimé avec la GFP, permettant lui de sélectionner les cellules dans lesquelles la protéine d'intérêt a été éteinte. (b) Les différents devenir cellulaires sont identifiables grâce à la forme de la cellule et aux phénomènes de condensation/décondensation du matériel génétique. La mitose est caractérisé par une condensation intense de l'ADN, et de là dérive l'identification de tous les devenir cellulaires représentés.

— Mitose :

1. arrondissement de la cellule et condensation courte de la chromatine ;
2. apparition de la plaque métaphasique ;
3. séparation du matériel génétique ;
4. formation des cellules filles ;
5. réaplatissement des cellules et décondensation de la chromatine. ;

— Mort mitotique :

1. arrondissement de la cellule et condensation longue de la chromatine ;
2. destruction de la cellules. ;

— Survie post-échappement :

1. arrondissement de la cellule et condensation longue de la chromatine ;

2. réapplatissement de la cellule sans division, décondensation de la chromatine, et apparition de micronoyaux ;
- Mort post-échappement : comme la survie post-échappement, mais suivie par la destruction de la cellule ;
- Mort interphasique : destruction de la cellule sans que soit apparue de condensation chromatique ;
- Pas d'entrée en mitose : absence d'activité visible pendant toute la durée de l'acquisition.

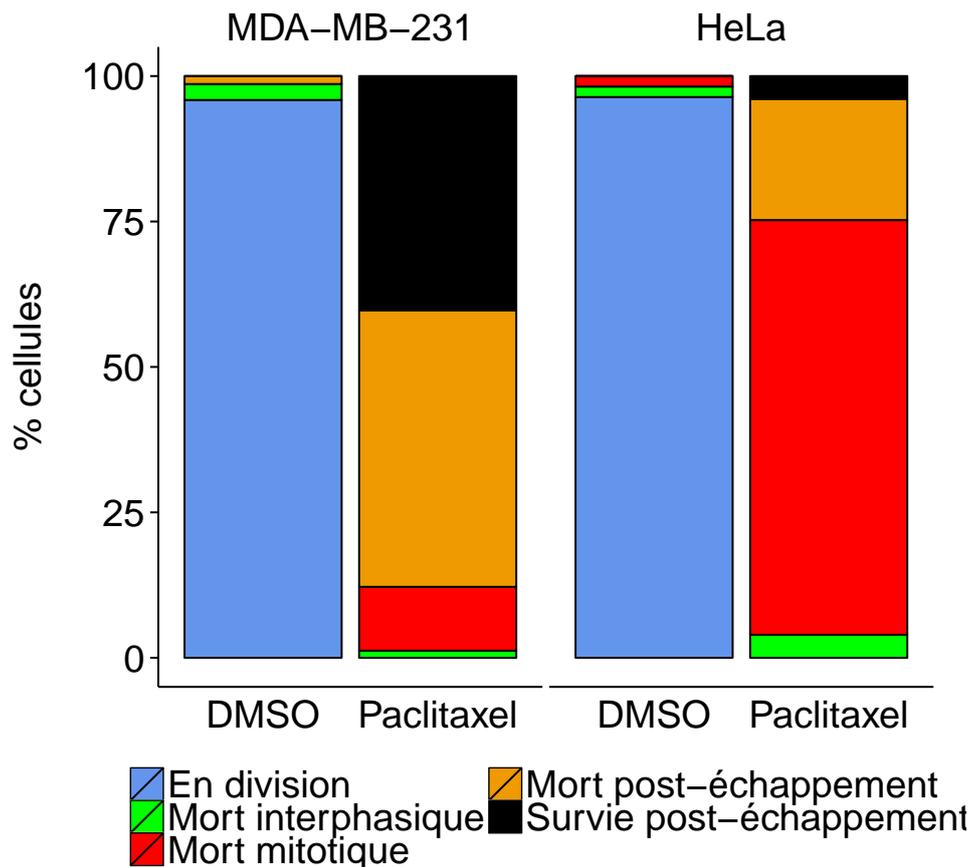
Il n'existe actuellement pas de moyen d'automatiser l'analyse de ces devenir cellulaires. Le principal problème ne vient pas de l'analyse des mouvements chromatiniens, mais du déplacement des cellules. En effet celles-ci sont susceptibles se croiser, et les algorithmes de « tracking » ne sont pas assez performants pour gérer cela ; ils les perdent une fois le croisement effectué. Ainsi l'œil humain reste la seule option à l'heure actuelle, et c'est de cette manière que ces analyses ont été effectués.

Les lignées MDA-MB-231 et HeLa<sup>1</sup> ont été infectées par les particules H2B-RFP, synchronisées par un double blocage thymidine et traitées ou non au paclitaxel (Figure 3.2). Les cellules ont ensuite été filmées durant 72 heures. Il est intéressant d'observer la différence marquée entre les profils des deux lignées. Alors que dans la lignée MDA-MB-231 la majorité des arrêts mitotiques (prophase ou proméphase) aboutissent à de l'échappement, la lignée HeLa subit elle une mort massive en mitose. Nous pouvons ajouter qu'à l'issue de l'acquisition, une grande partie des cellules MDA-MB-231 ayant échappé à l'arrêt mitotique sont encore vivantes.

## 3.2 L'extinction de Bcl-x<sub>L</sub> induit la mort mitotique suite à l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel

Afin d'évaluer l'influence de Bcl-x<sub>L</sub> sur le profil des cellules MDA-MB-231, nous avons infecté ces cellules avec des lentivecteurs codant pour un shRNA dirigé contre Bcl-x<sub>L</sub> co-exprimé avec la GFP (Green fluorescent protein) (Figure 3.3). Cette méthode possède l'avantage de pouvoir sélectionner précisément les cellules qui expriment la GFP, et donc par extension, les cellules dans lesquelles Bcl-x<sub>L</sub> a été éteint (Figure 3.1a). Les cellules ont donc été successivement infectées par le lentivecteur codant pour H2B-RFP, et par celui codant pour le sh (Small hairpin)RNA (Ribonucleic acid) (Figure 3.3a). Les cellules ont ensuite été synchronisées par un double blocage thymidine, puis traitées ou non au paclitaxel, pour enfin être filmées par vidéomicroscopie. Les résultats montrent que la lignée MDA-MB-231 est très

1. Ce système a été initialement mis au point sur la lignée HeLa, qui est très utilisée en microscopie.



**FIGURE 3.2 – Les cellules MDA-MB-231 échappent à l'arrêt mitotique alors que les cellules HeLa meurent en mitose suite à un traitement par le paclitaxel. Des cellules MDA-MB-231 et HeLa ont été infectées avec des vecteurs lentiviraux codant pour la protéine de fusion H2B-RFP. Les cellules ont ensuite été synchronisées par un double blocage thymidine, et traitées au DMSO ou au paclitaxel (70 nmol/l), pour finalement être analysées par vidéomicroscopie. Les devenir cellulaires représentés sont ceux observés à l'issue de 72 h d'acquisition.**

sensible à l'extinction de Bcl-x<sub>L</sub>. En effet, nous observons un nombre significatif de cellules mortes en interphase après infection par le shBcl-x<sub>L</sub> en absence de paclitaxel. Cette déplétion de Bcl-x<sub>L</sub> devient d'autant plus délétère pour les cellules que le paclitaxel est présent. Nous observons qu'elle entraîne un mort mitotique massive des cellules, qui dans la condition contrôle échappent à l'arrêt mitotique. Le même effet est retrouvé avec un traitement par l'ABT-737 (Figure 3.3b), mais dans de moindres proportions.

L'utilisation de la vidéomicroscopie nous a également permis d'effectuer une analyse dynamique et temporelle de l'arrêt mitotique. Elle permet de quantifier précisément le temps que chaque cellule passe en arrêt mitotique, et nous avons comparé la durée de l'arrêt mitotique des cellules ayant subi une mort mitotique à celle des cellules ayant échappé à l'arrêt mitotique (Figure 3.4). Nous avons pu ainsi

(a) Analyse, par vidéomicroscopie, des devenir des cellules MDA-MB-231 suite au traitement par le paclitaxel et à l'extinction de Bcl-x<sub>L</sub>

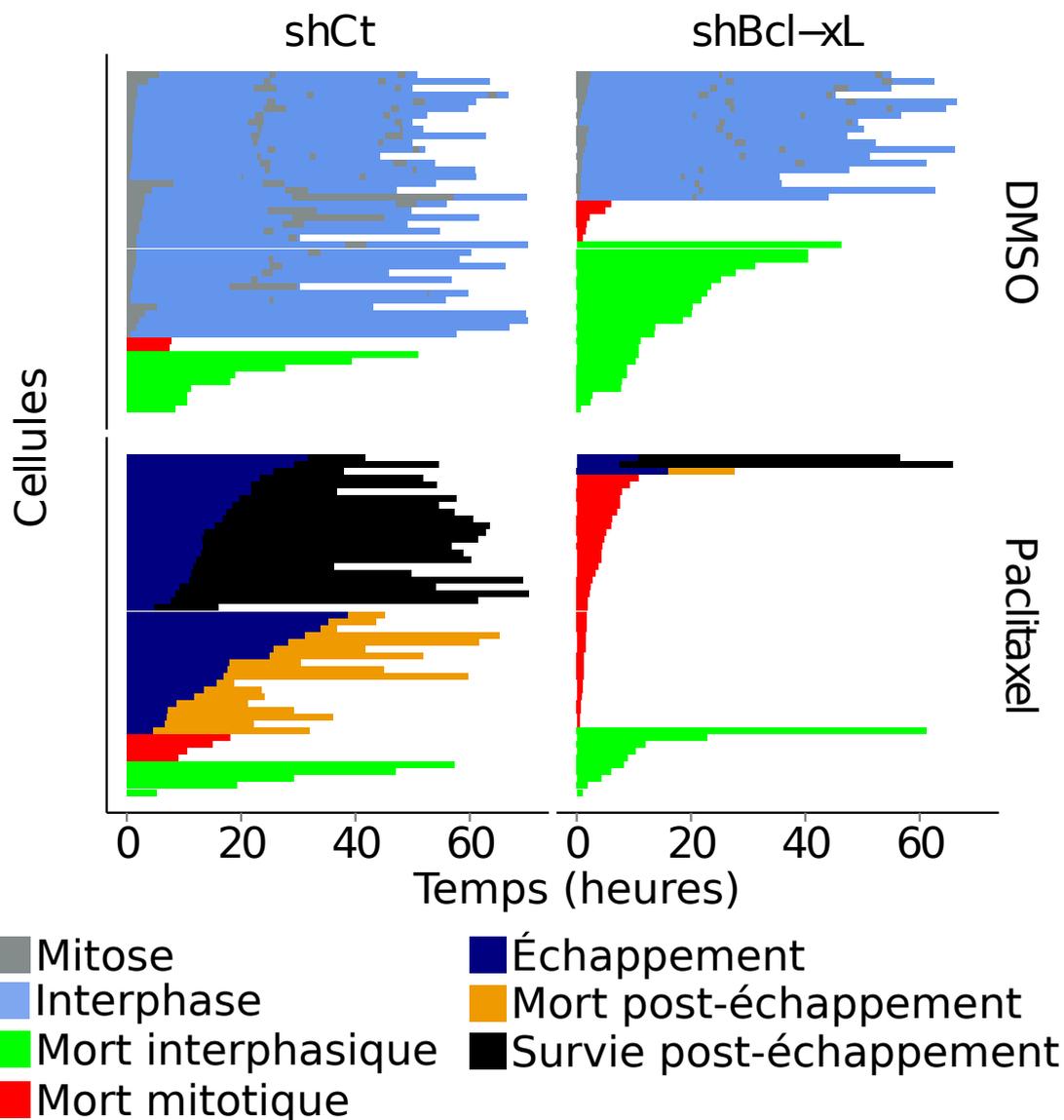


FIGURE 3.3 – La déplétion de Bcl-x<sub>L</sub> induit la mort mitotique en condition d'arrêt mitotique dans les cellules MDA-MB-231.

constater que les cellules subissant la mort mitotique passaient moins de temps en arrêt mitotique que les cellules échappant à l'arrêt mitotique. Ceci confirme le concept des réseaux compétitifs, qui suggère qu'au cours de l'arrêt mitotique, les cellules luttent contre l'accumulation de signaux de mort jusqu'à ce que les niveaux de cycline B passe en deçà du seuil permettant l'échappement. Ainsi dans les cellules MDA-MB-231, Bcl-x<sub>L</sub>, via son activité anti-apoptotique, inhibent les signaux de mort que génère l'arrêt mitotique, ce qui rallongent la durée de l'arrêt mitotique et permet aux cellules de sortir de la mitose.

Ces résultats montrent que Bcl-x<sub>L</sub> est indispensable à la survie des cellules MDA-MB-231 pendant l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel.

(b) Analyse, par vidéomicroscopie, des devenir des cellules MDA-MB-231 suite au traitement par le paclitaxel et à l'ABT-737

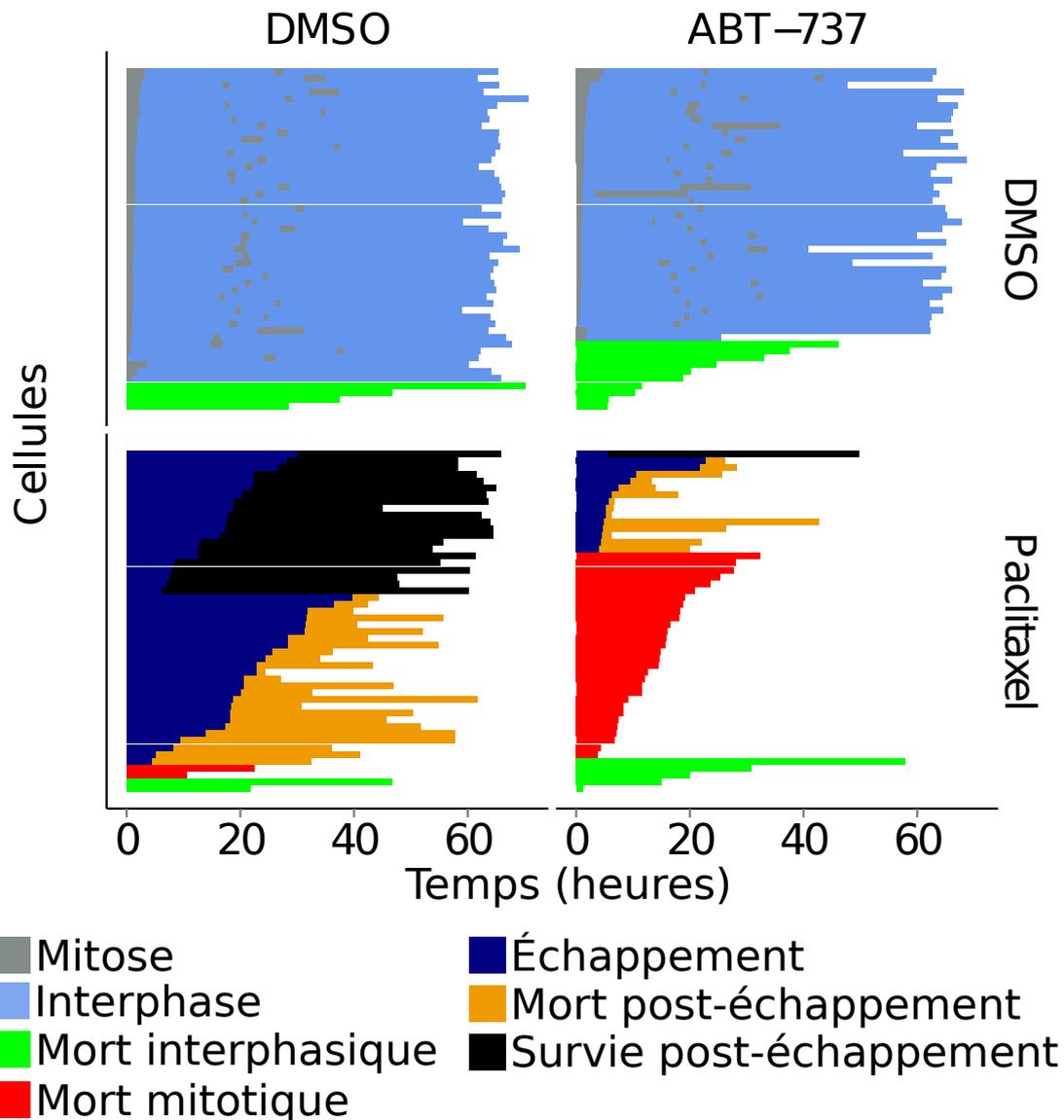
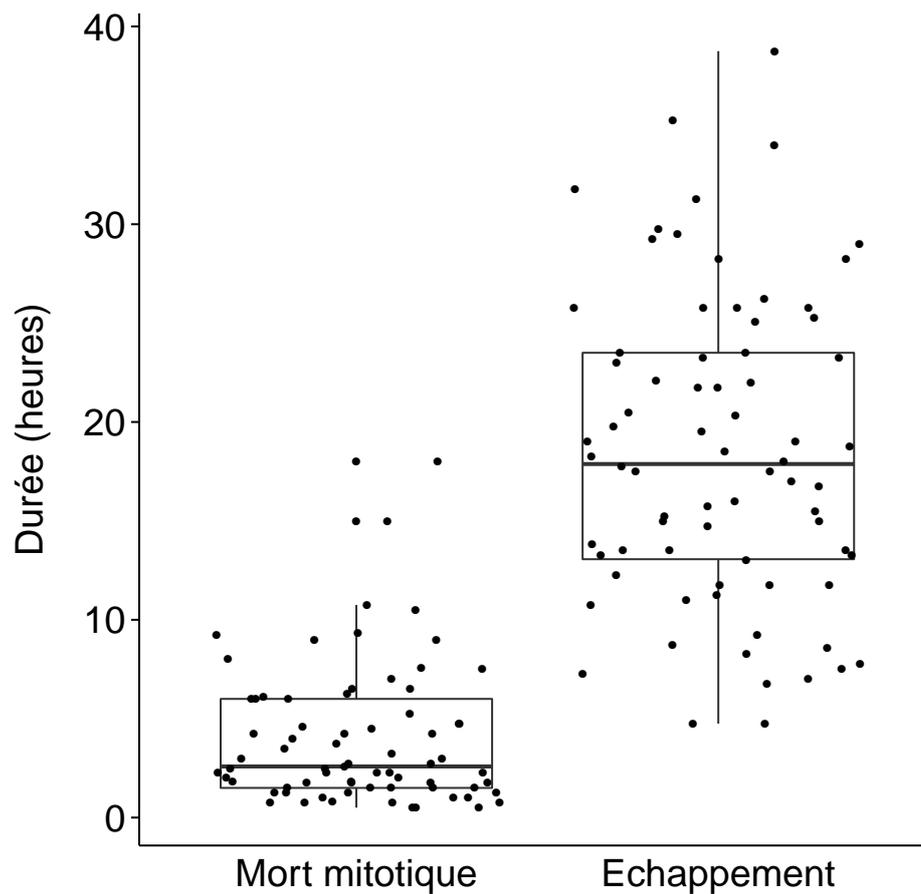


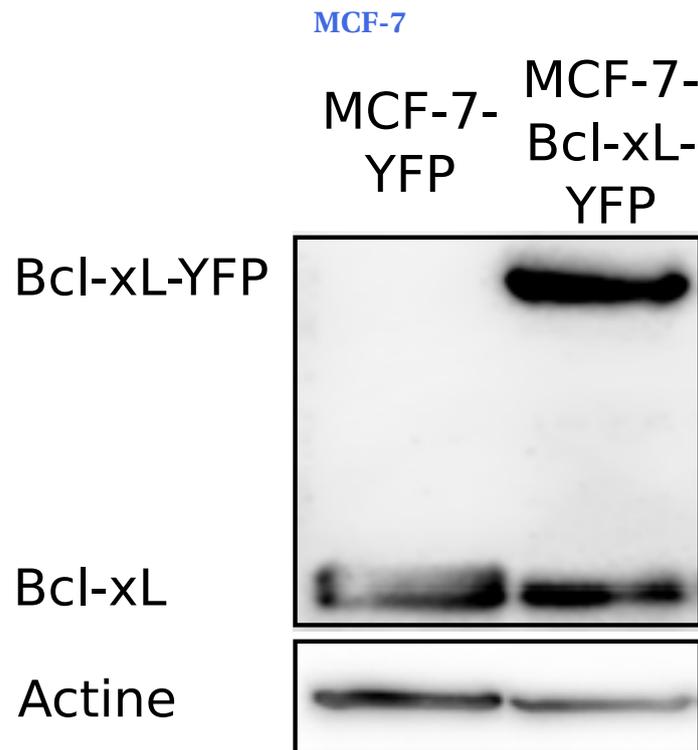
FIGURE 3.3 – La déplétion de Bcl-x<sub>L</sub> induit la mort mitotique en condition d'arrêt mitotique dans les cellules MDA-MB-231. Des cellules MDA-MB-231 ont été infectées avec des vecteurs lentiviraux codant pour la protéine de fusion H2B-RFP. Les cellules ont ensuite été infectés soit par un lentivecteur codant pour un shRNA contrôle (shCt), soit par un lentivecteur codant pour un shRNA fluorescent dirigé contre Bcl-x<sub>L</sub> (shBcl-x<sub>L</sub>) (a). Alternativement, les cellules ont été traitées au DMSO ou à l'ABT-737 (1 μmol/l) (b). Ensuite, les cellules ont été synchronisées par un double blocage thymidine, et traitées au DMSO ou au paclitaxel (70 nmol/l) pour finalement être analysées par vidéomicroscopie durant 72 h.



**FIGURE 3.4 – La mort mitotique survient plus rapidement que l'échappement à l'arrêt mitotique.** Des cellules MDA-MB-231 ont été infectées avec des vecteurs lentiviraux codant pour la protéine de fusion H2B-RFP. Les cellules ont ensuite été infectées soit par un lentivecteur codant pour un shRNA contrôle (shCt) soit par un lentivecteur codant pour un shRNA fluorescent dirigé contre Bcl-x<sub>L</sub> (shBcl-x<sub>L</sub>). Ensuite, les cellules ont été synchronisées par un double blocage thymidine, et traitées au DMSO ou au paclitaxel (70 nmol/l) pour finalement être analysées par vidéomicroscopie durant 72 h. La variable quantifiée fut la durée de la mitose dans le cas du traitement au DMSO, et la durée de l'échappement à l'arrêt mitotique dans le cas du traitement au paclitaxel.

### 3.3 Bcl-x<sub>L</sub> protège de la mort mitotique et de l'échappement à l'arrêt mitotique induits par le paclitaxel

L'inverse de l'expérience précédente a ensuite été réalisée. Des cellules surexprimant Bcl-x<sub>L</sub> ont été testées pour la résistance au paclitaxel (Figure 3.5). Pour cela deux lignées stables ont été générées. Des cellules MCF-7 ont été transfectées puis sélectionnées pour l'expression d'un vecteur codant pour Bcl-x<sub>L</sub> recombiné à la YFP, ou d'un vecteur contrôle codant pour la YFP seul. L'expression de Bcl-x<sub>L</sub> a été vérifiée par immunoblot (Figure 3.5a). Ces mêmes cellules ont ensuite été infectées par les particules H2B-RFP, synchronisées en thymidine, traitées au paclitaxel et filmées 72 h par vidéomicroscopie

(a) Surexpression de Bcl-x<sub>L</sub>-YFP dans les cellules

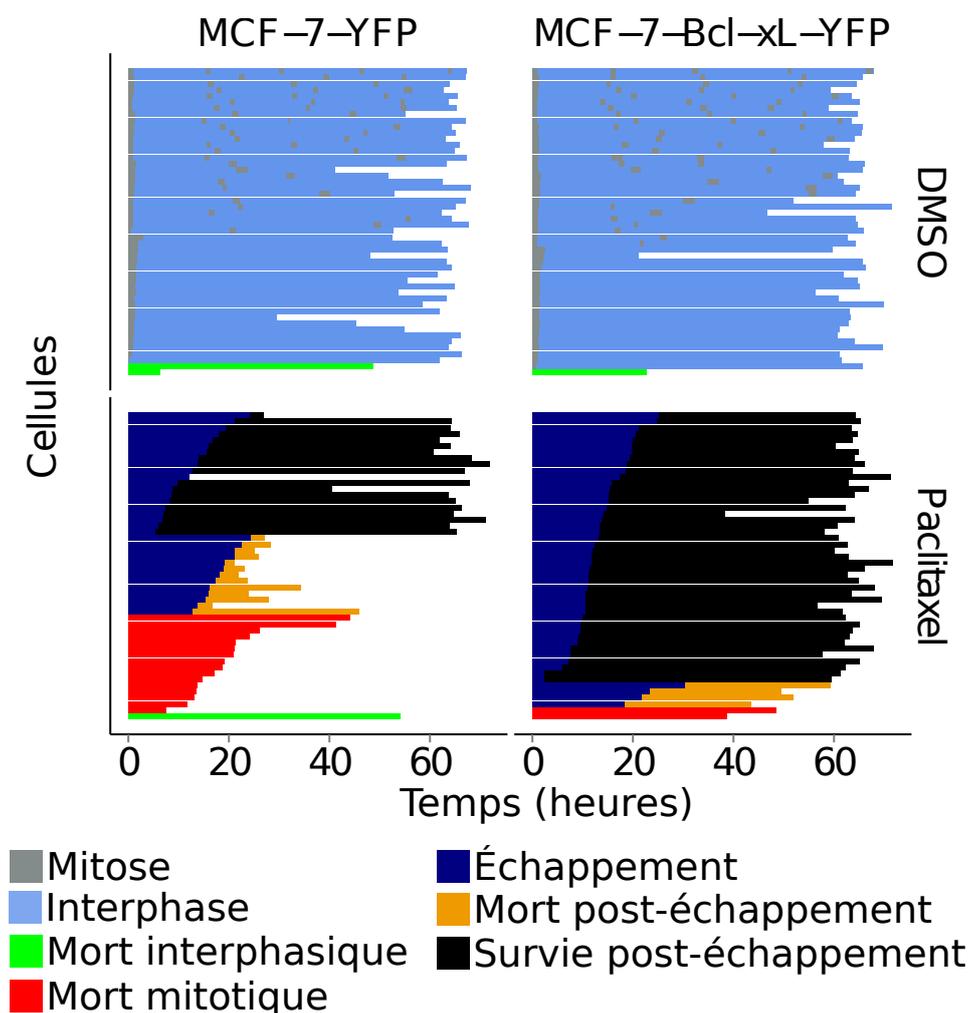
**FIGURE 3.5 – La surexpression de Bcl-x<sub>L</sub> protège de la mort induite par le paclitaxel dans les cellules MCF-7.**

(Figure 3.5b). Sous paclitaxel la réponse des cellules MCF-7-YFP est proche de celle des MDA-MB-231, avec une majorité d'échappement à l'arrêt mitotique, mais une proportion plus importante de mort mitotique. Les résultats de cette expérience indiquent que Bcl-x<sub>L</sub> protège de cette mort mitotique. De manière intéressante, nous observons que l'expression de Bcl-x<sub>L</sub> protège également de la mort post-échappement. En effet, nous pouvons constater que comme dans le cas de la mort mitotique, la mort post-échappement est présente en moindre proportion dans les cellules surexprimant Bcl-x<sub>L</sub>.

### 3.4 Bcl-x<sub>L</sub> prolonge l'activité de Cdk1

L'expérience précédente (Figure 3.5b) montre que Bcl-x<sub>L</sub> favorise l'échappement à l'arrêt mitotique au détriment de la mort mitotique. Selon le modèle des réseaux compétitifs, cela suggère que pendant l'arrêt mitotique, Bcl-x<sub>L</sub> permet aux cellules de lutter contre les signaux de mort, et de survivre jusqu'à ce que le seuil d'échappement à l'arrêt mitotique soit atteint. En d'autres termes, Bcl-x<sub>L</sub> augmente le seuil de mort. Cependant, toujours selon ce modèle, une autre possibilité est que Bcl-x<sub>L</sub> augmente le seuil d'échappement. Cela aurait le même effet qu'augmenter le seuil de mort, dans la mesure où le temps nécessaire à l'échappement serait réduit, ce qui permettrait aux cellules d'échapper à l'arrêt mitotique avant que tous leurs signaux de survie soient épuisés.

(b) Analyse, par vidéomicroscopie, des devenir des cellules MCF-7 suite au traitement par le paclitaxel et à la surexpression de Bcl-x<sub>L</sub>



**FIGURE 3.5 – La surexpression de Bcl-x<sub>L</sub> protège de la mort induite par le paclitaxel dans les cellules MCF-7 (suite).** Des cellules MCF-7 ont été transfectées avec un plasmide codant pour la protéine fluorescente YFP (MCF-7-YFP) ou avec Bcl-x<sub>L</sub> recombiné à la YFP (MCF-7-Bcl-x<sub>L</sub>-YFP). Les cellules ont ensuite été sélectionnées et l'expression de leur vecteur a été vérifiée par immunoblot (a). Dans le même temps les cellules ont été infectées par un lentivecteur codant pour la protéine de fusion H2B-RFP (b). Ensuite, les cellules ont été synchronisées par un double blocage thymidine, et traitées au DMSO ou au paclitaxel (70 nmol/l) pour finalement être analysées par vidéomicroscopie durant 72 h.

Afin de vérifier si l'expression de Bcl-x<sub>L</sub> avait une influence sur le seuil d'échappement, et donc la durée de l'échappement, des cellules MCF-7-YFP et MCF-7-Bcl-x<sub>L</sub>-YFP ont été synchronisées par un double blocage thymidine, traitées au paclitaxel, et analysées par vidéomicroscopie (Figure 3.6a). Cette expérience avait pour but de comparer les durées de l'échappement à l'arrêt mitotique des cellules surexprimant Bcl-x<sub>L</sub> avec les cellules contrôles. Nous avons pu constater que la surexpression de Bcl-x<sub>L</sub> ne diminuait pas la durée de l'échappement, mais au contraire l'augmentait sensiblement. Cela suggère

que Bcl-x<sub>L</sub> abaisse le seuil d'échappement, ou favorise l'activité de Cdk1. Le seuil d'échappement étant une variable difficile à caractériser, nous nous sommes intéressés à l'activité de Cdk1 via l'évaluation de l'expression de MPM-2 à laquelle Cdk1 participe, notamment avec Plk1. Les cellules MCF-7-YFP et MCF-7-Bcl-x<sub>L</sub>-YFP ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre Cdc20, et récupérées toutes les 24 heures jusqu'à 96 heures (Figure 3.6b). Nous avons observé que l'extinction de Cdc20 induisait bien l'apparition de MPM-2. Nous avons également observé que, dans le cas des cellules MCF-7-YFP, l'expression de MPM-2 disparaissait à 72 heures, mais que cette dernière était maintenue jusqu'à 96 heures dans la cas des cellules MCF-7-Bcl-x<sub>L</sub>-YFP.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'expression de Bcl-x<sub>L</sub> favorise, voire prolonge l'activité de Cdk1.

(a) Analyse de l'influence de Bcl-x<sub>L</sub> sur la durée de l'échappement à l'arrêt mitotique

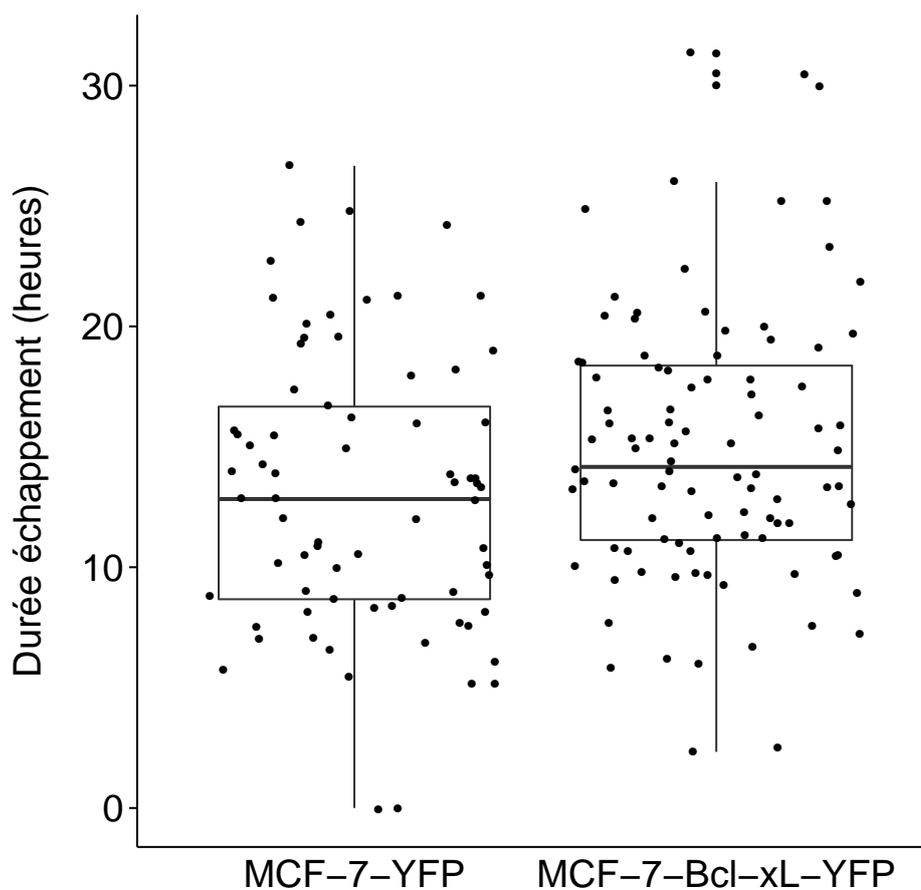
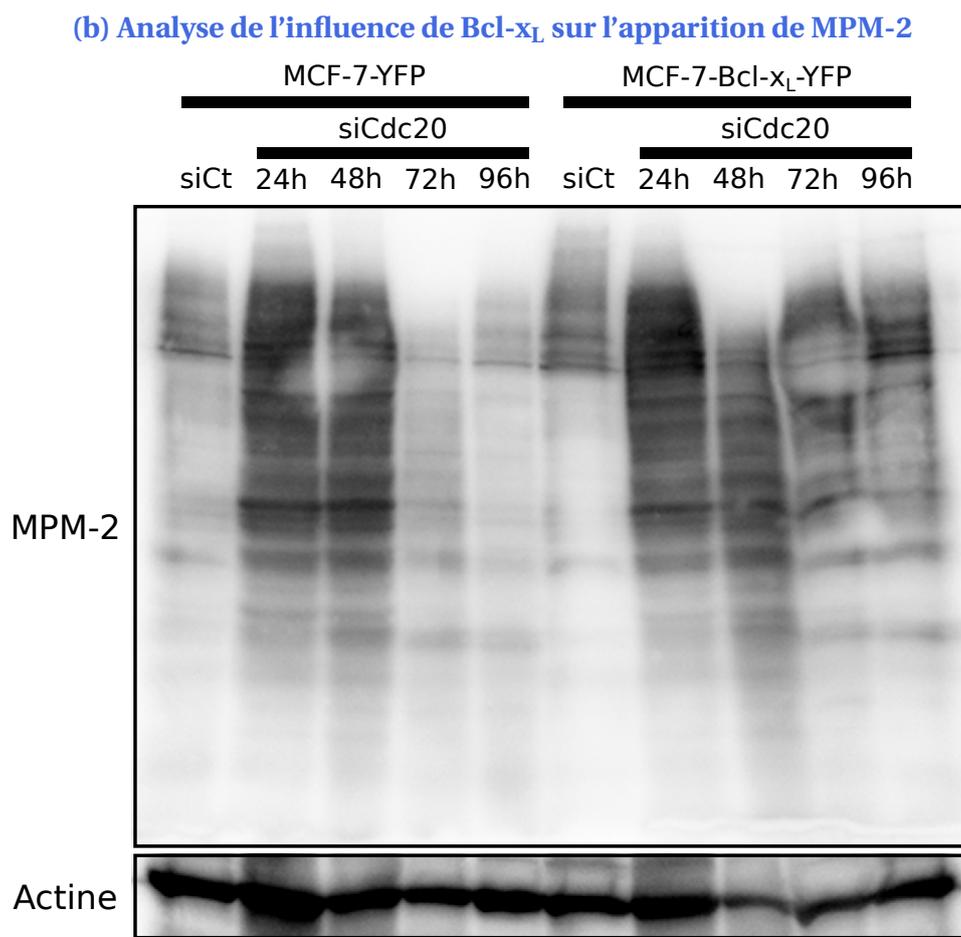


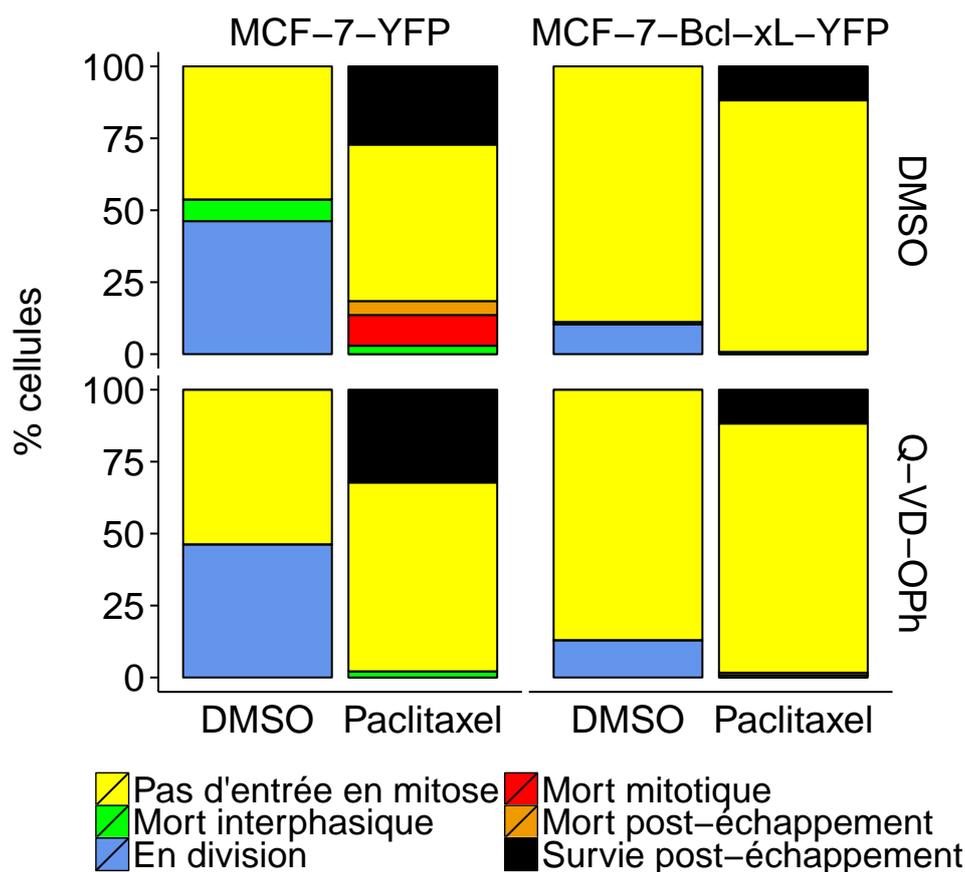
FIGURE 3.6 – Bcl-x<sub>L</sub> prolonge l'activité de l'activité de Cdk1.



**FIGURE 3.6 – Bcl-x<sub>L</sub> prolonge l'activité de l'activité de Cdk1 (suite).** (a) Les cellules MCF-7-YFP et MCF-7-Bcl-x<sub>L</sub>-YFP ont été synchronisées par un double blocage thymidine, puis traitées au paclitaxel (70 nmol/l) pour finalement être analysées par vidéomicroscopie durant 72 h. La variable quantifiée fut la durée de l'échappement à l'arrêt mitotique. (b) Les cellules MCF-7-YFP et MCF-7-Bcl-x<sub>L</sub>-YFP ont été transfectées avec un siCt ou un siCdc20, récupérées aux temps indiqués, et analysées par immunoblot.

### 3.5 Bcl-x<sub>L</sub> bloque les cellules MCF-7 en interphase

Une autre possibilité pouvant expliquer l'effet protecteur de Bcl-x<sub>L</sub> suite à un traitement par le paclitaxel nous a été suggéré de manière fortuite. Plus précisément, l'étude de l'effet de la surexpression de Bcl-x<sub>L</sub> sur l'arrêt mitotique (Figure 3.5) a nécessité, de fait, l'observation de cellules entrant en mitose. Les cellules n'entrant pas en mitose (*i.e.* les cellules restant en interphase pendant les 72 heures d'acquisition) était écartées de l'analyse. Néanmoins, nous avons pu observer que ces cellules étaient plus nombreuses dans le cas des cellules surexprimant Bcl-x<sub>L</sub> (Figure 3.7). La figure 3.7 représente les devenir des cellules MCF-7-YFP et MCF-7-Bcl-x<sub>L</sub>-YFP traitées au paclitaxel ou au DMSO en présence ou non de Q-VD-OPh et analysées par vidéomicroscopie. La proportion de cellules n'entrant pas en mitose représente une partie très importante des devenir de cette expérience. Cela semble être spécifique à ces cellules, et n'a pas été observé avec les cellules MDA-MB-231 (Figure 3.3). L'écueil de cette obser-



**FIGURE 3.7 – La surexpression de Bcl-x<sub>L</sub> bloque les cellules en interphase.** Des cellules MCF-7 ont été transfectées avec un plasmide codant la protéine fluorescente YFP (MCF-7-YFP) ou avec Bcl-x<sub>L</sub> recombiné à la YFP (MCF-7-Bcl-x<sub>L</sub>-YFP). Puis les cellules ont été infectées par un lentivecteur codant pour la protéine de fusion H2B-RFP. Enfin, les cellules ont été synchronisées par un double blocage thymidine, et traitées au DMSO ou au paclitaxel (70 nmol/l), et au DMSO ou au Q-VD-OPh (5 μmol/l), pour finalement être analysées par vidéomicroscopie durant 72 h.

vation est l'étape de synchronisation par la thymidine. Il n'en effet pas à exclure que la non entrée en mitose des cellules pourrait être due à la persistance de la thymidine, les cellules MDA-MB-231 peuvent elles être plus enclines à évacuer de composé. Cependant, dans la mesure où les cellules MCF-7-YFP et les cellules MCF-7-Bcl-x<sub>L</sub>-YFP ont toutes deux été soumises au processus de synchronisation, un effet de Bcl-x<sub>L</sub> sur l'entrée en mitose peut être conclu. Nous ne pouvons en revanche pas déterminer précisément dans quel phase du cycle les cellules sont arrêtées.

Cette expérience suggère qu'un mode d'action de Bcl-x<sub>L</sub> lui permettant d'exercer son effet protecteur pourrait être d'empêcher les cellules d'entrée en mitose. En effet, dans l'hypothèse où le paclitaxel exercerait son effet via un mécanisme actif de mort (possiblement en mitose), empêcher les cellules d'atteindre ce mécanisme pourrait protéger les cellules.

### 3.6 Bcl-2, Bcl-2 ou Bcl-w sont nécessaires à la survie des cellules tétraploïdes

Suite à l'observation que Bcl-x<sub>L</sub> protège les cellules de la mort post-échappement (Figure 3.5b), nous avons voulu confirmer l'importance de cette protéine dans cet état particulier qu'est l'échappement à l'arrêt mitotique. Face à cet objectif, la principale difficulté se présentant est de générer des cellules ayant échappé à l'arrêt mitotique. La méthode consistant en l'ajout puis le retrait d'un anti-mitotique, même s'elle a déjà été utilisée [84], est complexe à mettre en place. De plus, l'effet de ces drogues peut persister à l'issue du lavage. Une autre possibilité serait l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité de Cdk1, cependant cela nécessiterait également l'utilisation d'un anti-mitotique. Un modèle satisfaisant serait l'utilisation d'une forme inductible de Cdc20, dont nous ne disposons pas encore mais que nous tentons de mettre au point actuellement.

De là, un modèle nous ayant semblé proche d'une cellule échappée est un modèle de cellule tétraploïde générées à l'issue d'une mitose défectueuse. Afin de générer ces cellules tétraploïdes, nous avons décidé de cibler la kinase Aurora B, dont on sait qu'elle est importante pour la cytokinèse [246], avec un inhibiteur chimique, l'AZD1152 (Astrazeneca **drug 1152**) (Figure 3.8). Des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été traitées à l'AZD1152 et récupérées 48 heures plus tard pour être analysées par cytométrie en flux via un double marquage IP/MPM-2 (Figure 3.8a). Nous observons une accumulation du marquage 4n/MPM-2- qui représente les cellules tétraploïdes, mais aussi éventuellement les cellules en phase G2 du cycle cellulaire. Afin de vérifier qu'il s'agissait bien de cellules tétraploïdes, l'inhibition d'Aurora B par l'AZD1152 a été observée par vidéomicroscopie (données non montrées). Nous avons pu constater, via la surexpression de la protéine de fusion H2B-RFP, que sous AZD1152 les cellules re-entraient en mitose et ressortaient presque immédiatement, mais sans division cellulaire (défaut de cytokinèse). Parallèlement à cela, nous avons pu observer, par cytométrie en flux, qu'un traitement prolongé (72 et 96 heures) par l'AZD1152 générerait une population de cellules 8n (données non montrées).

Dans le but d'évaluer si Bcl-x<sub>L</sub> ou Bcl-2 était important pour la survie de ces cellules tétraploïdes, nous avons traitées successivement traitées les trois lignées à l'AZD1152 pendant 48 heures, puis à l'ABT-737 (après lavage) également pendant 48 heures. À l'issue des ces deux traitement un marquage à l'APO2.7 a été réalisé, et les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (Figure 3.8b). L'AZD1152 en agent simple n'induisait que peu de mort dans les trois lignées (moins de 20 %). En revanche, les

(a) Analyse du cycle cellulaire suite au traitement à l'AZD1152 et à l'ABT-737

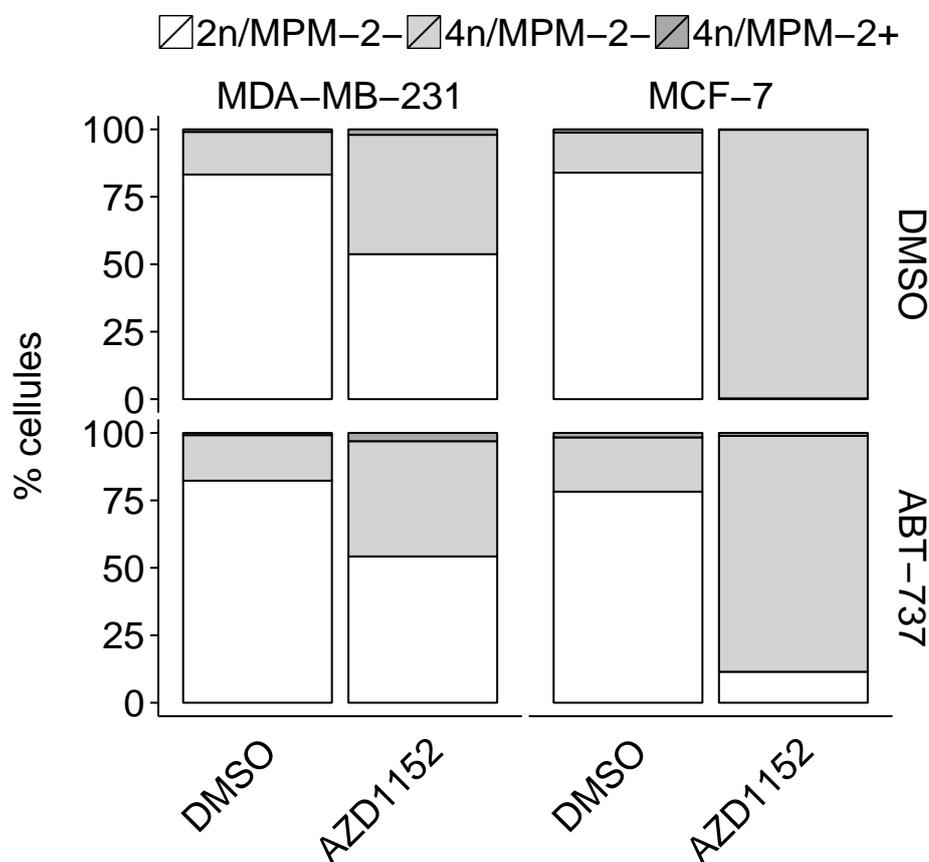


FIGURE 3.8 – Bcl-x<sub>L</sub> ou Bcl-2 sont nécessaires à la survie des cellules à l'état tétraploïde.

deux traitements successifs induisaient un pourcentage important de mort dans les lignées MDA-MB-231 et MCF-7. L'ABT-737 n'avait pas d'effet observable sur le profil de cycle cellulaire des cellules traitées à l'AZD1152 (Figure 3.8a). Enfin, nous pouvons observer des profils différents entre les lignées suite au traitement par l'AZD1152, cependant cela n'est corrélé à la mort cellulaire.

Ces résultats montrent que Bcl-2, Bcl-2 ou Bcl-w sont importants pour la survie des cellules tétraploïdes.

(b) Analyse de la mort cellulaire induite par le traitement à l'AZD1152  
et à l'ABT-737

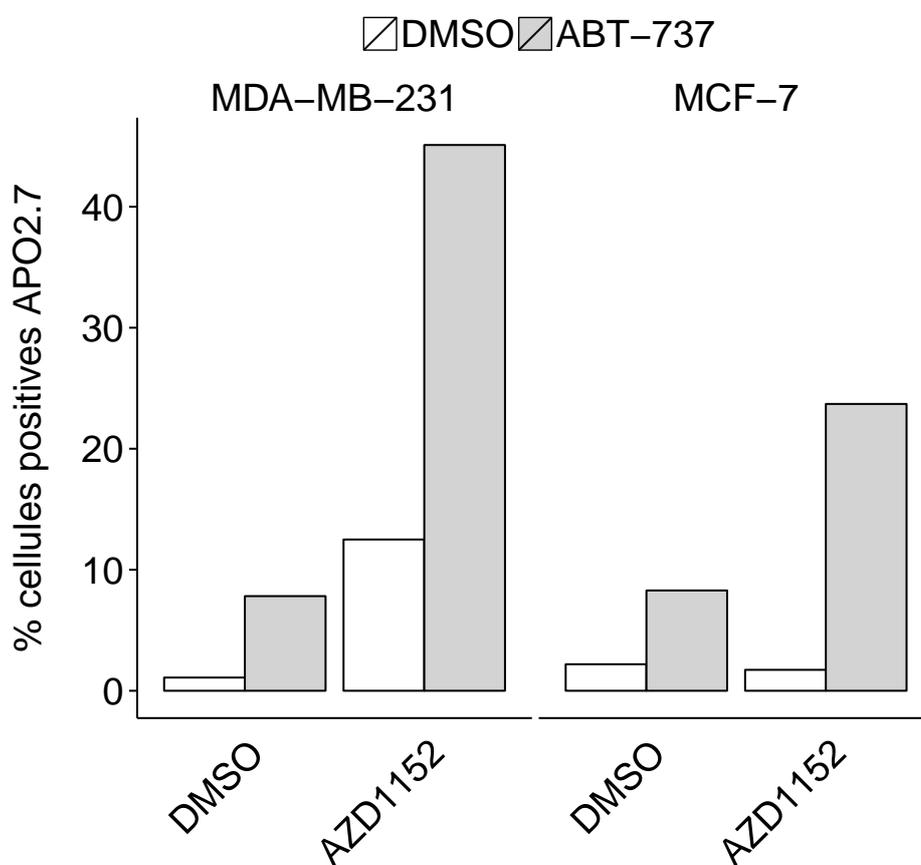


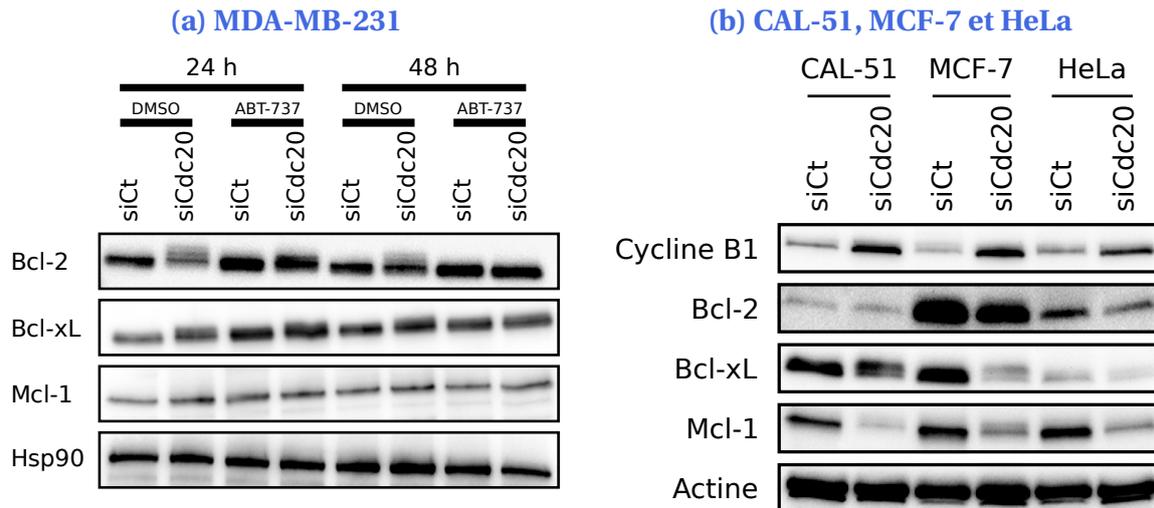
FIGURE 3.8 – Bcl-x<sub>L</sub> ou Bcl-2 sont nécessaires à la survie des cellules à l'état tétraploïde (suite). Les lignées MDA-MB-231 et MCF-7 ont été traitées 48 h à l'AZD1152 (200 nmol/l), lavées, puis 48 h à l'ABT-737. Les cellules ont ensuite été récupérées et marquées à l'iodure de propidium et avec un anticorps dirigé contre MPM-2 (a), ou à l'APO2.7 (b). Enfin, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux.

# Chapitre 4

## Modifications post-traductionnelles des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2

### 4.1 L'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 provoque des modifications post-traductionnelles de Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1

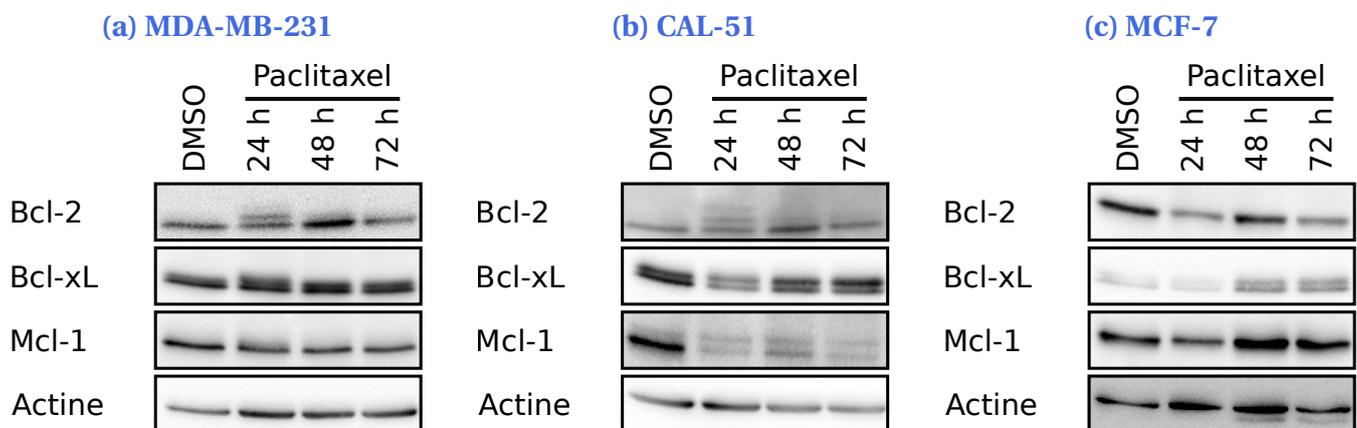
Bcl-x<sub>L</sub> étant impliqué dans la survie pendant l'arrêt mitotique, nous avons voulu définir si cette fonction n'était pas liée à son niveau d'expression. Nous avons donc analysé les niveaux d'expression de Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 suite à l'extinction de Cdc20, et après traitement par l'ABT-737, dans la lignée MDA-MB-231 (Figure 4.1a). La même expérience a été réalisée dans les lignées CAL-51, MCF-7 et HeLa en déplétion de Cdc20 (Figure 4.1b). Les cellules ont été traitées ou non par de l'ABT-737 durant 24 heures, puis transfectées avec des siCdc20 durant 48 heures avant récupération dans le cas des MDA-MB-231. Les trois autres lignées ont été transfectées avec un siCdc20 et récupérées 48 heures plus tard. Nous observons une diminution de Mcl-1 sous extinction de Cdc20 dans toutes les lignées, excepté les MDA-MB-231. Bcl-x<sub>L</sub> diminue également dans les cellules CAL-51 et MCF-7, mais pas dans les MDA-MB-231. Bcl-x<sub>L</sub> est trop faiblement exprimé dans la lignée HeLa pour tirer une quelconque conclusion. Concernant Bcl-2, nous remarquons qu'il diminue légèrement, sous extinction de Cdc20 dans la lignée MCF-7, et qu'il est retardé dans sa migration de façon très nette dans la lignée MDA-MB-231 à 24 et 48 heures d'extinction. Un retard de migration de Bcl-x<sub>L</sub> est également observé dans les lignées MDA-MB-231 et CAL-51 sous extinction de Cdc20. Ces résultats suggèrent que les trois membres anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2 sont modifiés d'une manière post-traductionnelles durant l'arrêt mitotique. Nous pouvons ajouter que ces modifications semblent dépendantes du contexte cellulaire.



**FIGURE 4.1 – Les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 subissent des modifications post-traductionnelles pendant l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20. (a) La lignée MDA-MB-231 a été traitée 24 h à l'ABT-737 puis transfectée avec un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre Cdc20. Les cellules ont ensuite été récupérées et le niveaux d'expression ont été évalué par immunoblot. (b) Les trois autres lignées ont été transfectées avec un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre Cdc20, puis récupérées 48 h plus tard pour l'analyse par immunoblot.**

## 4.2 L'arrêt mitotique induit par le paclitaxel provoque des modifications post-traductionnelles de Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1

Les niveaux d'expression de Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 ont aussi été évalués pendant l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel (Figure 4.2). Cela a également été réalisé en cinétique dans les lignées MDA-MB-

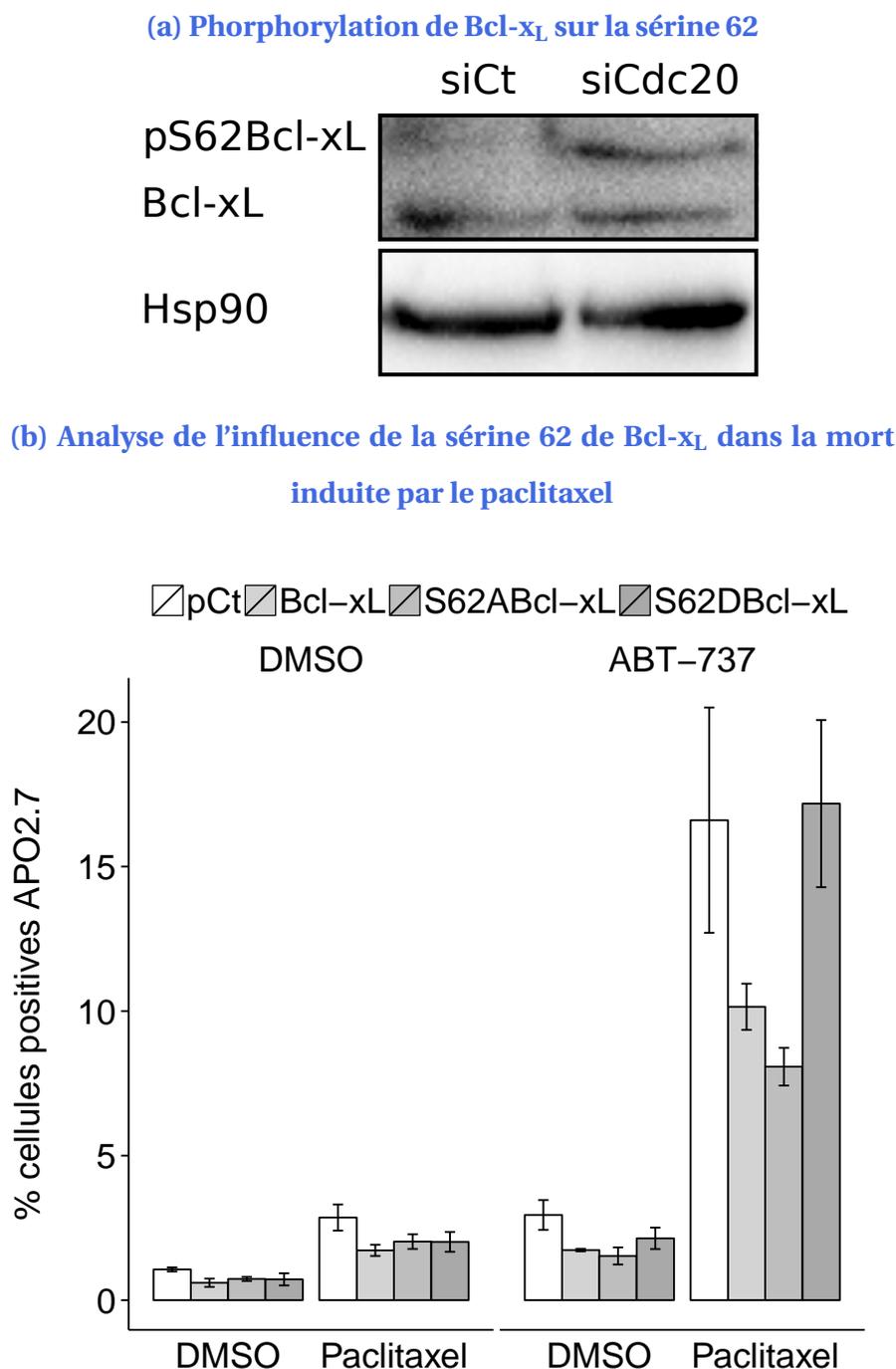


**FIGURE 4.2 – Les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 subissent des modifications post-traductionnelles pendant l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel. Les lignées MDA-MB-231 (a), CAL-51 (b) et MCF-7 (c) ont été traitées au paclitaxel (70 nmol/l) et récupérées aux temps indiqués pour l'analyse par immunoblot.**

231 (Figure 4.2a), CAL-51 (Figure 4.2b) et MCF-7 (Figure 4.2c). Les trois lignées ont été traitées 24, 48 ou 72 heures au paclitaxel puis récupérées pour être analysées. Certaines observations sont similaires à celle faites pour l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20. Le retard de migration Bcl-2 est aussi observable dans les lignées MDA-MB-231 et CAL-51, et celui de Bcl-x<sub>L</sub> se produit à 24 heures dans la lignée MDA-MB-231. Mcl-1 diminue dans la lignée CAL-51, mais cela ne se produit ni dans la lignée MCF-7 ni dans la lignée MDA-MB-231. Ces données suggèrent des similarités pour les modifications post-traductionnelles entre les arrêts mitotiques induit par l'extinction de Cdc20 et par le paclitaxel.

### 4.3 L'arrêt mitotique induit la phosphorylation de Bcl-x<sub>L</sub> sur la sérine 62

La phosphorylation de Bcl-x<sub>L</sub> sur sa sérine 62 est connue pour inhiber sa fonction anti-apoptotique. Cette modification se produit notamment suite à des dommages de l'ADN pendant la phase G2, pour induire la catastrophe mitotique [235]. Nous avons évalué l'expression de cette phosphorylation par immunoblot, dans les MDA-MB-231 après 48 heures de transfection avec un siCdc20 (Figure 4.3a). De manière intéressante, nous avons pu constater que le niveau de cette phosphorylation était effectivement accrue suite à l'extinction de Cdc20. Cela a également été observé suite au traitement par le paclitaxel (données non montrées), ce qui suggère une inhibition de l'activité anti-apoptotique de Bcl-x<sub>L</sub> pendant l'arrêt mitotique. Afin d'évaluer si cette phosphorylation, pouvait avoir des conséquences sur la capacité de Bcl-x<sub>L</sub> à remplir son rôle protecteur pendant l'arrêt mitotique, nous avons réalisé une série de transfection avec des plasmides codant pour Bcl-x<sub>L</sub> des mutants S62A et S62D de Bcl-x<sub>L</sub>, dans la lignée MDA-MB-231 (Figure 4.3b). Les cellules ont été transfectées, traitées à l'ABT-737 24 heures plus tard, et enfin au paclitaxel de nouveau après 24 heures et pour la même durée. La mort cellulaire a quant à elle été analysée par un marquage APO2.7. Les deux mutants utilisés sont S62A qui est phospho-défectif, et le S62D qui lui est phospho-mimétique. Nous avons été en mesure d'observer que le mutant phospho-défectif S62A protégeait de la mort mitotique induite par la combinaison paclitaxel/ABT-737, comme le faisait Bcl-x<sub>L</sub> WT (Wild type). En revanche, le mutant phospho-mimétique S62D ne protégeait pas contre la mort induite par cette même combinaison. Ceci suggérerait que dans un contexte de mort mitotique induit l'ABT-737, l'expression de Bcl-x<sub>L</sub> sous sa forme non phosphorylée pourrait présenter un avantage sélectif pour les cellules.



**FIGURE 4.3 – Importance de la phosphorylation de Bcl-x<sub>L</sub> sur la sérine 62 pour la survie pendant l'arrêt mitotique.** (a) Des cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre Cdc20. Les cellules ont ensuite été récupérées et le niveau d'expression de pS62Bcl-x<sub>L</sub> a été évalué par immunoblot. (b) Des cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec un plasmide contrôle (pCt), ou des plasmides codants pour Bcl-x<sub>L</sub>, et des formes mutées S62ABcl-x<sub>L</sub> et S62DBcl-x<sub>L</sub>. Les cellules ont ensuite été traitées au paclitaxel pendant 24h, pour finalement être récupérées, marquées à l'APO2.7 et analysées par cytométrie en flux.

# Chapitre 5

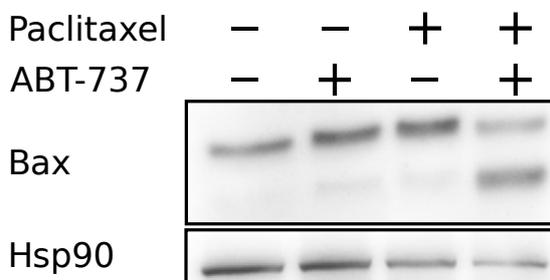
## Protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 impliquées dans la mort mitotique

### 5.1 Bax est nécessaire à la mort mitotique induite par l'inhibition de Bcl-x<sub>L</sub>

Après avoir identifié certains acteurs anti-apoptotiques protégeant de la mort mitotique, nous nous sommes intéressés au pan pro-apoptotique de la famille de Bcl-x<sub>L</sub>. Car, à moins qu'il s'agisse d'une fonction non standard de Bcl-x<sub>L</sub>, son action anti-apoptotique peut passer par l'inhibition d'un ou de plusieurs de ses homologues pro-apoptotiques. Nous avons donc cibler les deux protéines pro-apoptotiques formatrices de pores de cette famille, que sont Bax et Bak (Figure 5.1). La lignée MDA-MB-231 a été traitée

(a) Analyse, par immunoblot, de l'expression de Bax suite au traitement par

le paclitaxel et l'ABT-737



(b) Extinction de Bax et Bak



FIGURE 5.1 – Bax est nécessaire à la mort cellulaire induite par l'ABT-737, suite à l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 ou le paclitaxel.

tée 48 heures au paclitaxel et à l'ABT-737 en agent simple ou en combinaison. Nous avons observé le clivage de Bax suite au traitement par la combinaison paclitaxel/ABT-737 (Figure 5.1a). Cet événement

(c) Analyse de l'influence de Bax et Bak dans la mort induite par l'extinction de Cdc20 et l'ABT-737

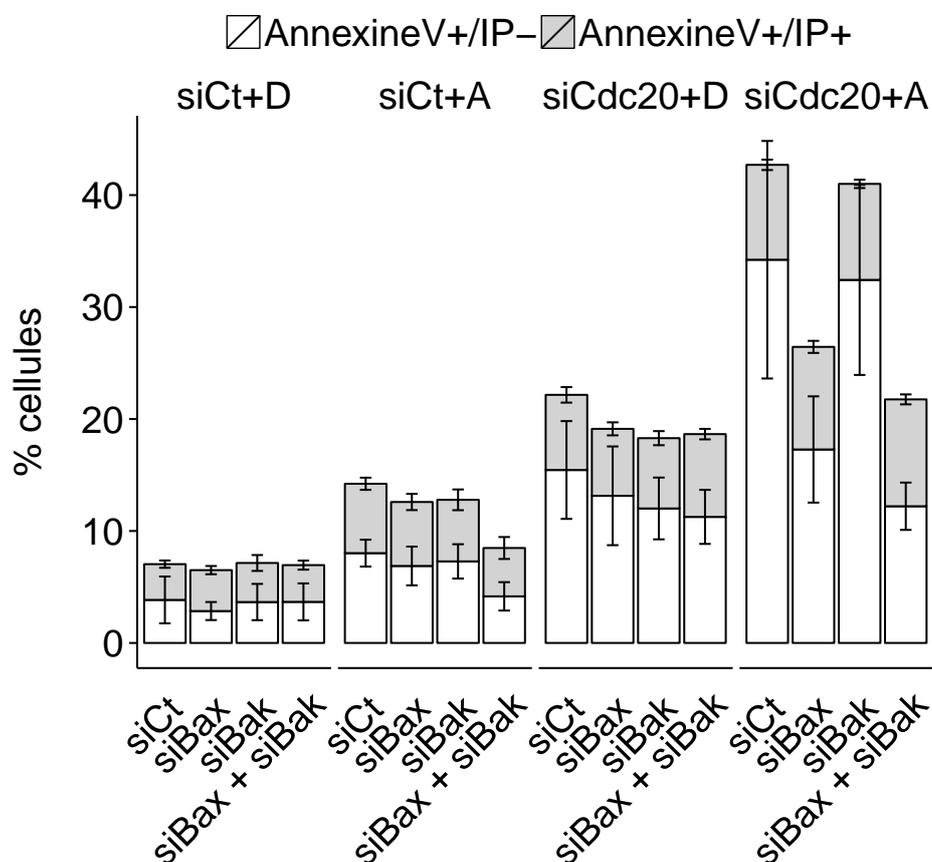
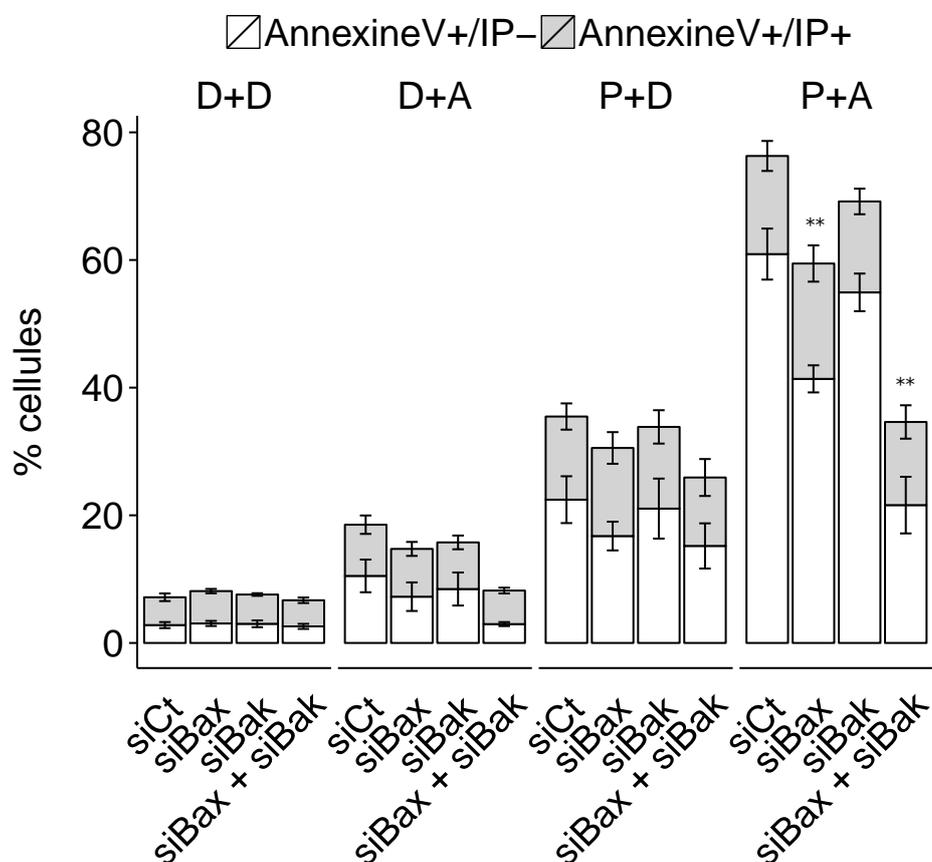


FIGURE 5.1 – Bax est nécessaire à la mort cellulaire induite par l'ABT-737, suite à l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 ou le paclitaxel (suite). "D" : DMSO, "A" : ABT-737

est connu depuis longtemps, et peut être considéré comme indicateur d'une mort d'origine apoptotique [247]. Aucune modification de Bak au niveau protéique n'a été observée (données non montrées).

Suite à cela les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des siRNA dirigés contre Bax et Bak, et leur extinction a été vérifiée par immunoblot (Figure 5.1b). Parallèlement à cela, les effets de ces extinctions sur la résistance des cellules à la mort induite par l'arrêt mitotique ont été évalués. Bax, Bak, ou les deux ont été éteints par ARN interférence dans les cellules MDA-MB-231. 24 heures plus tard les cellules ont été traitées à l'ABT-737 pour 24 heures, puis déplétées en Cdc20 (Figure 5.1c), ou traitées au paclitaxel (Figure 5.1d) pour 48 heures. Après récupération les cellules ont été marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Nous pouvons observer que la mort induite par le paclitaxel seul ou l'extinction de Cdc20 seul n'est pas dépendante de Bax ou Bak, et ce bien qu'une fois de plus la mort soit majoritairement positive pour l'annexine V et négative pour l'iodure de propidium. En revanche, la mort induite

## (d) Analyse de l'influence de Bax et Bak dans la mort induite par le paclitaxel et l'ABT-737



**FIGURE 5.1 – Bax est nécessaire à la mort cellulaire induite par l'ABT-737, suite à l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20 ou le paclitaxel (suite).** (a) Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées 24 h au DMSO ou à l'ABT-737 (1  $\mu\text{mol/l}$ ), puis au paclitaxel (70 nmol/l), ou au DMSO, durant 48 h, et enfin analysées par immunoblot. (b) Cellules MDA-MB-231 transfectées avec un siRNA contrôle (siCt), un siRNA dirigé contre Bax ou contre Bak, puis analysées par immunoblot. (c,d) Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCt) ou un siRNA dirigé contre Bax, Bak ou les deux cotransfectés. 24 heures plus tard les cellules ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCt) ou un siRNA dirigé contre Cdc20 (c). Alternativement, les cellules ont été traitées au DMSO ou au paclitaxel (70 nmol/l) (d). Les cellules ont été récupérées 48 h plus tard, marquées à l'Annexine V et à l'iodure de propidium, pour enfin être analysées par cytométrie en flux. "D" : DMSO, "A" : ABT-737, "P" : Paclitaxel. Test de student bilatéral, \*\*\*, \*\* et \* correspondent respectivement à des valeurs p inférieurs à 0,001, 0,01, et 0,05.

par les combinaisons avec l'ABT-737 est elle dépendante de Bax dans le cas de l'extinction de Cdc20, et dépendante des deux pro-apoptotiques dans le cas du paclitaxel. Ces données sont en accord avec les observations que nous avons fait précédemment sur l'importance ou non des caspases dans la mort induite par Cdc20.

## 5.2 La phosphorylation de Bcl-x<sub>L</sub> sur la sérine 62 influe sur son interaction avec Bax

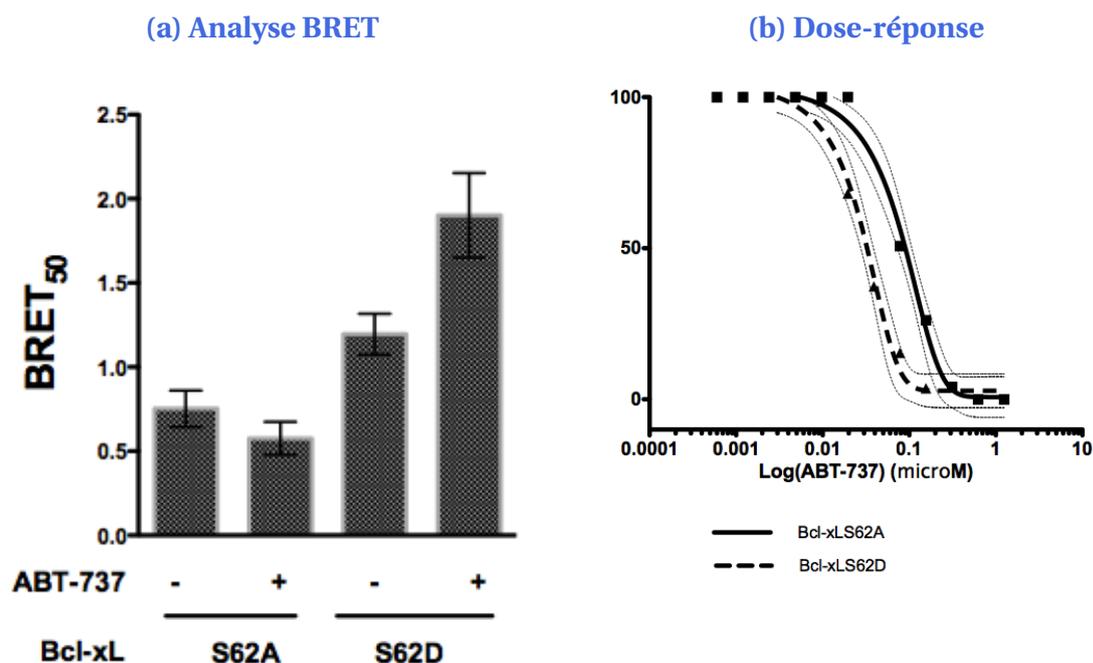
La phosphorylation de Bcl-x<sub>L</sub> sur la sérine 62 est une modification dont on sait qu'elle modifie ses interactions [227]. Nous avons voulu déterminer si la phosphorylation que nous observons pendant l'arrêt mitotique, avait un effet sur l'interaction Bcl-x<sub>L</sub>-Bax, et l'approche choisie pour étudier cela a été la technique du BRET (**B**ioluminescence **r**esonance **e**nergy **t**ransfer) (Figure 5.2). Cette technique permet de détecter l'interaction directe entre deux protéines. Elle est basée sur la transfection de deux plasmides codants chacun pour une protéine de fusion :

- un plasmide codant pour la première protéine d'intérêt, ici Bax, fusionnée à la Rluc (*Renilla reniformis* luciférase) qui joue le rôle de donneur d'énergie ;
- un plasmide codant pour la seconde protéine d'intérêt, ici Bcl-x<sub>L</sub>, fusionnée à la YFP qui joue le rôle d'accepteur d'énergie.

La Rluc catalyse l'oxydation de la coelenterazine H, et cette réaction produit un signal lumineux avec un pic d'émission à 480 nm. Ce pic d'émission à 480 nm est contenu dans le spectre d'excitation de la YFP. Ainsi, si les deux protéines d'intérêt, ici Bax et Bcl-x<sub>L</sub>, interagissent, et que la Rluc et la YFP sont localisées à moins de 10 nm, l'ajout de la coelenterazine H induira un transfert d'énergie, et la YFP émettra un signal à 530 nm. De cette manière, la mesure du BRET, c'est à dire la mesure de la longueur d'onde d'émission de la YFP, permet de détecter l'existence d'une interaction entre les deux protéines. Cette technique a l'avantage de pouvoir étudier les interactions protéiques dans un contexte cellulaire.

Nous avons cotransfecté des cellules MCF-7 avec un plasmide codant pour Bax-Rluc, et un plasmide codant pour S62ABcl-x<sub>L</sub>-YFP ou S62DBcl-x<sub>L</sub>-YFP. Une expérience de BRET a ensuite été réalisée, et le résultat en étant issu est représenté sur la figure 5.2a. La figure 5.2a représente les mutants de Bcl-x<sub>L</sub>, en présence ou non d'ABT-737, en fonction du BRET<sub>50</sub>. Le BRET<sub>50</sub> est obtenu en faisant varier la quantité de plasmides S62(A/D)Bcl-x<sub>L</sub>-YFP, tout en laissant fixe la quantité de plasmide Bax-Rluc. Il représente la quantité de plasmides S62(A/D)Bcl-x<sub>L</sub>-YFP à laquelle la valeur du BRET est égale à 50 % du BRET<sub>max</sub>, le BRET<sub>max</sub> étant la valeur de BRET obtenue lorsque S62(A/D)Bcl-x<sub>L</sub>-YFP sature Bax-Rluc, et que donc les interactions sont maximales. Ainsi, une augmentation du BRET<sub>50</sub> traduit un affaiblissement de l'interaction, et inversement. De là, nous avons observé que le mutant S62ABcl-x<sub>L</sub>-YFP interagissait plus fortement avec Bax-Rluc, que le mutant S62DBcl-x<sub>L</sub>-YFP (le BRET<sub>50</sub> est moins élevé dans le cas de S62ABcl-x<sub>L</sub>-YFP). Cette expérience permet aussi d'observer que l'ABT-737 affaiblit l'interac-

tion entre S62DBcl-x<sub>L</sub>-YFP et Bax-Rluc, mais n'a que très peu d'effet dans le cas de S62ABcl-x<sub>L</sub>-YFP (Figure 5.2a). Cette constatation est confirmée par une analyse (dose-réponse) de l'effet de l'ABT-737 sur le BRET entre S62(A/D)Bcl-x<sub>L</sub>-YFP et Bax-Rluc (Figure 5.2b). Cette expérience montre que l'IC<sub>50</sub> (Median (50 %) inhibition concentration) de l'ABT-737 est de 19,49 nmol/l dans le cas de S62DBcl-x<sub>L</sub>-YFP, et de 34,05 nmol/l dans le cas de S62ABcl-x<sub>L</sub>-YFP. Ainsi, l'ABT-737 inhibe plus facilement les interactions entre S62DBcl-x<sub>L</sub>-YFP et Bax-Rluc, que celles entre S62ABcl-x<sub>L</sub>-YFP et Bax-Rluc.

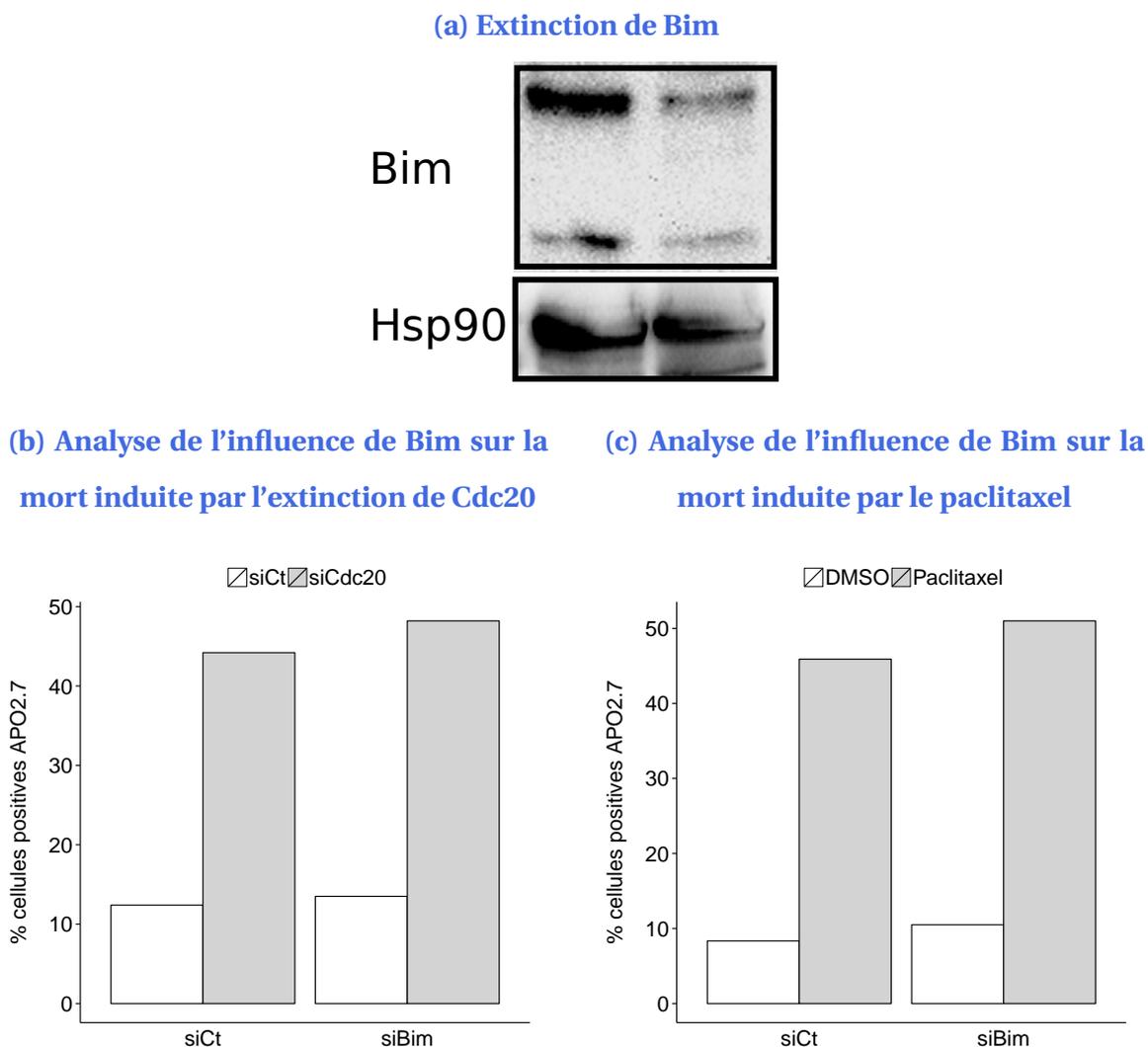


**FIGURE 5.2 – La phosphorylation de la sérine 62 de Bcl-x<sub>L</sub> déstabilise son interaction avec Bax.** (a) Analyse BRET de cellules MCF-7, transfectées avec des mutants S62ABcl-x<sub>L</sub>-YFP et S62DBcl-x<sub>L</sub>-YFP, et avec un plasmide Bax-Rluc, en présence ou non d'ABT-737 (1 μmol/l). (b) Dose-réponse de l'effet de ABT-737 sur les complexes S62(A/D)Bcl-x<sub>L</sub>-YFP et Bax-Rluc, dans les cellules MCF-7.

### 5.3 La mort induite par le paclitaxel n'est pas dépendante de Bim

Nous nous sommes ensuite intéressés la protéine activatrice Bim (Figure 5.3). Il a déjà été montré que Bim participait à l'induction de la mort mitotique [88]. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des siRNA contrôles, ou des siRNA dirigés contre Bim, et 48 heures plus tard les cellules ont été récupérées pour être analysées par immunoblot (Figure 5.3a). Comme dans le cas de Noxa, l'extinction était effective.

Nous avons ensuite transfecté les cellules avec des siBim. 24 heures plus tard, du paclitaxel a été ajouté, ou une transfection avec des siCdc20 a été réalisée (Figures 5.3b et 5.3c, respectivement). Les



**FIGURE 5.3 – La mort induite par l'arrêt mitotique n'est pas dépendante de Bim dans les cellules MDA-MB-231. (a) Cellules MDA-MB-231 transfectées avec un siRNA contrôle (siCt) ou un siRNA dirigé contre Bim, puis analysées par immunoblot. Parallèlement à cela, les cellules ont été transfectées avec un siCt ou un siBim, puis 24 h plus tard les cellules ont été transfectées avec un siCt ou un siRNA dirigé contre Cdc20 (b). Alternativement, les cellules ont été traitées au paclitaxel (70 nmol/l), le DMSO faisant office de contrôle (c). Après 48 h les cellules ont été récupérées, puis marquées à l'APO2.7 avant analyse par cytométrie en flux (b,c).**

cellules ont été analysées après 48 heures par cytométrie en flux via un marquage APO2.7. Nous n'avons observé aucun effet de l'extinction de Bim sur la mort induite le siCdc20 ou le paclitaxel. Ainsi, Bim semble ne pas être impliqué dans la mort mitotique ou la mort post-échappement. Ce qui ne va pas de le sens des travaux de Kanaga Sabapathy, cités précédemment [88].

Ces résultats, bien que négatifs d'un certain point de vue, sont à mettre en perspective avec les résultats du profilage BH3 (Figure 2.2b). Cette expérience indiquait que l'arrêt mitotique n'amorçait pas plus les cellules qu'elles ne l'étaient déjà, et cette absence d'effet de l'extinction de Bim ne fait que confirmer

cette observation. L'implication de Bid ne peut cependant pas être exclue. Et, dans le cas où une non implication serait observée, l'évènement déclencheur de la mort mitotique que nous observons serait alors possiblement à chercher ailleurs dans la famille de Bcl-2. Un contexte que Vishva Dixit a su très bien expliquer [221] dans la mesure où la dégradation de Mcl-1 à elle seule peut faire fi de la nécessité d'un quelconque activateur. Une explication dans un contexte dépendant de Bcl-x<sub>L</sub> reste donc à trouver, d'autant plus que nous n'avons observé aucune dégradation de Bcl-x<sub>L</sub>, ni de Mcl-1, pendant l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel dans la lignée MDA-MB-231 (Figure 4.2a).

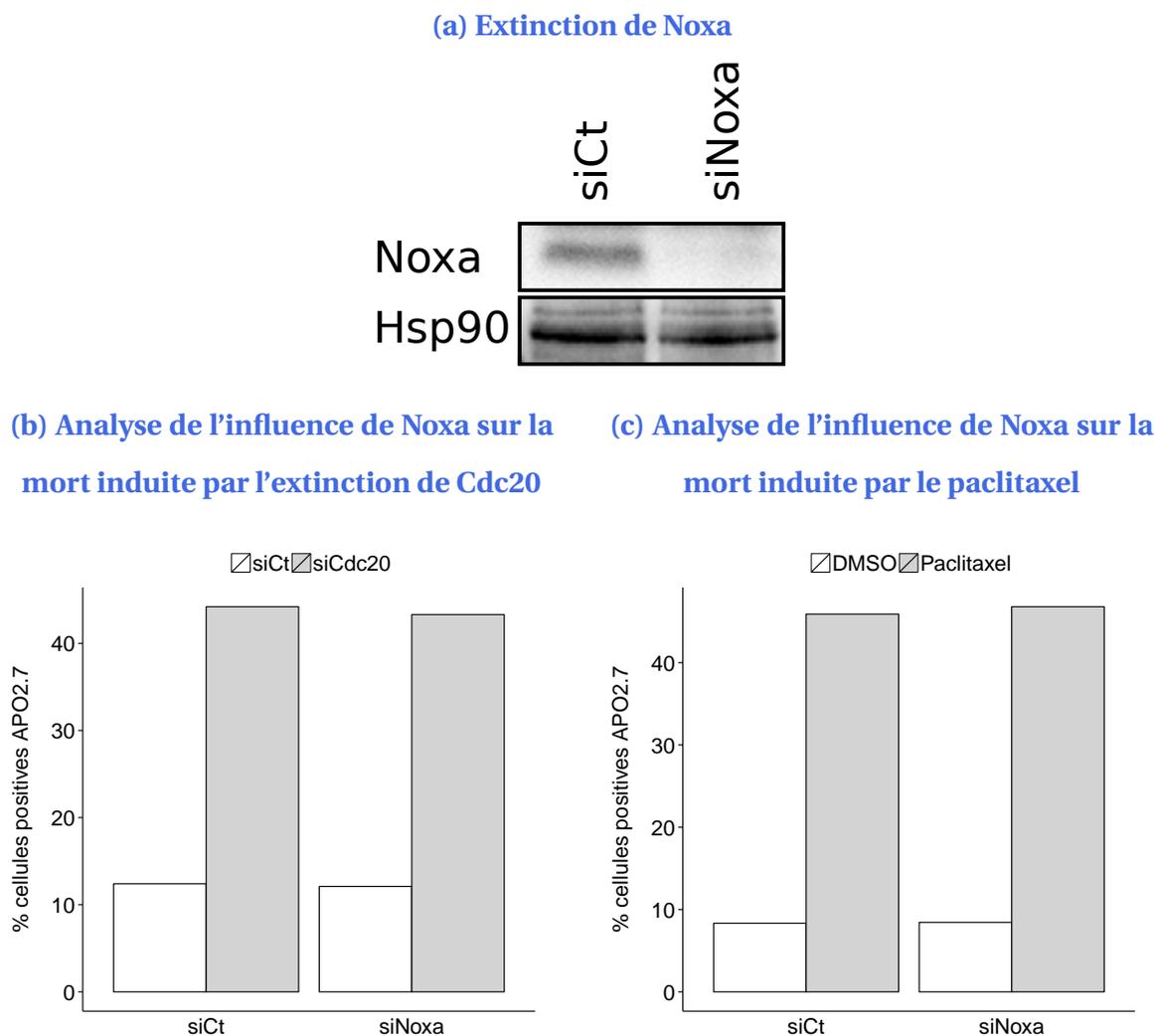
## 5.4 Le paclitaxel induit l'expression de Noxa

Par la suite, nous nous sommes logiquement intéressés aux sensibilisateurs de la famille de Bcl-2. Parmi les pro-apoptotiques sensibilisateurs, nous avons testé l'implication de Noxa dans la mort induite par le paclitaxel (Figure 5.4). Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des siRNA contrôles, ou des siRNA dirigés contre Noxa, et 48 heures plus tard les cellules ont été récupérées pour être analysées par immunoblot (Figure 5.4a). Nous avons pu constater l'efficacité de l'extinction de Noxa.

Cette vérification étant faite, nous avons transfecté les cellules avec des siNoxa pendant 24 heures, puis ajouté du paclitaxel ou transfecté un siCdc20 pendant 48 heures (Figures 5.4b et 5.4c, respectivement). Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux via un marquage APO2.7. Nous n'avons observé aucun effet de l'extinction de Noxa sur la mort induite le siCdc20 ou le paclitaxel. Ceci suggère que Noxa n'est pas impliqué dans la mort mitotique ou la mort post-échappement.

En revanche, malgré cette absence d'effet fonctionnel suite l'extinction de Noxa, nous avons été en mesure d'observer que le paclitaxel influait sur ses niveaux d'expression (Figure 5.5). Des cellules MDA-MB-231 ont été traitées au paclitaxel pendant 24 ou 48 heures, et l'expression de Noxa a été analysées par RT-qPCR (Figure 5.5a). Il en ressort que le paclitaxel induit l'expression de Noxa, et que cette induction est plus importante à 48 heures qu'à 24 heures de traitement. Dans la mesure où nous savons que d'une part la transcription est inhibée pendant la mitose, et que d'autre part les cellules traitées au paclitaxel peuvent échapper à l'arrêt mitotique dans ces cellules, ces résultats suggèrent que Noxa est induit après échappement.

L'induction de l'expression de Noxa a également été retrouvée au niveau protéique. Après un traitement de 24 heures à l'ABT-737 (ou au DMSO), du paclitaxel (ou du DMSO) a été ajouté sur des cellules MDA-MB-231 pendant 48 heures. Les cellules ont été récupérées et analysées par immunoblot pour l'expression de Noxa (Figure 5.5b). Noxa était induit par le paclitaxel, mais aussi fortement par l'ABT-737, et

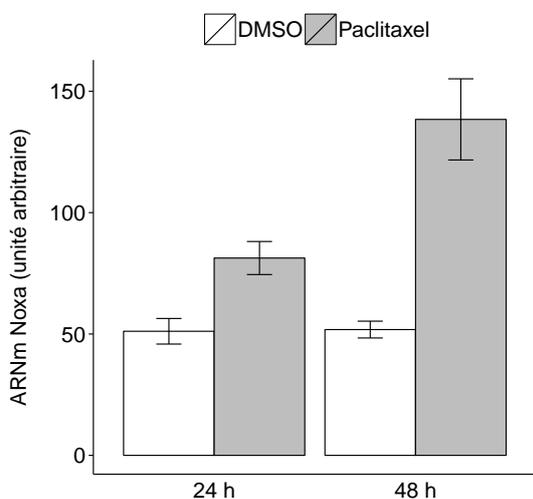


**FIGURE 5.4 – La mort induite par l'extinction de Cdc20 ou la paclitaxel n'est pas dépendante de Noxa.** (a) Cellules MDA-MB-231 transfectées avec un siRNA contrôle (siCt) ou un siRNA dirigé contre Noxa, puis analysées par immunoblot. Parallèlement à cela, les cellules ont été transfectées avec un siCt ou un siNoxa, puis 24 h plus tard les cellules ont été transfectées avec un siCt ou un siRNA dirigé contre Cdc20 (b). Alternative-ment, les cellules ont été traitées au paclitaxel (70 nmol/l), le DMSO faisant office de contrôle (c). Après 48 h les cellules ont été récupérées, puis marquées à l'APO2.7 avant analyse par cytométrie en flux (b,c).

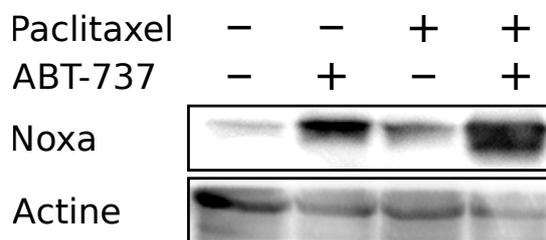
la combinaison des deux agents induisait une augmentation encore plus élevée.

L'induction de Noxa par l'ABT-737 que nous observons est à rapprocher des travaux que Joséphine Bertin-Ciftci a mené au sein de notre laboratoire [248]. Elle a montré que la mort induite par l'ABT-737 était en partie due la transcription de Noxa par le couple pRb-E2F-1 (E2 promoter binding factor 1). L'induction de Noxa par le paclitaxel est à rapprocher elle des travaux de Vishva Dixit [221]. Lui et son équipe ont en effet montré que Mcl-1 était dégradé activement pendant l'arrêt mitotique, et que cette dégradation pouvait être responsable de la mort mitotique. Cette équipe ne s'est cependant pas intéressée à l'acteur proapoptotique responsable de la mort. Sachant que Mcl-1 est l'unique interactant de

(a) Analyse, par RT-qPCR, de l'expression de Noxa suite à 24h et 48h de traitement au paclitaxel



(b) Analyse, par immunoblot, de l'expression de Noxa suite au traitement par le paclitaxel et l'ABT-737



**FIGURE 5.5 – Le paclitaxel et ABT-737 induisent l'expression de Noxa. (a) Cellules MDA-MB-231 traitées au paclitaxel (70 nmol/l), récupérées aux temps indiqués et analysées par RT-qPCR. (b) Cellules MDA-MB-231 traitées 24 h au DMSO ou à l'ABT-737 (1  $\mu$ mol/l), puis au paclitaxel (70 nmol/l) ou au DMSO durant 48 h, et enfin analysées par immunoblot.**

Noxa, il serait logique de soupçonner son implication. De notre côté, nous avons pu observer que Mcl-1 n'était pas dégradé dans les cellules MDA-MB-231 (Figure 4.2a), ce qui explique l'absence d'effet fonctionnel de l'extinction de Noxa malgré son induction. Néanmoins, rien ne prouve que Noxa ne pourrait pas être impliqué dans la mort mitotique induite par la combinaison paclitaxel-ABT-737. En effet, bien que Mcl-1 ne soit pas affecté par l'ABT-737 et qu'il ne soit pas dégradé dans les cellules MDA-MB-231, il est tout à possible la très forte induction de Noxa par la combinaison paclitaxel-ABT-737 soit suffisamment élevée pour tamponner Mcl-1 et favoriser la mort après échappement.

# Chapitre 6

## Perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie

### 6.1 Observation de la perméabilisation mitochondriale

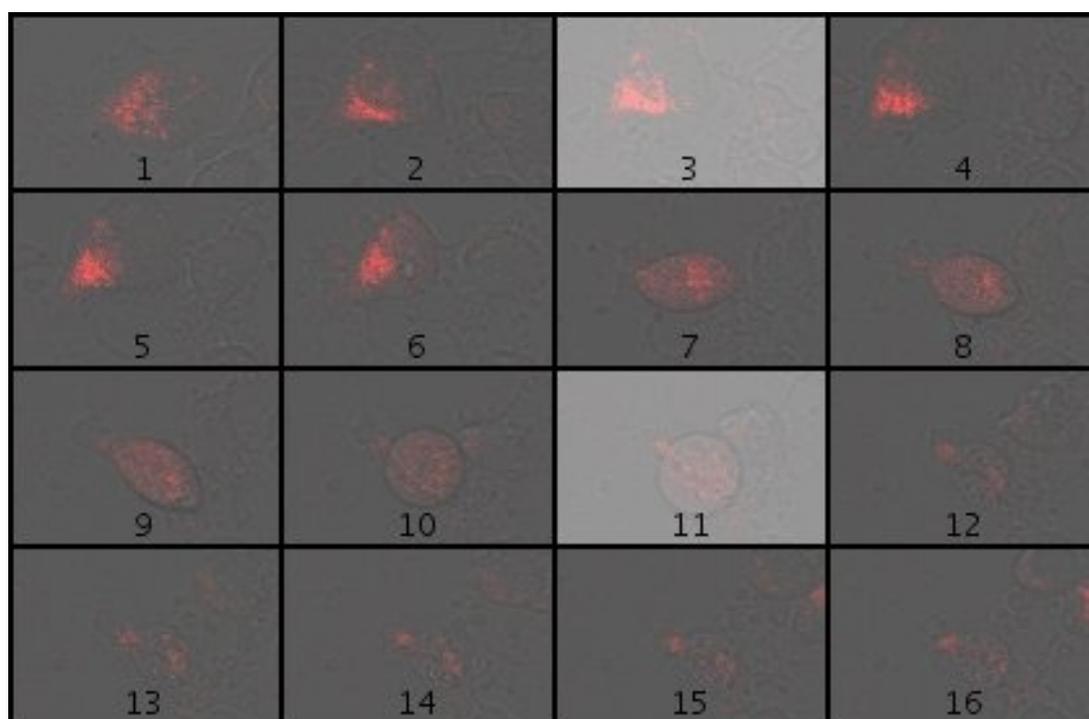
Nous avons voulu approfondir la caractérisation du phénomène de mort mitotique que nous observons. Notamment, la mort mitotique s'accompagne-t-elle d'une perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie? Mais plus loin encore, si perméabilisation il y a, est-elle complète au sein de la cellule? Douglas Green et son équipe ont en effet introduit le concept original de résistance par perméabilisation incomplète du réseau mitochondrial au niveau cellulaire [249]. L'idée est que la perméabilisation mitochondriale ne serait pas un phénomène binaire, et qu'une cellule pourrait subir une perméabilisation incomplète du point de vue de l'ensemble de son réseau mitochondrial. Le groupe de mitochondries intactes permettrait alors à la cellule de survivre et de reconstituer une population.

Appliquer ce concept à l'arrêt mitotique mène à des interrogations concernant la survie post-échappement. Serait-il possible que la perméabilisation incomplète soit un élément discriminant les populations cellulaires mourant après échappement, et celles survivant à l'issue de l'échappement? Nous avons commencé à développer les outils permettant de répondre à cette question. Les considérations suivantes sont donc techniques, mais il nous semblait intéressant de tout de même les présenter.

Comme souvent l'introduction de nouveaux concepts repose sur des outils, c'est le cas ici. Dans le cas des travaux de Douglas Green sur ce sujet, il s'agit d'une protéine de fusion : MTSHtra2/OmimCherry. Cette protéine est constituée de la séquence de ciblage mitochondrial d'Htra2/Omi recombinaisonnée avec mCherry. La protéine est donc localisée dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie et libérée dans le cytoplasme suite à la perméabilisation mitochondriale caractéristique de l'apoptose. Cependant, à l'inverse de tous les autres outils semblables qui avaient été utilisés jusqu'à présent, la protéine

est dégradée une fois dans le cytoplasme. Cela est due à la composante Htra2/Omi, qui est naturellement dégradé une fois dans le cytoplasme. Ainsi, l'utilisation de cette protéine limite le bruit de fond, et permet d'observer les mitochondries intactes.

L'équipe de D. Green nous ayant aimablement fourni le plasmide codant pour MTSHtra2/OmimCherry, nous l'avons utilisé pour produire des lentivecteurs. Les cellules MDA-MB-231 ont été infectées et sélectionnées par traitement antibiotique. Les cellules sélectionnées ont ensuite traitées à la staurosporine (contrôle positif du relargage du cytochrome *c*, et analysées par vidéomicroscopie confocale (Figure 6.1). Comme attendu, l'observation de la perméabilisation mitochondriale a été possible (Figure 6.1 vignette



**FIGURE 6.1 – Observation de la perméabilisation mitochondriale de cellules MDA-MB-231 exprimant MTSHtra2/Omi-mCherry.** Des cellules MDA-MB-231 ont été sélectionnées après infection par des lentivecteurs codant pour la protéine de fusion MTSHtra2/Omi-mCherry. Ces mêmes cellules ont été ensemencées sur des plaques Ibidi®, traitées à la staurosporine (2  $\mu\text{mol/l}$ ) et analysées par microscopie confocale pendant 20 h. Les images ont été prises à environ 1 h d'intervalle.

7 et suivantes). Aucune perméabilisation incomplète sur cellules vivantes n'a été observée dans cette expérience, car la concentration en staurosporine était importante, et aussi car cette observation nécessite l'inhibition chimique des caspases [249]. En outre, la dégradation de l'insert s'est produit, car l'intensité de la fluorescence diminue à partir de la vignette 7. Nous ne pouvons cependant pas conclure sur la complétion de cette dégradation dans la mesure où nous observons de la fluorescence résiduelle sur la vignette 16 alors que la cellule est morte. Cette fluorescence résiduelle peut en effet être due soit à une dégradation incomplète de l'insert, soit à une perméabilisation incomplète du réseau mitochondrial

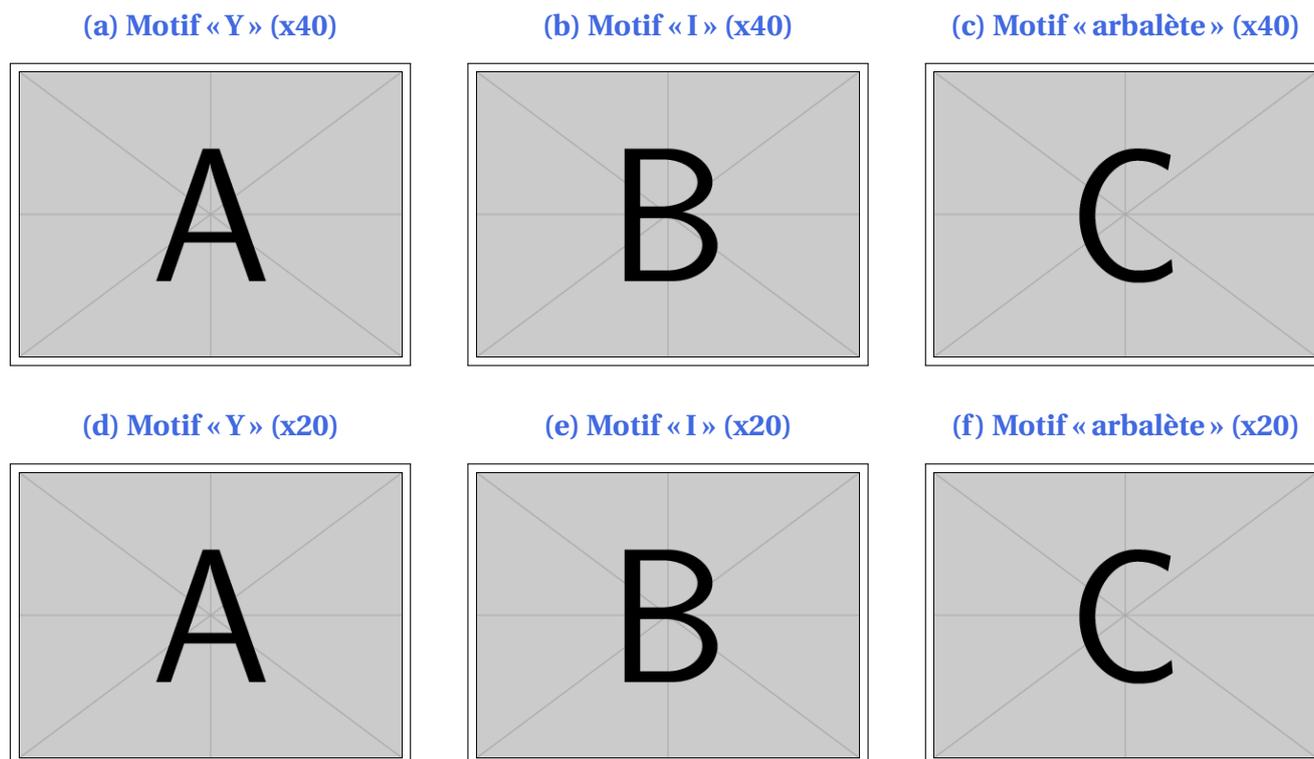
mais suffisant pour induire la mort.

## 6.2 Automatisation de l'analyse par l'utilisation de la technologie Cytoo®

Dans l'objectif d'adapter l'expérience pour une automatisation éventuelle de l'analyse, nous avons utilisé la technologie Cytoo® basée sur les excellents travaux de Manuel Théry [250]. Cette technologie repose sur l'utilisation de motifs de fibronectine sur lesquels les cellules adhèrent. Cela a permis M. Théry et son équipe d'étudier la morphogénèse cellulaire, ainsi que les forces exercées par les cellules adhérentes. Les lames Cytoo® ont ensuite été commercialisées. Les motifs de fibronectine sont de différentes formes et tailles, plus ou moins adaptées suivant le type de phénomène étudié. Néanmoins, un des gros avantages de ces lames est que les motifs sont nombreux, et espacés de manière régulière. Cette configuration est tout à fait adaptée pour une analyse cellule à cellule par microscopie, avec certes le biais de la signalisation déclenchée par les interactions intégrine-fibronectine, mais qui ne serait pas possible sans. En outre l'étalement, ainsi que la structure imposée aux cellules par la fibronectine facilite l'analyse du réseau mitochondrial.

Nous avons testé l'utilisation des lames Cytoo® sur nos cellules (Figure 6.2). Les cellules sélectionnées ont été encadrées et analysées par microscopie confocale. Les trois motifs sur lesquels les cellules adhéraient étaient ceux dit du « Y », du « I » et de l'« arbalète » (Figure 6.2, respectivement figures (6.2a et 6.2d), (6.2b et 6.2e), (6.2c et 6.2f)). Le motif du « I » ne semble pas adapté en raison de sa tendance à fixer plus d'une cellule pour ce type cellulaire. Les motifs du « Y » et de l'« arbalète » semblent eux tous deux intéressants pour notre étude.

Ces expériences, bien que préliminaires, sont encourageantes pour la faisabilité d'une étude de la perméabilisation mitochondrial pendant la mitose. Cependant, une incertitude demeure sur notre capacité à observer la perméabilisation spécifiquement pendant l'arrêt mitotique. L'organisation mitotique du réseau mitochondrial est en effet bien différente de celle de l'interphase, et rien ne garantit que l'insert que nous utilisons sera adapté à ce type d'observation.



**FIGURE 6.2 – Observation de l'adhérence de cellules MDA-MB-231 exprimant MTSHTra2/Omi-mCherry sur différents motifs de fibronectine. Des cellules MDA-MB-231 ont été sélectionnées après infection par des lentivecteurs codant pour la protéine de fusion MTSHTra2/Omi-mCherry. Ces mêmes cellules ont été ensemencées sur des lamelles Cytoo®, fixées, marquées au DAPI et analysées par microscopie (vert : fibronectine, rouge : MTSHTra2/Omi-mCherry et bleu : DAPI). Les différentes images correspondent aux différents motifs sur lesquels les cellules ont adhéré. (a,d) Le motif dit du « Y » au grossissement x40 et x20 respectivement, (d,e) pour le motif dit « I » et (c,f) pour le motif de l'« arbalète ».**

# Chapitre 7

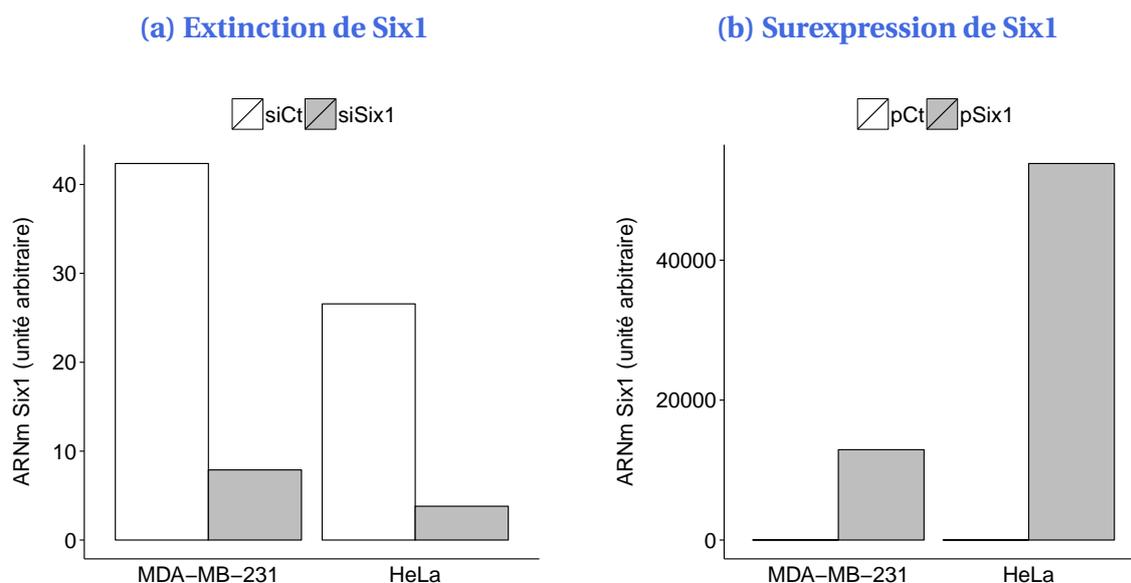
## Six1 comme facteur de résistance au paclitaxel ?

En parallèle de l'étude de l'arrêt mitotique, nous nous sommes également intéressés aux mécanismes plus généraux de résistance au paclitaxel. Notre équipe développe actuellement un outil d'évaluation de la résistance des tumeurs primaires mammaires. Cet outil est basé sur la récupération de fragments tumoraux issus de résections. Ces fragments sont coupés en tranches, puis mis en culture *ex vivo* en présence ou non de paclitaxel. À l'issue du traitement, les tranches sont fixées et marquées, par immuno-histochimie, pour l'expression de la caspase-3 active, caractéristique de l'apoptose. Ce marquage permet la séparation des tumeurs en deux groupes : résistantes ou sensibles au paclitaxel. Les tumeurs sont aussi soumises à une analyse transcriptomique, le but étant de trouver des gènes discriminant les tumeurs résistantes des tumeurs sensibles, et de déterminer un signature prédictive de réponse au paclitaxel.

Parmi les gènes surexprimés dans les tumeurs résistantes, se trouvait SIX1. SIX1 code pour la protéine Six1 (**S**ine oculis homeobox homolog **1**), qui est un facteur de transcription connu mais peu étudié dans le cancer du sein. Il agit en tant que régulateur du développement, et est en outre fréquemment dérégulé dans les cancers [251].

### 7.1 Six1 favorise le maintien de l'arrêt mitotique

Afin de savoir si Six1 pouvait jouer un rôle dans l'arrêt mitotique, nous avons éteint ou surexprimé ce dernier dans nos cellules. (Figure 7.1). Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec un siSix1 ou un siCt (Figure 7.1a). Alternativement, les cellules ont été transfectées avec un plasmide codant pour Six1 ou un plasmide contrôle (Figure 7.1b). Les cellules ont été récupérées 48 heures après transfection, et l'expression de Six1 a été analysée par RT-qPCR. Nous avons observé l'efficacité de l'extinction, ou de la surexpression de Six1 dans cette lignée cellulaire.



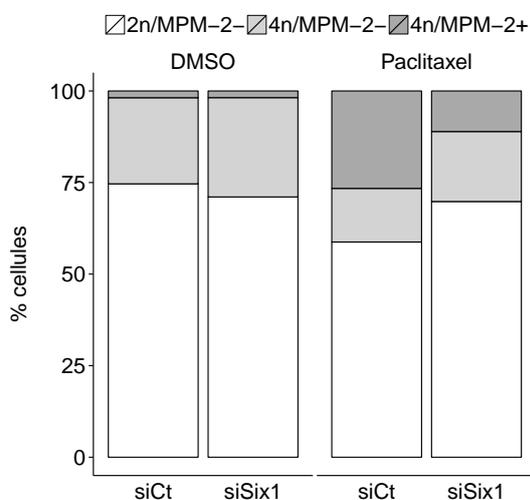
**FIGURE 7.1 – Extinction et surexpression de Six1 dans les cellules MDA-MB-231 et HeLa.** Les cellules MDA-MB-231, et HeLa ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCt) ou un siRNA dirigé contre Six1 (a), et alternativement avec un plasmide contrôle (pCt) ou un plasmide codant pour Six1 (b). Après 48 h les cellules ont été récupérées puis analysées par RT-qPCR pour l'expression de Six1.

L'extinction ou la surexpression de Six1 a ensuite été couplée au traitement par le paclitaxel (Figure 7.2). Les cellules ont été traitées au paclitaxel 24 heures après transfection, pour une durée de 48 heures. Nous constatons que, sous paclitaxel, la population de cellules 4n/MPM-2+ est moins importante suite à l'extinction de Six1 qu'après transfection d'un siCt (Figure 7.2a). En accord avec cela, la population 4n/MPM-2+, induite par le paclitaxel, augmente lorsqu'elle est couplée à la surexpression de Six1 comparativement au contrôle (Figure 7.2b). Ces deux expériences suggèrent soit que l'arrêt mitotique est moins bien maintenu lorsque Six1 est absent, et qu'il est plus soutenu lorsque Six1 est présent, soit qu'il se produit plus de mort mitotique lorsque Six1 est absent.

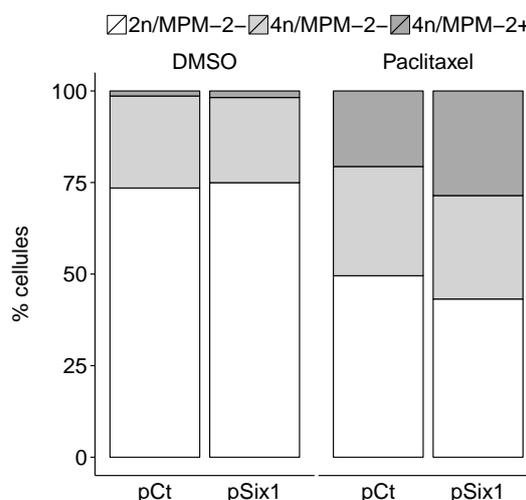
## 7.2 Six1 protège de la mort induite par le paclitaxel

Suite à cela nous avons voulu évaluer si cet effet de Six1 pouvait impacter sur la mort induite par le paclitaxel (Figure 7.3). Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été transfectées avec un siSix1 (Figure 7.3a) ou avec un plasmide codant pour Six1 (Figure 7.3b), avec pour contrôles respectifs un siCt et un pCt. Un inhibiteur d'Eya2 (**Eyes absent homolog 2**) a aussi été testé (Figure 7.3c). En effet, un inhibiteur de Six1 n'ayant pas encore été « désigné », l'inhibition de Six1 par voie chimique repose sur celle de son co-activateur Eya2. Six1 ne peut fonctionner sans Eya2, son interaction avec ce dernier est nécessaire à

## (a) Analyse de l'influence de l'extinction de Six1 sur le cycle cellulaire



## (b) Analyse de l'influence de la surexpression de Six1 sur le cycle cellulaire

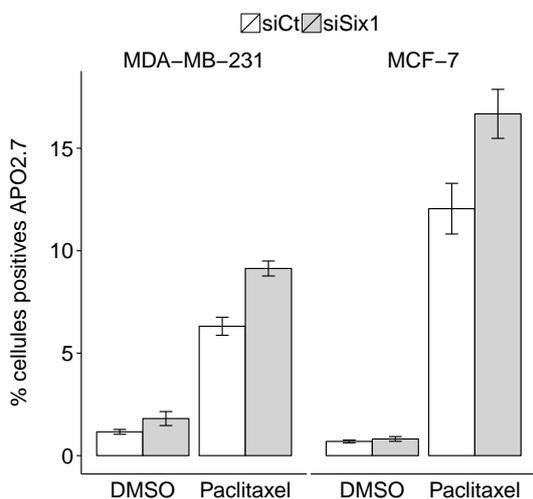


**FIGURE 7.2 – Six1 favorise le maintien de l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel dans les cellules MDA-MB-231.** Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCt) ou un siRNA dirigé contre Six1 (a). Alternativement, les cellules ont été transfectées avec un plasmide contrôle (pCt) ou un plasmide codant pour Six1 (b). 24 heures plus tard, les cellules ont été traitées au DMSO ou au paclitaxel (70 nmol/l). Après 48 h les cellules ont été récupérées puis marquées à l'iodure de propidium et avec un anticorps dirigé contre MPM-2. Enfin, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux.

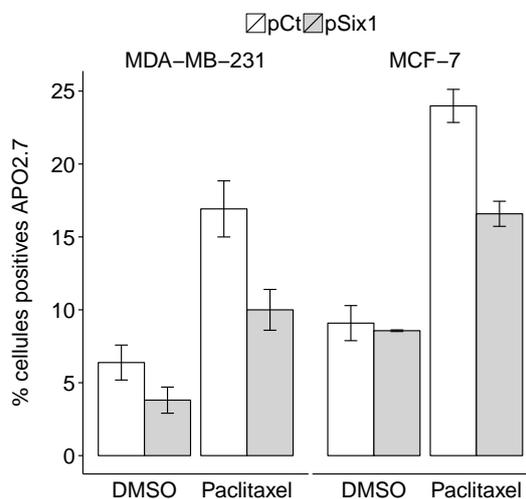
l'activation de la transcription de ses gènes cibles [252]. Ainsi, l'inhibition d'Eya2 inhibe l'activité transcriptionnelle de Six1. Les cellules ont donc été transfectées (siSix1 ou pSix1) ou traitées (Eya2i), puis 24 heures après, traitées au paclitaxel pendant 24 heures pour être enfin analysées par cytométrie en flux via un marquage APO2.7. Nous constatons que, dans les deux lignées testées, la mort induite par le paclitaxel est augmentée suite à l'extinction de Six1 par ARN interférence. Les mêmes effets sont observés dans le cas du traitement par l'inhibiteur d'Eya2, ce qui suggèrent que l'action de Six1 est dépendante de son activité transcriptionnelle. En concordance avec cela, nous avons observé un effet protecteur de la surexpression de Six1 en réponse au paclitaxel (Figure 7.3B), ce qui corrobore les observations précédentes. Cependant, les effets constatés, qu'ils soient délétères ou protecteurs, sont également observables en absence de paclitaxel. Nous ne pouvons donc pas conclure sur un effet spécifique de l'arrêt mitotique.

Les expériences menées sur Six1 suggèrent que son activité transcriptionnelle inhibe la mort mitotique, mais que cet effet est plus générale, et n'est pas spécifique de l'arrêt mitotique. D'autres modes d'induction de la mort n'ont pas été testés en combinaison avec l'extinction (ou la surexpression) de Six1.

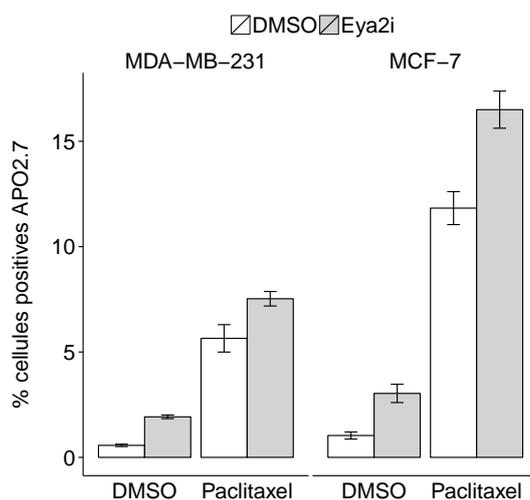
(a) Analyse de l'influence de l'extinction de Six1 sur la mort induite par le paclitaxel



(b) Analyse de l'influence de la surexpression de Six1 sur la mort induite par le paclitaxel



(c) Analyse de l'influence de l'inhibition de Six1 sur la mort induite par le paclitaxel



**FIGURE 7.3 – Six1 inhibe la mort cellulaire induite par le paclitaxel.** Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été transfectées avec un siSix1 (a), un pSix1 (b) ou traitées avec un inhibiteur d'Eya2 (c, Eya2i, 80  $\mu\text{mol/l}$ ). Les contrôles associés ont été respectivement un siCt, un pCt et du DMSO. Les cellules ont été traitées 24 h plus tard au DMSO ou au paclitaxel (70 nmol/l) pendant 48 h, récupérées, marquées avec l'anticorps APO2.7 et analysées par cytométrie en flux.

# **Quatrième partie**

## **Article**

# **Cinquième partie**

## **Discussion**

En dehors de la chirurgie et de la radiothérapie, le traitement pharmacologique du cancer du sein repose sur la chimiothérapie, l'hormonothérapie et les thérapies ciblées pour les patients éligibles. La chimiothérapie est essentielle dans le cas du cancer du sein métastatique, et surtout pour le cancer du sein triple négatif pour lequel il n'existe pas de thérapies ciblées. Elle est basée sur une combinaison taxanes-anthracyclines, et a montré son efficacité. Cependant, des phénomènes de résistance, et des toxicité (neuropathie pour le paclitaxel) sont fréquemment observés. L'étude que nous avons réalisé au cours de ces trois années de thèse démarre de ce constat. Une méthode permettant de lutter efficacement contre les mécanismes de résistance, pourrait être une combinaison moléculairement justifiée des traitements. Dans ce registre nos travaux s'attachent à montrer que cibler les protéines de la famille de Bcl-2, possiblement grâce des BH3-mimétiques, peut aider à lutter contre l'un des mécanismes de résistance aux taxanes, qui est l'échappement à l'arrêt mitotique. Plus précisément, nos travaux participent à la justification de l'utilisation de la combinaison paclitaxel-ABT-737 pour traiter le cancer du sein, notamment le cancer du sein triple-négatif.

Le paclitaxel est un composé qui, via son action sur les microtubules, empêche la séparation chromatidienne, et induit un arrêt mitotique par non levée du point de contrôle mitotique. Deux devenir cellulaires, mutuellement exclusifs, suivent cet arrêt mitotique : la mort mitotique et l'échappement à l'arrêt mitotique (Figure 1.7). Par la suite, l'échappement à l'arrêt mitotique peut être suivi par la mort (mort post-échappement) ou la survie des cellules (survie post-échappement). Nos résultats montrent que Bcl-x<sub>L</sub> est nécessaire à la survie pendant l'arrêt mitotique, et à la survie post-échappement (Figure 3.5b) à la suite d'un traitement au paclitaxel. Nous avons observé que l'extinction de Bcl-x<sub>L</sub> induisait la mort mitotique des cellules soumises à un arrêt mitotique (Figure 3.3a), et que cette mort mitotique survenait plus rapidement que l'échappement à l'arrêt mitotique (Figure 3.4). Selon le modèle des réseaux compétitifs (Figure 1.8), cet effet de Bcl-x<sub>L</sub> sur la survenue de l'échappement passe par la génération de signaux de survie pendant l'arrêt mitotique, laissant aux cellules le temps d'atteindre le seuil d'échappement. La mort mitotique était également observée lorsque le traitement au paclitaxel était combiné à l'inhibition de Bcl-x<sub>L</sub> par l'ABT-737 (Figure 3.3b), qui inhibe aussi Bcl-2 et Bcl-w. Ces observations constituent un argument en faveur de l'utilisation d'une combinaison paclitaxel-ABT-737 pour lutter contre le phénomène de résistance que représente l'échappement à l'arrêt mitotique.

Le paclitaxel empêche la levée du point de contrôle mitotique. Moléculairement, cela se traduit par l'inhibition de la dégradation de la cycline B1, et de la sécurine. Cette inhibition est permise par la séquestration de Cdc20, partenaire nécessaire à l'activité de l'APC/C, la ligase E3 responsable de l'ubiquitination de la cycline B et de la sécurine (Figure 1.3). Une amélioration des traitements par les anti-mitotiques peut passer par une meilleure compréhension des mécanismes gouvernant la décision cel-

lulaire entre mort mitotique et échappement, et/ou par l'identification de nouvelles cibles permettant d'induire l'arrêt mitotique de manière plus efficace. Dans cet objectif, l'extinction de Cdc20 constitue un nouveau moyen d'induction de l'arrêt mitotique. Cet arrêt mitotique est plus physiologique, car il ne touche pas les microtubules, et donc est potentiellement moins toxique. De plus, il ne dépend pas de la robustesse du point de contrôle mitotique, c'est à dire de la capacité de MAD2 et BUBR1 à séquestrer Cdc20 (Figure 1.4), mais cible directement la progression, la sortie de la mitose. Nous avons constaté que l'extinction de Cdc20 induit l'arrêt mitotique, et que cet arrêt mitotique, contrairement à celui induit par le paclitaxel, ne semble pas être suivi par l'échappement à l'arrêt mitotique (Figure 1.4). L'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20, provoque un faible pourcentage de mort (environ 10 %), et cette mort était indépendante des caspases bien qu'une activation de ces dernières se produisait, et que nous avons qualifié de sublétales (Figure 1.6). De manière intéressante, cette mort indépendante des caspases « switchait » vers un mort dépendante des caspases, lorsque l'arrêt mitotique était couplé à l'extinction de Cdc20 ou à l'ABT-737 (Figures 2.4 et 2.6, respectivement). De même, ce « switch » de la mort induisait aussi une dépendance à Bax (Figure 5.1c). S'ajoute à cela l'observation, par profilage BH3, que l'arrêt mitotique module le profil d'amorçage des cellules, et fait apparaître une dépendance à Bcl-x<sub>L</sub> (Figure 2.2a). Cela indique que, pendant l'arrêt mitotique, un mécanisme de mort mal défini (indépendant des caspases, de Bax et de Bak) se produit (les 10 % de mort cités plus haut), et que parallèlement un mécanisme d'apoptose classique se met en place, dont Bcl-x<sub>L</sub> empêche l'exécution.

Enfin, la phosphorylation de Bcl-x<sub>L</sub> sur la sérine 62 est importante dans cette fonction de Bcl-x<sub>L</sub> pendant l'arrêt mitotique. En effet, nous avons observé que (1) Bcl-x<sub>L</sub> était phosphorylé sur cette même sérine lors de l'arrêt mitotique (Figure 4.3a). (2) L'absence de cette phosphorylation, via une mutation de la sérine 62 par une alanine, augmentait la capacité de Bcl-x<sub>L</sub> à protéger de la mort mitotique (Figure 4.3b). Finalement, nous avons observé (3), toujours via des formes mutées de Bcl-x<sub>L</sub>, et en utilisant la technique du BRET, que la phosphorylation de Bcl-x<sub>L</sub> sur la sérine 62 déstabilisait son interaction avec Bax pendant l'arrêt mitotique (Figure 5.2).

L'ensemble de ces résultats seront discutés dans cette partie.

## **Extinction de Cdc20 : blocage définitif versus échappement**

Un point important sur lequel reposent nos travaux est la comparaison de deux méthodes d'induction de l'arrêt mitotique : le traitement par le paclitaxel et l'extinction de Cdc20. Ces deux méthodes empêchent toutes les deux la levée du point de contrôle mitotique, mais ont des modes d'action différents. Alors que le paclitaxel active le point de contrôle mitotique de manière indirecte, via son effet sur

les microtubules, l'extinction de Cdc20, elle, maintient le point de contrôle mitotique actif, en supprimant la protéine nécessaire à son inactivation. Nous avons observé que ces deux méthodes induisaient un arrêt mitotique transitoire et soutenu, dans le cas du paclitaxel et de l'extinction de Cdc20 respectivement, dans la lignée triple-négative MDA-MB-231. Sous paclitaxel, nous observons que l'échappement à l'arrêt mitotique survient, car la cycline B est tout de même dégradée pendant l'arrêt mitotique. Cette dégradation est plus lente, et les mécanismes en étant responsables ne sont pas connus. Cependant des résultats suggèrent que cette dégradation n'est pas indépendante de l'APC/C [79]. En effet, un mutant de la cycline B dépourvu de D-box, et ne pouvant donc pas interagir avec Cdc20, est dégradé encore plus lentement pendant l'arrêt mitotique [79]. L'idée est donc que, sous extinction de Cdc20, il ne peut se produire d'échappement à l'arrêt mitotique car la cycline B ne peut être dégradée, ce que nous observons (Figure 1.4a). Toutefois cela est contredit par les études de deux autres équipes [253, 254]. Par conséquent, la question qui se pose naturellement est : **Peut-il y avoir échappement à l'arrêt mitotique sous extinction de Cdc20 ?**

Techniquement, notre observation d'un blocage définitif suite à l'extinction de Cdc20 (Figure 1.4) repose sur une cinétique de double-marquages des cellules en mitose et une analyse par cytométrie. L'observation inverse des deux autres équipes repose sur des immunoblots de la cycline B dans le cas des travaux de Timothy Chambers [254], et sur des simples marquages de l'ADN en cytométrie accompagnés d'immunoblots de la cycline B, et de la forme phosphorylée de l'histone H3, dans le cas de l'équipe d'Hoi Tang Ma [253]. Le principal défaut de ces analyses est qu'elles ne s'accompagnent pas d'une cinétique d'analyse de la mort induite par l'extinction de Cdc20. En effet, dans l'idée où l'extinction de Cdc20 induit la mort mitotique, si cette mort est très importante, la population cellulaire restante analysable sera une population interphasique non entrée en mitose. Ceci donnera alors l'illusion que les cellules ont échappé à l'arrêt mitotique, car les cellules restantes exprimeront de faibles niveaux de cycline B. La même remarque peut être faite dans le cas de l'analyse par cytométrie effectuée par l'équipe d'Hoi Tang Ma. Leurs résultats indiquent une réapparition de la population  $2n$  après l'arrêt mitotique ce qui correspond non pas à un échappement, qui se traduirait par une population  $4n$ , mais à une réelle division cellulaire. La preuve irréfutable que l'extinction de Cdc20 est ou non suivie d'échappement pourrait être fournie par une approche, non pas statique, mais dynamique par vidéomicroscopie, la même que nous avons utilisé pour le paclitaxel (Figure 3.3). La raison pour laquelle cette méthode n'a pas été utilisée dans le cas de Cdc20 est l'absence d'inhibiteur chimique de cette protéine. L'approche par ARN interférence est possible, mais pas vraiment adaptée à la vidéomicroscopie notamment à cause de l'efficacité de transfection. Une approche basée sur l'infection par des vecteurs viraux codant pour un shRNA ciblant Cdc20 est adaptée, mais complexe à mettre en oeuvre, car l'infection peut provoquer la mort (même si elle est faible), ce qui rendra difficile la sélection et la manipulation des cellules. L'approche idéale serait

une infection par des vecteurs viraux codant pour un shRNA inducible. Dans un objectif de continuité et de cohérence, cette approche est actuellement développée par notre équipe.

Biologiquement maintenant, les expériences réalisées par les équipes d'Hoi Tang Ma et Timothy Chambers l'ont été sur la lignée HeLa et la lignée DLD-1 (**D. L. Dexter 1**) respectivement, alors que dans notre cas la lignée MDA-MB-231 a été utilisée. Il est fort probable que le contexte cellulaire participe aux divergences entre les observations, une variable que l'équipe de Timothy Chambers a très bien su exploiter dans ses travaux. En effet dans leurs mains, l'échappement à l'arrêt mitotique suite à l'extinction de Cdc20 n'a été constaté que dans une seule lignée, la lignée DLD-1, qui alors été catégorisée comme « encline à l'échappement », en opposition avec la lignée HT29 (**H**uman **t**umor **29**) qui ne l'était pas. Cette caractéristique de la lignée DLD-1 est due, selon eux, au caractère non persistant de la cycline B dans ces cellules, et les auteurs ne vont pas plus loin. Expliquer l'échappement à l'arrêt mitotique sous extinction de Cdc20 revient à s'intéresser à l'activité de Cdk1 dans ces conditions, et par extension à la dégradation de la cycline B. De là, quatre hypothèses émergent :

- l'absence de Cdc20 est compensée par l'autre activateur d'APC/C, Cdh1 ;
- la dégradation s'effectue via l'APC/C en l'absence d'activateur ;
- la dégradation s'effectue via un autre acteur ;
- la dégradation n'est pas active et dépend de la stabilité intrinsèque de la protéine.

La dégradation de la cycline B par le couple APC/C/Cdh1, peut être envisagée dans la mesure où ce phénomène est observé au cours du cycle cellulaire [255], et est aussi nécessaire à la sortie de la mitose « normale » [256]. Le couple APC/C/Cdh1 est en effet responsable de la seconde phase de dégradation de la cycline B (après celle effectuée via Cdc20) nécessaire à la sortie de mitose [256]. Cependant, l'observation que Cdk1 phosphoryle Cdh1, et déstabilise sa liaison à l'APC/C [40, 257], contredit cette hypothèse. À moins bien sûr qu'un autre mécanisme de dégradation de la cycline B permette l'abaissement de l'activité de Cdk1 à un niveau tel que la formation du complexe APC/C/Cdh1 soit possible, mais cela n'a jamais été montré.

Considérer que l'APC/C puisse dégrader la cycline B en l'absence d'activateur vient de l'observation que l'APC/C participe aussi à la liaison aux D-box, et donc à ses substrats [48]. Cependant cette observation ne prouve pas que la dégradation peut se produire de manière suffisante dans ces conditions. Une dégradation non active de la cycline B pendant l'arrêt mitotique n'est pas à exclure. Elle dépendrait de la demi-vie de la protéine, qui est estimée à plus de 9 heures en condition d'arrêt mitotique (elle est de moins de 2 heures en conditions « normales ») [258, 259]. Enfin, la dégradation de la cycline B par un acteur non encore identifié n'est pas à exclure.

Toujours sur l'échappement à l'arrêt mitotique, nous pouvons envisager des conditions où l'activité de Cdk1 serait directement affectée sans atteinte de la cycline B. Une direction possible serait d'étudier les activités des inhibiteurs de Cdk1 (Wee1, Wee2 et Myt1), ou celles de phosphatases tels que PP2A dans ces conditions d'arrêt mitotique.

Établir les conditions de l'échappement à l'arrêt mitotique sous extinction de Cdc20 peut sembler accessoire et secondaire, mais c'est à notre sens le contraire. Un article très important, non pas sur les concepts, mais sur la stratégie chimiothérapeutique a été publié par l'équipe de Timothy Mitchison [260]. Cet article montre que cibler directement les protéines du point de contrôle mitotique, et donc l'échappement, est plus efficace que de les cibler indirectement par des composés tels que le paclitaxel. Cette constatation fait de Cdc20 une future cible de choix pour les recherches à venir. De là, il est tout à fait possible d'envisager de substituer l'utilisation des taxanes par celle d'un composé inhibant Cdc20. Cela fera d'autant plus sens si un lien direct entre point de contrôle mitotique et régulation de la mort cellulaire est un jour clairement caractérisé.

## Mitose : un état de vulnérabilité ?

Le profilage BH3 est une récente et prometteuse technique mise au point par l'équipe d'Anthony Letai. Elle permet principalement d'évaluer si une cellule est encline à déclencher la voie mitochondriale de l'apoptose ou non (cellule amorcée ou non), mais détermine également la dépendance des cellules à telle ou telle protéine anti-apoptotique de la famille de Bcl-2. Sa grande force est son caractère fonctionnel, car elle n'étudie pas le réseau complexe d'interactions entre les protéines de la famille de Bcl-2, et aussi de leur statut conformationnel actif, pour se concentrer sur leurs effets, à savoir la libération de cytochrome *c*. Ses applications présentent un intérêt clinique [244]. Dans notre cas c'est son aspect fondamental qui nous a intéressé. Au cours d'un séjour dans le laboratoire d'Anthony Letai, nous avons réalisé un tel profilage en condition d'arrêt mitotique (extinction de Cdc20 et traitement au paclitaxel) (Figure 2.2). Cette expérience représente, pour nous tout du moins, un intérêt important d'un point de vue conceptuel. Le statut d'amorçage d'une cellule bloquée en mitose, surtout physiologiquement par l'extinction de Cdc20, n'avait jamais été évalué avant, et cela est important dans la définition que l'on peut avoir de la mort mitotique, voire plus généralement de la mitose.

Il est de coutume de dire que la mitose est la période de plus haute vulnérabilité de la vie d'une cellule. Il y a plusieurs raisons à cela, mais toutes sont liées au matériel génétique, dont le maintien de l'intégrité est indispensable. Durant la mitose, l'extrême condensation de l'ADN fait que des cassures peuvent apparaître spontanément, et le risque de voir ces dommages se produire augmente avec

le temps passé en mitose, augmentant ainsi le risque d'instabilité génétique. Ainsi, lorsque l'on parle de vulnérabilité, cela s'applique au niveau de la cellule elle-même, mais aussi à l'organisme tout entier, puisque l'instabilité génétique peut aboutir notamment à une dérégulation de la prolifération. Le finalisme nous ferait donc dire que l'intérêt de la cellule, et de l'organisme, serait de réaliser des mitoses les moins longues possibles, mais aussi de senser les mitoses trop longues car elles peuvent aboutir à des cellules à l'ADN modifié. De là, éliminer les mitoses anormales représenterait un mécanisme de protection non négligeable. Naturellement, la question qui se pose alors est : **Une cellule en arrêt mitotique est-elle plus encline au suicide ?**

Sur un plan strictement apoptotique, le profilage BH3 se propose de répondre à cette question. Dire d'une cellule qu'elle est amorcée se base sur sa capacité à relarguer le cytochrome *c* présent dans l'espace inter-membranaire, c'est à dire à induire la MOMP, lorsqu'elle est mise en présence des domaines BH3, des BH3-only activateurs Bim et Bid. Nous avons pu constater qu'en l'absence de traitement les cellules étaient sensibles aux peptides BH3 de Bim et Bid. L'extinction de Cdc20, ou le traitement par le paclitaxel, n'induisaient pas d'augmentation de la sensibilité aux peptides BH3 de Bid ou Bim. Ainsi, une cellule en arrêt mitotique, via l'activation du point de contrôle mitotique, n'est pas plus amorcée pour l'apoptose. Bien sûr, le point de contrôle mitotique bloque les cellules à un moment précis de la mitose, la prométaphase, et rien n'exclue la possibilité d'une augmentation de l' amorçage en métaphase, et aux phases suivantes de la division cellulaire.

Nous avons observé une modulation du profil dans la lignée MDA-MB-231. Cette modulation se caractérisait par une augmentation de la réponse apoptotique aux peptides BH3 de Bad, Puma, et Hrk. Nous avons interprété cela comme l'apparition d'une dépendance à Bcl-x<sub>L</sub>, car c'est l'unique interagissant du peptide BH3 d'Hrk (Figure 2.1). Cette dépendance à Bcl-x<sub>L</sub> sera discutée plus bas, cependant il est à noter que, même en absence d'amorçage direct, l'arrêt mitotique n'est pas un état neutre d'un point de vue apoptotique.

Il est important de préciser que l'analyse par profilage BH3 a été réalisée sur l'ensemble des cellules, *i.e.* des cellules qui ne sont pas toutes en arrêt mitotique du fait d'une efficacité de transfection d'environ 50 %. Cette analyse se fait par cytométrie en flux. Cela permet l'ajout de marquages pour spécifiquement isoler les cellules en mitose. Nous avons tenté de réaliser cela lors de notre visite dans le laboratoire d'Anthony Letai, cependant nous n'avons pu finaliser la mise au point d'un triple-marquage MPM-2-ADN-cytochrome *c*, la principale raison étant des difficultés dans la séquence des marquages immunologiques, qui dépendent eux-mêmes de la séquence des perméabilisations. La mise au point de ce marquage aurait été très utile, car elle aurait permis de gagner en sensibilité en comparant les cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Plus loin, elle aurait également permis d'étudier

les cellules en mitose normale. Ces dernières représentent moins de 2 % des cellules en absence de synchronisation. Le triple-marquage permettrait d'identifier leur nombre à l'acquisition, et ainsi d'enregistrer un nombre significatif d'évènements. Une autre approche possible est le « mitotic shake-off », qui consiste à enrichir les échantillons en cellules mitotiques, moins adhérentes, par agitation douce. Cette approche a été testée, mais ne permettait pas d'obtenir suffisamment les échantillons.

## L'activation des caspases est-elle une caractéristique de la mort mitotique ?

Nous avons observé que les caspases n'étaient pas nécessaires à la mort mitotique induite par l'extinction de Cdc20 seule, mort quantitativement faible touchant environ 10 % des cellules de la population totale (Figure 1.6). De plus, nous avons évalué l'activation des caspases suite à l'extinction de Cdc20, et il en ressort qu'elles sont effectivement activées. Ceci suggère que l'extinction de Cdc20 induit une activation sublétales des caspases, puisque nous n'avons constaté aucun effet le Q-VD-Oph sur la mort. Au delà de cette simple constatation, c'est la question de la définition de la mort mitotique qui se pose. Habituellement, la mort mitotique est désignée sous le terme de « catastrophe mitotique ». La catastrophe mitotique, loin d'être bien définie, regroupe un certain nombre de phénomènes différents, c'est d'ailleurs pour cela que nous ne l'avons pas utilisé jusqu'à présent. Derrière le terme de catastrophe mitotique, il y a au moins trois programmes de mort différents [92].

- **la mort mitotique**, celle qui nous intéresse, caractérisée par une activation de la machinerie de mort en présence de niveaux élevés de cycline B, et se produisant avant l'échappement à l'arrêt mitotique ;
- **la mort post-échappement**, qui s'exécute lorsque la cellule atteint la pseudo-interphase ;
- **la sénescence post-échappement**.

Cette définition a été introduit par l'équipe de Guido Kroemer. Elle stipule que les deux dénominateurs communs à ces trois phénomènes sont les atteintes à l'appareil mitotique et l'arrêt mitotique [92]. De cette définition sont exclus les phénomènes de mort mitotique induits par les dommages de l'ADN, choix compréhensible quand on sait que ce type de mort prend sa source en phase G<sub>2</sub>, et qu'elle ne présente pas d'atteinte à l'appareil mitotique. Sont exclus également les phénomènes de poursuite du cycle cellulaire après échappement à l'arrêt mitotique. Ce choix est moins compréhensible, car ces phénomènes présentent les deux dénominateurs communs de la définition. Il est vrai qu'ils n'aboutissent pas à la mort, cependant c'est aussi le cas de la sénescence post-échappement. Dans un souci de clarté et de compréhension, nous n'utiliserons pas le terme de catastrophe mitotique, et ferons la distinction entre les trois phénomènes de mort qu'il regroupe. Ainsi, la discussion des caractéristiques de la mort

mitotique concernera principalement celle induite par la non levée du point de contrôle mitotique, notamment par les poisons des microtubules.

Contrairement à nos résultats, qui révèlent une mort indépendante des caspases, au moins quatre études montrent, de façon claire, que l'activation des caspases est nécessaire à l'induction de la mort mitotique. La première a été réalisée par l'équipe de Stephen Taylor [80]. Techniquement, cette étude se base sur l'utilisation de la vidéomicroscopie. Ainsi, la détermination de la mort mitotique, ou de l'échappement, est directement observée et non pas interprétée. Ces travaux montrent qu'un inhibiteur de KIF11 (**K**inesin family **m**ember **11**) (une protéine motrice du fuseau mitotique) induit une majorité de morts mitotiques dans les cellules HCT116 (**H**uman colon tumor **116**). L'ajout d'un inhibiteur des caspases à ce traitement réduit drastiquement la proportion de morts mitotiques en faveur de la mort post-échappement, mais aussi en faveur de la survie post-échappement, ce qui suggère que la mort post-échappement pourrait être également dépendante des caspases. La seconde étude a été réalisée par l'équipe de Paul Clarke [86]. À la différence de la première, elle ne représente pas une preuve directe de la nécessité de l'activation des caspases pour la mort mitotique, mais ce n'était pas le but de l'étude. Dans ces travaux la détection de la mort mitotique se base sur la cytométrie en flux via un double-marquage caspase-3 active-histone H3 phosphorylée sur la sérine 10. Les auteurs montrent que, dans la lignée U2OS (**U2** osteosarcoma), et durant l'arrêt mitotique induit par le nocodazole, le complexe cycline B-Cdk1 phosphoryle la caspase-9 sur la thréonine 125 pour inhiber son activation. La surexpression d'une forme mutée non phosphorylable de la caspase-9 diminue le nombre de morts mitotiques induites par le nocodazole. La troisième étude est issue du laboratoire de Timothy Mitchison, et utilise les lignées MCF-7, HCT116 et RPE-1 (**R**etinal **p**igment **e**pithelial **1**) [93]. Elle montre qu'un traitement de ces cellules avec un inhibiteur de KIF11 induit l'activation des caspases 7, 9 et 3. Les preuves de cette activation sont indirectes. Elles se basent sur l'apparition de dommages de l'ADN via la dégradation d'ICAD par les caspases, et donc l'activation subséquente de CAD. La dernière étude est plus ambiguë. Elle a été réalisée par l'équipe de Conly Rieder, sur des cellules RPE-1 [91], et montre, via des analyses par vidéomicroscopie, que l'inhibition des caspases par du Q-VD-OPh protège de la mort mitotique induite par le nocodazole. En revanche, l'inhibition ciblée de la caspase-3 n'a aucun effet, et plus intrigant, l'inhibition de la caspase-9 sensibilise à la mort mitotique, suggérant que cette dernière est nécessaire à l'échappement.

Parallèlement, il a également été montré que la mort mitotique pouvait être indépendante des caspases. Cette idée est défendue par l'équipe de Katsumi Kitagawa. Cette équipe est en mesure d'induire la mort mitotique de cellules HeLa en combinant un traitement par des poisons des microtubules, comme le paclitaxel et le nocodazole, avec l'extinction de BUB1 (**B**udding **u**ninhibited by **b**enzimidazoles **1**) par

ARN interférence. La mort mitotique était détectée par immunofluorescence (essai TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) combiné avec un immunomarquage de l'histone H3 phosphorylée sur la sérine 10). L'ajout d'un inhibiteur des caspases n'empêchait pas la survenue de la mort mitotique.

La synthèse de ces études montre que l'activation des caspases comme condition *sine qua non* à la mort mitotique ne fait pas consensus, même si la majorité des articles arguent en faveur de leur implication. Cependant, il est frappant de constater que nous comparons ici différentes méthodes d'induction de l'arrêt mitotique. Les observations de la non implication des caspases sont issues d'expériences réalisées avec des poisons des microtubules combinés à l'extinction de BUB1. Cela représente des conditions toutes particulières comparé aux travaux montrant l'inverse, qui utilisent soit des inhibiteurs de KIF11, soit du nocodazole. La mort mitotique est un contexte mal défini. L'opposition entre ces études pourrait résider dans les différences de contexte cellulaire, et dans la manière d'induire l'arrêt mitotique.

## Dépendance à Bcl-x<sub>L</sub> pendant l'arrêt mitotique

Nous avons montré que Bcl-x<sub>L</sub> était impliqué dans la survie des cellules MDA-MB-231 pendant l'arrêt mitotique. Cette affirmation repose principalement sur trois éléments :

- l'arrêt mitotique fait apparaître un profil de sensibilité typique de Bcl-x<sub>L</sub> (profilage BH3, figure 2.2) ;
- en condition d'arrêt mitotique, l'extinction de Bcl-x<sub>L</sub> induit la mort mitotique (Figure 3.3a) ;
- en condition d'arrêt mitotique, la surexpression de Bcl-x<sub>L</sub> empêche la mort mitotique (Figure 3.5b).

Ce rôle de Bcl-x<sub>L</sub> a été observée dans deux lignées : MDA-MB-231 et CAL-51. Les réponses de ces deux lignées sont néanmoins différentes. La lignée CAL-51 présente une double-dépendance à Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1, alors que la lignée MDA-MB-231 présente une stricte dépendance à Bcl-x<sub>L</sub>. Cette dépendance de la lignée MDA-MB-231 pose question. Les mécanismes de régulation de la mort mitotique par Mcl-1 sont bien définis, avec une phosphorylation suivie, d'une dégradation impliquant FBW7. Ceux concernant Bcl-x<sub>L</sub> le sont moins, mais nos travaux indiquent qu'ils reposent sur sa phosphorylation (nous y reviendrons).

Au moment où nous avons commencé cette étude, certains membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 avaient été identifiés comme participant à la résistance au paclitaxel [218], mais aucun d'entre eux n'avait été identifié comme étant impliqué dans la mort mitotique. Depuis, les connaissances se sont étoffées, et il apparaît que ces protéines sont importantes au cours de l'arrêt mitotique. Mcl-1 semble

être le membre le plus importante, suivi par Bcl-x<sub>L</sub> puis Bcl-2. Le rôle de Bcl-2 dans l'arrêt mitotique a longtemps été considéré comme négligeable, ce que nous avons pu constater dans nos expériences. Cependant de très récentes études contredisent cette idée [261, 262].

L'équipe de Timothy Chambers s'est attaché à déterminer une signature de la mort mitotique en fonction des protéines de la famille de Bcl-2. Cette signature repose notamment sur la phosphorylation de Bcl-x<sub>L</sub> pendant l'arrêt mitotique, que nous observons, et sur la dégradation de Mcl-1, que nous observons dans la lignée CAL-51 mais pas dans la lignée MDA-MB-231. Ainsi la mort mitotique que nous observons ne correspond pas tout à fait à la signature issue des travaux de Timothy Chambers. Une étude de Timothy Mitchison suggère que, dans les cellules présentant de faibles niveaux de Bcl-x<sub>L</sub>, la dégradation de Mcl-1 est suffisante pour induire la mort mitotique [224], c'est le cas notamment des cellules HeLa dont nous avons observé nous-même qu'elles étaient naturellement sujettes à la mort mitotique. À l'inverse, la dégradation de Mcl-1 ne serait pas suffisante dans des cellules présentant des niveaux élevés de Bcl-x<sub>L</sub>, comme les MDA-MB-231 dont nous savons par ailleurs qu'elles sont enclines à échapper à l'arrêt mitotique.

Aller plus loin dans la détermination des dépendances à tel ou tel membre anti-apoptotique de la famille de Bcl-2 ne représente pas seulement un intérêt fondamental, mais aussi thérapeutique. Nos travaux concourent à montrer l'efficacité de combiner un ciblage de point de contrôle mitotique (plus largement un ciblage de la sortie de mitose [260]) à un ciblage de Bcl-x<sub>L</sub>. Cette efficacité a été observée dans le cancer du poumon et des ovaires [225, 263] grâce à la combinaison paclitaxel-ABT-263. La combinaison paclitaxel-ABT-737 s'est, elle, révélée efficace dans de nombreux types de cancer, notamment sur des cellules de cancer du sein [106]. Ce type de combinaison est totalement dans l'ère du temps, car, en plus du traitement classique de chimiothérapie, elle cible aussi les acteurs moléculaires dont nous savons qu'ils sont impliqués dans la résistance. Cela est encourageant pour le développement des BH3-mimétiques. Le développement récent de l'ABT-199, qui cible spécifiquement Bcl-2, représente un outil précieux, et un des enjeux actuels est le développement d'une molécule ciblant spécifiquement Mcl-1, outil dont nous ne disposons pas encore.

## « Switch » de la mort au cours de l'arrêt mitotique

Nos résultats montrent que la mort induite par l'extinction de Cdc20, ou par le traitement par le paclitaxel, n'est pas dépendante des caspases, de Bax ou Bak, ni de Bim ou Noxa (Figures 1.6, 5.1, 5.3, 5.4). Ces traitements combinés à l'extinction de Bcl-x<sub>L</sub>, ou à l'ajout d'ABT-737, induisent une mort dépendante des caspases, de Bax, et légèrement de Bak (l'effet de l'extinction de Bak n'est visible qu'en combinai-

son avec celle de Bax). Ceci suggère qu'en présence de Bcl-x<sub>L</sub>, et pendant l'arrêt mitotique, se produit une mort non apoptotique, avec une activation sublétales des caspases, et que cette mort bifurque vers une mort aux caractéristiques apoptotiques en absence de Bcl-x<sub>L</sub>. Ce « switch » de la mort révélé par l'extinction de Bcl-x<sub>L</sub> est à mettre en perspective avec les contradictions entre les travaux de Katsumi Kitagawa [89, 90] et ceux de Stephen Taylor [80]. Tout se passe comme si deux mécanismes de mort étaient en place au cours l'arrêt mitotique, l'un apoptotique et l'autre non.

Nous savons que l'arrêt mitotique modifie le profil d'amorçage des cellules avec l'apparition d'une dépendance à Bcl-x<sub>L</sub>, ce qui suggère la mise en place d'un mécanisme possiblement oncosuppressif avec l'apoptose pour exécutrice. La nécessité d'éteindre Bcl-x<sub>L</sub> pour révéler ce mécanisme soutient l'idée que la cellule lutte contre un signal de mort que Bcl-x<sub>L</sub> contrecarre. La logique voudrait que ce signal soit induit par un activateur, ou un sensibilisateur, de la famille de Bcl-2, acteur que nous n'avons identifié. La littérature suggère qu'il pourrait s'agir de Bim [88]. Cependant des expériences préliminaires (données non montrées) suggèrent que Bim n'interviendrait pas dans notre modèle. Le signal de mort pourrait en revanche être transmis par des modifications post-traductionnelles, ce que nous détaillerons par la suite.

Concernant la mort mitotique, indépendante des caspases, observée en absence d'extinction de Bcl-x<sub>L</sub> ou d'ABT-737, les travaux de Katsumi Kitagawa montre qu'elle est dépendante de p73 [89]. Ce résultat est susceptible de s'appliquer à la lignée MDA-MB-231 qui exprime p73 mais présente une forme mutée de p53. Cette équipe va même plus loin en montrant que la mort nécessite la présence de BUB3. De manière intéressante, nous avons observé que BUB3 était complexée à Bcl-x<sub>L</sub>, dans une analyse par immunoprécipitation et spectrométrie de masse menée pour identifier les interactants de Bcl-x<sub>L</sub> pendant l'arrêt mitotique (données non montrées).

## **Phosphorylation comme régulation du contrôle de Bcl-x<sub>L</sub> sur la mort mitotique**

Nous avons constaté un retard de migration de Bcl-x<sub>L</sub> suite à l'extinction de Cdc20 (Figure 4.1), ou au traitement par le paclitaxel (Figure 4.2), et cela nous a amené à nous intéresser aux événements de phosphorylation que subissait Bcl-x<sub>L</sub>. Bcl-x<sub>L</sub> possède au moins deux sites de phosphorylation : les sérine 49 et 62. La phosphorylation de la sérine 49 apparaît en phase S et G<sub>2</sub>, mais disparaît pendant la mitose. La phosphorylation de la sérine 62 est, elle, transitoire en mitose normale, mais complète suite à l'activation du point de contrôle de la phase G<sub>2</sub>. Nous avons observé que Bcl-x<sub>L</sub> était phosphorylé sur

la sérine 62 pendant l'arrêt mitotique induit par l'extinction de Cdc20. Cela avait déjà été observé précédemment sous paclitaxel, ce que nous avons confirmé (données non montrées). En approfondissant, nous avons constaté que cette phosphorylation était importante pour les propriétés biologiques cano- niques de Bcl-x<sub>L</sub>. En effet, un mutant phosphodéficient protégeait de la mort induite par la combinaison paclitaxel-ABT-737.

Parmi les kinases qui ont été impliqués dans cette phosphorylation de Bcl-x<sub>L</sub> pendant l'arrêt mi- totique se trouvent Plk1, Plk3, JNK et Cdk1, kinases dont on sait qu'elles phosphorylent Bcl-x<sub>L</sub> sur la sérine 62 (excepté pour Plk3 dont le résidu n'est pas identifié). Le cas de Cdk1 est particulièrement in- téressant. Deux équipes se sont intéressées de manière intense aux relations entre Cdk1 et Bcl-x<sub>L</sub>, celle de Richard Bertrand et celle de Timothy Chambers. L'équipe de Richard Bertrand a été la première à montrer que Cdk1 phosphorylait Bcl-x<sub>L</sub> [236], mais c'est l'équipe de Timothy Chambers qui a montré que c'était sur la sérine 62 [95]. L'équipe de Richard Bertrand ne s'intéresse pas à la mitose directement, mais étudie le rôle de Bcl-x<sub>L</sub> dans l'activation du point de contrôle de la phase G<sub>2</sub> par les dommages de l'ADN. Néanmoins, un de leurs résultats montre que la surexpression d'une forme mutée de Bcl-x<sub>L</sub> non phosphorylable sur la sérine 62 augmente la proportion de cellules en mitose sous nocodazole [235]. Ceci suggère que ce mutant maintient l'arrêt mitotique, et donc protège de la mort, ce que nous obser- vons aussi. Cette équipe montre également que Cdk1 interagit avec, et phosphoryle Bcl-x<sub>L</sub> en phase G<sub>2</sub>, et que cela se passe au nucléole, ce qui suggère que la cycline (A ou B) n'a pas d'importance du mo- ment que Cdk1 est actif. Les travaux de Timothy Chambers sont, eux, centrés sur l'arrêt mitotique. Ils montrent que l'activité de Cdk1 est primordiale dans l'induction de la mort mitotique. Plus l'activité de Cdk1 sera élevée (possiblement à cause des niveaux de cycline B), plus Bcl-x<sub>L</sub> sera phosphorylé (et Mcl-1 dégradé), et donc plus la cellule s'engagera vers la mort mitotique plutôt que l'échappement [254]. Leurs travaux montrent également que des mutants phosphodéficients empêchent l'activation de la caspase-3 sous vinblastine [261].

La régulation de l'activité de Bcl-x<sub>L</sub> par Cdk1 est un fait intéressant, car elle influe directement sur la vision que nous avons du modèle des réseaux compétitifs. En effet une des questions centrales est : **le réseau des signaux de mort, et celui des signaux d'échappement sont-ils liés ou indépendants ?** Une étude s'est attachée à montrer que les deux signaux était indépendants [264], cependant la phosphory- lation de Bcl-x<sub>L</sub> par Cdk1 contredit cela, tout comme celle de la caspase-9, toujours par Cdk1.

Un autre fait intéressant est la localisation du site de phosphorylation de Bcl-x<sub>L</sub>, la sérine 62. Ce dernier se situe sur la boucle non structurée de Bcl-x<sub>L</sub>, qui englobe les résidus 28 à 80 de la protéine [147]. Cette région apparaît comme un élément important de la régulation de l'activité de Bcl-x<sub>L</sub>. C'est

par exemple dans cette région que Bcl-x<sub>L</sub> est clivé lorsqu'il est converti en une forme pro-apoptotique. Cette boucle n'est pas spécifique de Bcl-x<sub>L</sub>, elle est également observable au sein de Bcl-2 et Bcl-w. Elle n'est pas non plus spécifique des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, puisqu'elle est observable au sein de Bax notamment. La phosphorylation de Bcl-2 dans cette région régule également son activité au cours de l'arrêt mitotique, puisque, de la même manière que Bcl-x<sub>L</sub>, la surexpression de mutants phosphodéficients protège de la mort induite par l'extinction de Cdc20 [261]. Ainsi, le contrôle de la régulation de la mort mitotique par Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 se fait, dans la limite de nos connaissances, exclusivement via des modifications post-traductionnelles. Ceci n'est pas étonnant dans la mesure où l'absence de transcription pendant la mitose rend difficile la rupture de l'équilibre du réseau d'interactions par induction protéique, et ce même si Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-2 sont en mesure d'être traduits d'une manière indépendante de la coiffe. Nous n'avons d'ailleurs pas observé d'induction de l'expression de ces protéines pendant l'arrêt mitotique. Cette dépendance exclusive à la phosphorylation pour la régulation de Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> pourrait expliquer les redondances entre ces protéines au cours de l'arrêt mitotique [261].

## Rôle de Bcl-x<sub>L</sub> dans la mort post-échappement

Nous avons pu observer que l'ABT-737 induisait la mort de cellules tétraploïdes générées par l'AZD1152, suggérant que potentiellement Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-w pouvaient être impliqués dans la survie de ces cellules (Figure 3.8b). L'idée était d'obtenir un modèle d'étude de cellules tétraploïdes pour reproduire le statut des cellules ayant échappé à l'arrêt mitotique. L'étude de telles cellules a été réalisée Maria Castedo et Guido Kroemer dans plusieurs articles [84, 265]. Ces travaux ont participé à l'émergence du concept de point de contrôle de la polyploïdie, même si l'existence de ce dernier fait l'objet de débats. Leur modèle est différent, il se base sur l'exposition de cellules au nocodazole jusqu'à l'échappement à l'arrêt mitotique, puis le nocodazole est retiré. L'ensemble de leurs travaux montre un rôle central de p53 et Bax dans la suppression de ces cellules tétraploïdes [84, 266], même si elles sont plus résistantes (notamment aux génotoxiques), ce qui justifie davantage l'intérêt de ce type d'étude. C'est un fait que suggère également nos observations sur la lignée MDA-MB-231, qui présente une forme mutée de p53. En effet, même si nous n'avons pas observé de divisions de ces cellules après échappement à l'arrêt mitotique sous paclitaxel, c'est quelque chose que nous avons observé sous nocodazole (données non montrées). Notre observation de l'importance des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 dans la survie des cellules tétraploïdes, corrobore l'implication de Bax déjà observée par l'équipe de Maria Castedo et Guido Kroemer.

## **Sixième partie**

### **Bibliographie**

- [1] G. K. Malhotra, X. Zhao, H. Band, and V. Band. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.*, 10 :955–960, Nov 2010.
- [2] F. Mollinedo and C. Gajate. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis*, 8 :413–450, Oct 2003.
- [3] K. E. Gascoigne and S. S. Taylor. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J. Cell. Sci.*, 122(Pt 15) :2579–2585, Aug 2009.
- [4] P. Juin, O. Geneste, F. Gautier, S. Depil, and M. Campone. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer*, 13 :455–465, Jun 2013.
- [5] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*. New York Garland Science, 4th edition, 2002. **Ouvrage de référence qui n'est plus à présenter.**
- [6] Lauren Pecorino. *Molecular Biology of Cancer*. Oxford University Press, 2nd edition, 2008. **Excellent ouvrage traitant des aspects moléculaires de toutes les thérapies anti-cancéreuses modernes.**
- [7] S. Kobayashi, T. Shimamura, S. Monti, U. Steidl, C. J. Hetherington, A. M. Lowell, T. Golub, M. Meyerson, D. G. Tenen, G. I. Shapiro, and B. Halmos. Transcriptional profiling identifies cyclin D1 as a critical downstream effector of mutant epidermal growth factor receptor signaling. *Cancer Res.*, 66 :11389–11398, Dec 2006.
- [8] O. Coqueret. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*, 299 :35–55, Oct 2002.
- [9] D. Santamaria, C. Barriere, A. Cerqueira, S. Hunt, C. Tardy, K. Newton, J. F. Caceres, P. Dubus, M. Malumbres, and M. Barbacid. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*, 448 :811–815, Aug 2007. **Cet article montre que la délétion des Cdk interphasiques n'engendre pas de défauts du cycle cellulaire. Il décrit également l'importance de Cdk1 pour la division cellulaire.**
- [10] S. Ortega, I. Prieto, J. Odajima, A. Martin, P. Dubus, R. Sotillo, J. L. Barbero, M. Malumbres, and M. Barbacid. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat. Genet.*, 35 :25–31, Sep 2003.
- [11] S. G. Rane, P. Dubus, R. V. Mettus, E. J. Galbreath, G. Boden, E. P. Reddy, and M. Barbacid. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat. Genet.*, 22 :44–52, May 1999. **⚠️ Accès refusé.**
- [12] M. Malumbres, R. Sotillo, D. Santamaria, J. Galan, A. Cerezo, S. Ortega, P. Dubus, and M. Barbacid. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell*, 118 :493–504, Aug 2004.

- [13] S. Larochelle, K. A. Merrick, M. E. Terret, L. Wohlbold, N. M. Barboza, C. Zhang, K. M. Shokat, P. V. Jallepalli, and R. P. Fisher. Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. *Mol. Cell*, 25 :839–850, Mar 2007.
- [14] T. Li, A. Inoue, J. M. Lahti, and V. J. Kidd. Failure to proliferate and mitotic arrest of CDK11(p110/p58)-null mutant mice at the blastocyst stage of embryonic cell development. *Mol. Cell. Biol.*, 24 :3188–3197, Apr 2004.
- [15] C. Sweeney, M. Murphy, M. Kubelka, S. E. Ravnik, C. F. Hawkins, D. J. Wolgemuth, and M. Carrington. A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. *Development*, 122 :53–64, Jan 1996. [△](#) **Accès refusé.**
- [16] D. Liu, M. M. Matzuk, W. K. Sung, Q. Guo, P. Wang, and D. J. Wolgemuth. Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat. Genet.*, 20 :377–380, Dec 1998. [△](#) **Accès refusé.**
- [17] M. Murphy, M. G. Stinnakre, C. Senamaud-Beaufort, N. J. Winston, C. Sweeney, M. Kubelka, M. Carrington, C. Brechot, and J. Sobczak-Thepot. Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat. Genet.*, 15 :83–86, Jan 1997. [△](#) **Accès refusé.**
- [18] M. Pagano, R. Pepperkok, E. Verde, W. Ansorge, and G. Draetta. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.*, 11 :961–971, Mar 1992.
- [19] J. Pines and T. Hunter. Isolation of a human cyclin cDNA : evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell*, 58 :833–846, Sep 1989. **Premier clonage d'une cycline de type B.**
- [20] D. L. Chapman, D. J. Wolgemuth, and D. J. Wolgemuth. Identification of a mouse B-type cyclin which exhibits developmentally regulated expression in the germ line. *Mol. Reprod. Dev.*, 33 :259–269, Nov 1992. [△](#) **Accès refusé.**
- [21] P. Gallant and E. A. Nigg. Identification of a novel vertebrate cyclin : cyclin B3 shares properties with both A- and B-type cyclins. *EMBO J.*, 13 :595–605, Feb 1994.
- [22] M. Jackman, M. Firth, and J. Pines. Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures : B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J.*, 14 :1646–1654, Apr 1995.
- [23] J. Pines and T. Hunter. Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J. Cell Biol.*, 115 :1–17, Oct 1991.
- [24] T. B. Nguyen, K. Manova, P. Capodiecici, C. Lindon, S. Bottega, X. Y. Wang, J. Refik-Rogers, J. Pines, D. J. Wolgemuth, and A. Koff. Characterization and expression of mammalian cyclin b3, a prepa-chytene meiotic cyclin. *J. Biol. Chem.*, 277 :41960–41969, Nov 2002.
- [25] M. Brandeis, I. Rosewell, M. Carrington, T. Crompton, M. A. Jacobs, J. Kirk, J. Gannon, and T. Hunt. Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95 :4344–4349, Apr 1998. **Génération de souris K.O. pour les cyclines B1 et B2.**

- [26] F. Chesnel, F. Bazile, A. Pascal, and J. Z. Kubiak. Cyclin B2/cyclin-dependent kinase1 dissociation precedes CDK1 Thr-161 dephosphorylation upon M-phase promoting factor inactivation in *Xenopus laevis* cell-free extract. *Int. J. Dev. Biol.*, 51 :297–305, 2007.
- [27] E. Bailly, J. Pines, T. Hunter, and M. Bornens. Cytoplasmic accumulation of cyclin B1 in human cells : association with a detergent-resistant compartment and with the centrosome. *J. Cell. Sci.*, 101 ( Pt 3 ) :529–545, Mar 1992.
- [28] P. Clute and J. Pines. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat. Cell Biol.*, 1 :82–87, Jun 1999. [△](#) **Accès refusé.**
- [29] J. Pines and T. Hunter. The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J.*, 13 :3772–3781, Aug 1994.
- [30] J. Yang, E. S. Bardes, J. D. Moore, J. Brennan, M. A. Powers, and S. Kornbluth. Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev.*, 12 :2131–2143, Jul 1998.
- [31] C. G. Takizawa, K. Weis, and D. O. Morgan. Ran-independent nuclear import of cyclin B1-Cdc2 by importin beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96 :7938–7943, Jul 1999.
- [32] C. G. Takizawa and D. O. Morgan. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12 :658–665, Dec 2000.
- [33] B. A. Weaver and D. W. Cleveland. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy : The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell*, 8 :7–12, Jul 2005.
- [34] D. J. Baker, K. B. Jeganathan, J. D. Cameron, M. Thompson, S. Juneja, A. Kopecka, R. Kumar, R. B. Jenkins, P. C. de Groen, P. Roche, and J. M. van Deursen. BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat. Genet.*, 36 :744–749, Jul 2004.
- [35] G. Mondal, S. Sengupta, C. K. Panda, S. M. Gollin, W. S. Saunders, and S. Roychoudhury. Overexpression of Cdc20 leads to impairment of the spindle assembly checkpoint and aneuploidization in oral cancer. *Carcinogenesis*, 28 :81–92, Jan 2007.
- [36] Sverre Heim and Felix Mitelman. *Cancer Cytogenesis*. Wiley-Liss, Inc. New York, 2nd edition, 1995. **Livre dont l'accès nous a été refusé, mais référencé par les articles indiquant que 70 à 80 % des cancers présentent des caractéristiques d'aneuploïdie, par exemple J Biol Chem. 2002 Aug 23 ;277(34) :31005-13.**
- [37] J. M. Peters. The anaphase-promoting complex : proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell*, 9 :931–943, May 2002.

- [38] S. S. Taylor. Chromosome segregation : dual control ensures fidelity. *Curr. Biol.*, 9 :R562–564, 1999.
- [39] C. Kraft, F. Herzog, C. Gieffers, K. Mechtler, A. Hagting, J. Pines, and J. M. Peters. Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J.*, 22 :6598–6609, Dec 2003.
- [40] W. Zachariae, M. Schwab, K. Nasmyth, and W. Seufert. Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science*, 282 :1721–1724, Nov 1998.
- [41] M. Glotzer, A. W. Murray, and M. W. Kirschner. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 349 :132–138, Jan 1991.
- [42] C. M. Pfleger and M. W. Kirschner. The KEN box : an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.*, 14 :655–665, Mar 2000.
- [43] K. M. May and K. G. Hardwick. The spindle checkpoint. *J. Cell. Sci.*, 119 :4139–4142, Oct 2006.
- [44] A. L. Tan, P. C. Rida, and U. Surana. Essential tension and constructive destruction : the spindle checkpoint and its regulatory links with mitotic exit. *Biochem. J.*, 386 :1–13, Feb 2005.
- [45] L. H. Hartwell, J. Culotti, and B. Reid. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 66 :352–359, Jun 1970.
- [46] L. H. Hartwell, R. K. Mortimer, J. Culotti, and M. Culotti. Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast : V. Genetic Analysis of cdc Mutants. *Genetics*, 74 :267–286, Jun 1973.
- [47] H. Yu. Cdc20 : a WD40 activator for a cell cycle degradation machine. *Mol. Cell*, 27 :3–16, Jul 2007.
- [48] H. Yamano, J. Gannon, H. Mahbubani, and T. Hunt. Cell cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Cell*, 13 :137–147, Jan 2004.
- [49] G. Fang, H. Yu, and M. W. Kirschner. Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol. Cell*, 2 :163–171, Aug 1998.
- [50] S. Prinz, E. S. Hwang, R. Visintin, and A. Amon. The regulation of Cdc20 proteolysis reveals a role for APC components Cdc23 and Cdc27 during S phase and early mitosis. *Curr. Biol.*, 8 :750–760, Jun 1998.
- [51] K. Uzunova, B. T. Dye, H. Schutz, R. Ladurner, G. Petzold, Y. Toyoda, M. A. Jarvis, N. G. Brown, I. Poser, M. Novatchkova, K. Mechtler, A. A. Hyman, H. Stark, B. A. Schulman, and J. M. Peters. APC15 mediates CDC20 autoubiquitylation by APC/C(MCC) and disassembly of the mitotic checkpoint complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19 :1116–1123, Nov 2012.
- [52] V. D'Angiolella, C. Mari, D. Nocera, L. Rametti, and D. Grieco. The spindle checkpoint requires cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev.*, 17 :2520–2525, Oct 2003.
- [53] V. Sudakin, G. K. Chan, and T. J. Yen. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.*, 154 :925–936, Sep 2001.

- [54] J. Davenport, L. D. Harris, and R. Goorha. Spindle checkpoint function requires Mad2-dependent Cdc20 binding to the Mad3 homology domain of BubR1. *Exp. Cell Res.*, 312 :1831–1842, Jun 2006.
- [55] L. Sironi, M. Melixetian, M. Faretta, E. Prosperini, K. Helin, and A. Musacchio. Mad2 binding to Mad1 and Cdc20, rather than oligomerization, is required for the spindle checkpoint. *EMBO J.*, 20 :6371–6382, Nov 2001.
- [56] X. Luo, G. Fang, M. Coldiron, Y. Lin, H. Yu, M. W. Kirschner, and G. Wagner. Structure of the Mad2 spindle assembly checkpoint protein and its interaction with Cdc20. *Nat. Struct. Biol.*, 7 :224–229, Mar 2000.
- [57] H. Yu. Structural activation of Mad2 in the mitotic spindle checkpoint : the two-state Mad2 model versus the Mad2 template model. *J. Cell Biol.*, 173 :153–157, Apr 2006.
- [58] A. Musacchio and E. D. Salmon. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(5) :379–393, May 2007.
- [59] S. Hauf, R. W. Cole, S. LaTerra, C. Zimmer, G. Schnapp, R. Walter, A. Heckel, J. van Meel, C. L. Rieder, and J. M. Peters. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.*, 161 :281–294, Apr 2003.
- [60] S. K. Reddy, M. Rape, W. A. Margansky, and M. W. Kirschner. Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature*, 446 :921–925, Apr 2007.
- [61] F. Stegmeier, M. Rape, V. M. Draviam, G. Nalepa, M. E. Sowa, X. L. Ang, E. R. McDonald, M. Z. Li, G. J. Hannon, P. K. Sorger, M. W. Kirschner, J. W. Harper, and S. J. Elledge. Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities. *Nature*, 446 :876–881, Apr 2007.
- [62] E. R. Griffis, N. Stuurman, and R. D. Vale. Spindly, a novel protein essential for silencing the spindle assembly checkpoint, recruits dynein to the kinetochore. *J. Cell Biol.*, 177 :1005–1015, Jun 2007.
- [63] M. Yang, B. Li, D. R. Tomchick, M. Machius, J. Rizo, H. Yu, and X. Luo. p31comet blocks Mad2 activation through structural mimicry. *Cell*, 131 :744–755, Nov 2007.
- [64] S. Inoue. Mitotic organization and force generation by assembly/disassembly of microtubules. *Cell Struct. Funct.*, 21 :375–379, Oct 1996.
- [65] S. L. Shimoda and F. Solomon. Integrating functions at the kinetochore. *Cell*, 109 :9–12, Apr 2002.
- [66] S. B. Domnitz, M. Wagenbach, J. Decarreau, and L. Wordeman. MCAK activity at microtubule tips regulates spindle microtubule length to promote robust kinetochore attachment. *J. Cell Biol.*, 197 :231–237, Apr 2012.

- [67] D. Varma, P. Monzo, S. A. Stehman, and R. B. Vallee. Direct role of dynein motor in stable kinetochore-microtubule attachment, orientation, and alignment. *J. Cell Biol.*, 182 :1045–1054, Sep 2008.
- [68] M. A. Jordan and L. Wilson. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer*, 4 :253–265, Apr 2004.
- [69] I. Ieiri. Functional significance of genetic polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2). *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27 :85–105, 2012.  
**⚠ Accès refusé via BiblioVie.**
- [70] E. Galletti, M. Magnani, M. L. Renzulli, and M. Botta. Paclitaxel and docetaxel resistance : molecular mechanisms and development of new generation taxanes. *ChemMedChem*, 2 :920–942, Jul 2007. **Revue très complète sur les deux principaux mécanismes de résistance au taxanes : la MDR et les mutations de la tubuline (⚠ Accès refusé via BiblioVie).**
- [71] P. A. Vasey, N. A. Jones, S. Jenkins, C. Dive, and R. Brown. Cisplatin, camptothecin, and taxol sensitivities of cells with p53-associated multidrug resistance. *Mol. Pharmacol.*, 50 :1536–1540, Dec 1996.
- [72] G. Cassinelli, R. Supino, P. Perego, D. Polizzi, C. Lanzi, G. Pratesi, and F. Zunino. A role for loss of p53 function in sensitivity of ovarian carcinoma cells to taxanes. *Int. J. Cancer*, 92 :738–747, Jun 2001.
- [73] C. C. Zhang, J. M. Yang, J. Bash-Babula, E. White, M. Murphy, A. J. Levine, and W. N. Hait. DNA damage increases sensitivity to vinca alkaloids and decreases sensitivity to taxanes through p53-dependent repression of microtubule-associated protein 4. *Cancer Res.*, 59 :3663–3670, Aug 1999.
- [74] P. Giannakakou, G. Poy, Z. Zhan, T. Knutsen, M. V. Blagosklonny, and T. Fojo. Paclitaxel selects for mutant or pseudo-null p53 in drug resistance associated with tubulin mutations in human cancer. *Oncogene*, 19 :3078–3085, Jun 2000.
- [75] P. B. Schiff, J. Fant, and S. B. Horwitz. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277 :665–667, Feb 1979. **⚠ Accès refusé.**
- [76] K. Torres and S. B. Horwitz. Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res.*, 58 :3620–3626, Aug 1998.
- [77] S. Rao, L. He, S. Chakravarty, I. Ojima, G. A. Orr, and S. B. Horwitz. Characterization of the Taxol binding site on the microtubule. Identification of Arg(282) in beta-tubulin as the site of photoincorporation of a 7-benzophenone analogue of Taxol. *J. Biol. Chem.*, 274 :37990–37994, Dec 1999.
- [78] J. F. Diaz and J. M. Andreu. Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere : reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry*, 32 :2747–2755, Mar 1993. **⚠ Accès refusé.**

- [79] D. A. Brito and C. L. Rieder. Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr. Biol.*, 16 :1194–1200, Jun 2006.
- [80] K. E. Gascoigne and S. S. Taylor. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell*, 14(2) :111–122, Aug 2008.
- [81] D. A. Brito and C. L. Rieder. The ability to survive mitosis in the presence of microtubule poisons differs significantly between human nontransformed (RPE-1) and cancer (U2OS, HeLa) cells. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 66 :437–447, Aug 2009. [△](#) **Accès refusé.**
- [82] J. S. Lanni and T. Jacks. Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol. Cell. Biol.*, 18 :1055–1064, Feb 1998.
- [83] M. V. Blagosklonny. Prolonged mitosis versus tetraploid checkpoint : how p53 measures the duration of mitosis. *Cell Cycle*, 5 :971–975, May 2006.
- [84] M. Castedo, A. Coquelle, S. Vivet, I. Vitale, A. Kauffmann, P. Dessen, M. O. Pequinot, N. Casares, A. Valent, S. Mouhamad, E. Schmitt, N. Modjtahedi, W. Vainchenker, L. Zitvogel, V. Lazar, C. Garrido, and G. Kroemer. Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *EMBO J.*, 25 :2584–2595, Jun 2006.
- [85] M. Yun, Y. H. Han, S. H. Yoon, H. Y. Kim, B. Y. Kim, Y. J. Ju, C. M. Kang, S. H. Jang, H. Y. Chung, S. J. Lee, M. H. Cho, G. Yoon, G. H. Park, S. H. Kim, and K. H. Lee. p31comet Induces cellular senescence through p21 accumulation and Mad2 disruption. *Mol. Cancer Res.*, 7 :371–382, Mar 2009.
- [86] L. A. Allan and P. R. Clarke. Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Mol. Cell*, 26 :301–310, Apr 2007.
- [87] M. E. Bekier, R. Fischbach, J. Lee, and W. R. Taylor. Length of mitotic arrest induced by microtubule-stabilizing drugs determines cell death after mitotic exit. *Mol. Cancer Ther.*, 8 :1646–1654, Jun 2009.
- [88] W. H. Toh, S. Y. Nam, and K. Sabapathy. An essential role for p73 in regulating mitotic cell death. *Cell Death Differ.*, 17 :787–800, May 2010.
- [89] Y. Niikura, A. Dixit, R. Scott, G. Perkins, and K. Kitagawa. BUB1 mediation of caspase-independent mitotic death determines cell fate. *J. Cell Biol.*, 178 :283–296, Jul 2007.
- [90] Y. Niikura, H. Ogi, K. Kikuchi, and K. Kitagawa. BUB3 that dissociates from BUB1 activates caspase-independent mitotic death (CIMD). *Cell Death Differ.*, 17 :1011–1024, Jun 2010.
- [91] K. Lee, A. E. Kenny, and C. L. Rieder. Caspase activity is not required for the mitotic checkpoint or mitotic slippage in human cells. *Mol. Biol. Cell*, 22 :2470–2479, Jul 2011.

- [92] I. Vitale, L. Galluzzi, M. Castedo, and G. Kroemer. Mitotic catastrophe : a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12 :385–392, Jun 2011.
- [93] J. D. Orth, A. Loewer, G. Lahav, and T. J. Mitchison. Prolonged mitotic arrest triggers partial activation of apoptosis, resulting in DNA damage and p53 induction. *Mol. Biol. Cell*, 23 :567–576, Feb 2012.
- [94] R. M. Barrett, T. P. Osborne, and S. P. Wheatley. Phosphorylation of survivin at threonine 34 inhibits its mitotic function and enhances its cytoprotective activity. *Cell Cycle*, 8 :278–283, Jan 2009.
- [95] D. T. Terrano, M. Upreti, and T. C. Chambers. Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 30 :640–656, Feb 2010.
- [96] Y. F. Huang, M. D. Chang, and S. Y. Shieh. TTK/hMps1 mediates the p53-dependent postmitotic checkpoint by phosphorylating p53 at Thr18. *Mol. Cell. Biol.*, 29 :2935–2944, Jun 2009. **Cet article établit un lien entre le point de contrôle mitotique et l'apoptose, via l'effet de MPS1 sur p53.**
- [97] K. Ando, T. Ozaki, H. Yamamoto, K. Furuya, M. Hosoda, S. Hayashi, M. Fukuzawa, and A. Nakagawa. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 279 :25549–25561, Jun 2004. **Cet article établit un lien entre le point de contrôle mitotique et l'apoptose, via l'effet de Plk1 sur p53.**
- [98] L. Wu, C. A. Ma, Y. Zhao, and A. Jain. Aurora B interacts with NIR-p53, leading to p53 phosphorylation in its DNA-binding domain and subsequent functional suppression. *J. Biol. Chem.*, 286 :2236–2244, Jan 2011. **Cet article établit un lien entre le point de contrôle mitotique et l'apoptose, via l'effet d'Aurora B sur p53.**
- [99] S. Barille-Nion, N. Bah, E. Vequaud, and P. Juin. Regulation of cancer cell survival by BCL2 family members upon prolonged mitotic arrest : opportunities for anticancer therapy. *Anticancer Res.*, 32 :4225–4233, Oct 2012.
- [100] Frederic Martini, Judi Nath, and Edwin Bartholomew. *Fundamentals of Anatomy & Physiology*. Pearson Education Inc., 9th edition, 2012. **Ouvrage de physiologie général.**
- [101] B. A. Howard and B. A. Gusterson. Human breast development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 5 :119–137, Apr 2000.
- [102] R. Anbazhagan, B. Nathan, and B. A. Gusterson. Prenatal influences and breast cancer. *Lancet*, 340 :1477–1478, Dec 1992. **⚠️ Accès refusé.**
- [103] James Holland, Emil Frei, Ralph Weichselbaum, Raphael Pollock, Donald Kufe, William Hait, Robert Bast, and Waun Hong. *Cancer Medecine*. PMPH-USA and American Association for Cancer Research, 8th edition, 2009. **Ouvrage de référence, orienté médical, mais traitant de tous les aspects du cancer. De loin le livre le plus complet sur le cancer.**

- [104] C. F. Chang, R. Westbrook, J. Ma, and D. Cao. Transforming growth factor-beta signaling in breast cancer. *Front. Biosci.*, 12 :4393–4401, 2007.
- [105] D. Hanahan and R. A. Weinberg. Hallmarks of cancer : the next generation. *Cell*, 144 :646–674, Mar 2011.
- [106] S. R. Oakes, F. Vaillant, E. Lim, L. Lee, K. Breslin, F. Feleppa, S. Deb, M. E. Ritchie, E. Takano, T. Ward, S. B. Fox, D. Generali, G. K. Smyth, A. Strasser, D. C. Huang, J. E. Visvader, and G. J. Lindeman. Sensitization of BCL-2-expressing breast tumors to chemotherapy by the BH3 mimetic ABT-737. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109 :2766–2771, Feb 2012.
- [107] T. Sorlie, R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J. S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C. M. Perou, P. E. Lønning, P. O. Brown, A. L. Børresen-Dale, and D. Botstein. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100 :8418–8423, Jul 2003.
- [108] L. Carey, E. Winer, G. Viale, D. Cameron, and L. Gianni. Triple-negative breast cancer : disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol*, 7 :683–692, Dec 2010.
- [109] R. M. Neve, K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F. L. Baehner, T. Fevr, L. Clark, N. Bayani, J. P. Coppe, F. Tong, T. Speed, P. T. Spellman, S. DeVries, A. Lapuk, N. J. Wang, W. L. Kuo, J. L. Stilwell, D. Pinkel, D. G. Albertson, F. M. Waldman, F. McCormick, R. B. Dickson, M. D. Johnson, M. Lippman, S. Ethier, A. Gazdar, and J. W. Gray. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10 :515–527, Dec 2006.
- [110] E. Charafe-Jauffret, M. Chaffanet, F. Bertucci, C. Ginestier, J. Jacquemier, O. deLapeyriere, and D. Birnbaum. [Towards an integrated cellular and molecular : definition of breast cancers]. *Med Sci (Paris)*, 23 :626–632, 2007.
- [111] S. Badve and H. Nakshatri. Breast-cancer stem cells-beyond semantics. *Lancet Oncol.*, 13 :e43–48, Jan 2012.
- [112] M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, and M. F. Clarke. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100 :3983–3988, Apr 2003.
- [113] O. Gluz, C. Liedtke, N. Gottschalk, L. Pusztai, U. Nitz, and N. Harbeck. Triple-negative breast cancer—current status and future directions. *Ann. Oncol.*, 20 :1913–1927, Dec 2009.
- [114] A. Prat, B. Adamo, M. C. Cheang, C. K. Anders, L. A. Carey, and C. M. Perou. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist*, 18 :123–133, 2013.
- [115] J. Ferlay, H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, and D. M. Parkin. Cancer Incidence and Mortality Worldwide : IARC CancerBase No. 10 (Internet). *GLOBOCAN, International Agency for Research on Cancer*, v2.0, 2008. <http://globocan.iarc.fr>.

- [116] INCA. Survie des personnes atteintes de cancer en France, 1989-2007. 2013. Communiqué de presse de l'Institut National du Cancer.
- [117] Chemoregimen. <http://chemoregimen.com>. **Site internet répertoriant un grand de traitement de chimiothérapie, tous types de cancers confondus.**
- [118] A. D. Seidman, A. Tiersten, C. Hudis, M. Gollub, S. Barrett, T. J. Yao, J. Lepore, T. Gilewski, V. Currie, and J. Crown. Phase II trial of paclitaxel by 3-hour infusion as initial and salvage chemotherapy for metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 13 :2575–2581, Oct 1995. [△](#) **Accès refusé via BiblioVie.**
- [119] F. A. Holmes, R. S. Walters, R. L. Theriault, A. D. Forman, L. K. Newton, M. N. Raber, A. U. Buzdar, D. K. Frye, and G. N. Hortobagyi. Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83 :1797–1805, Dec 1991. [△](#) **Accès refusé via BiblioVie.**
- [120] E. P. Winer, D. A. Berry, S. Woolf, D. Duggan, A. Kornblith, L. N. Harris, R. A. Michaelson, J. A. Kirshner, G. F. Fleming, M. C. Perry, M. L. Graham, S. A. Sharp, R. Keresztes, I. C. Henderson, C. Hudis, H. Muss, and L. Norton. Failure of higher-dose paclitaxel to improve outcome in patients with metastatic breast cancer : cancer and leukemia group B trial 9342. *J. Clin. Oncol.*, 22 :2061–2068, Jun 2004.
- [121] A. D. Seidman, D. Berry, C. Cirrincione, L. Harris, H. Muss, P. K. Marcom, G. Gipson, H. Burstein, D. Lake, C. L. Shapiro, P. Ungaro, L. Norton, E. Winer, and C. Hudis. Randomized phase III trial of weekly compared with every-3-weeks paclitaxel for metastatic breast cancer, with trastuzumab for all HER-2 overexpressors and random assignment to trastuzumab or not in HER-2 nonoverexpressors : final results of Cancer and Leukemia Group B protocol 9840. *J. Clin. Oncol.*, 26 :1642–1649, Apr 2008. **Important essai clinique montrant la supériorité d'une administration hebdomadaire du paclitaxel dans le cancer du sein métastatique, comparé à une administration toutes les trois semaines.**
- [122] R. Paridaens, L. Biganzoli, P. Bruning, J. G. Klijn, T. Gamucci, S. Houston, R. Coleman, J. Schachter, A. Van Vreckem, R. Sylvester, A. Awada, J. Wildiers, and M. Piccart. Paclitaxel versus doxorubicin as first-line single-agent chemotherapy for metastatic breast cancer : a European Organization for Research and Treatment of Cancer Randomized Study with cross-over. *J. Clin. Oncol.*, 18 :724–733, Feb 2000. **Essai clinique montrant le rôle du paclitaxel en première ligne de thérapie dans le cancer du sein métastatique.**
- [123] G. W. Sledge, D. Neuberg, P. Bernardo, J. N. Ingle, S. Martino, E. K. Rowinsky, and W. C. Wood. Phase III trial of doxorubicin, paclitaxel, and the combination of doxorubicin and paclitaxel as front-line chemotherapy for metastatic breast cancer : an intergroup trial (E1193). *J. Clin. Oncol.*, 21 :588–592, Feb 2003. **Cette essai clinique montre l'efficacité de la combinaison paclitaxel-doxorubicine première ligne dans le cancer du sein métastatique.**

- [124] J. F. Bishop, J. Dewar, G. C. Toner, J. Smith, M. H. Tattersall, I. N. Olver, S. Ackland, I. Kennedy, D. Goldstein, H. Gurney, E. Walpole, J. Levi, J. Stephenson, and R. Canetta. Initial paclitaxel improves outcome compared with CMFP combination chemotherapy as front-line therapy in untreated metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 17 :2355–2364, Aug 1999.
- [125] E. Saloustros, D. Mavroudis, and V. Georgoulas. Paclitaxel and docetaxel in the treatment of breast cancer. *Expert Opin Pharmacother*, 9 :2603–2616, Oct 2008. **Une des rares revues traitant de l'utilisation du paclitaxel dans le cancer du sein.**
- [126] S. E. Jones, J. Erban, B. Overmoyer, G. T. Budd, L. Hutchins, E. Lower, L. Laufman, S. Sundaram, W. J. Urba, K. I. Pritchard, R. Mennel, D. Richards, S. Olsen, M. L. Meyers, and P. M. Ravdin. Randomized phase III study of docetaxel compared with paclitaxel in metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 23 :5542–5551, Aug 2005. **Étude comparant les effets du docétaxel et du paclitaxel dans le cancer du sein métastatique.**
- [127] J. M. Nabholz, C. Falkson, D. Campos, J. Szanto, M. Martin, S. Chan, T. Pienkowski, J. Zaluski, T. Pinter, M. Krzakowski, D. Vorobiof, R. Leonard, I. Kennedy, N. Azli, M. Murawsky, A. Riva, and P. Pouillart. Docetaxel and doxorubicin compared with doxorubicin and cyclophosphamide as first-line chemotherapy for metastatic breast cancer : results of a randomized, multicenter, phase III trial. *J. Clin. Oncol.*, 21 :968–975, Mar 2003.
- [128] J. Jassem, T. Pie ?kowski, A. P ?uza ?ska, S. Jelic, V. Gorbunova, Z. Mrcic-Krmpotic, J. Berzins, T. Nagykalnai, N. Wigler, J. Renard, S. Munier, and C. Weil. Doxorubicin and paclitaxel versus fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide as first-line therapy for women with metastatic breast cancer : final results of a randomized phase III multicenter trial. *J. Clin. Oncol.*, 19 :1707–1715, Mar 2001.
- [129] D. Yu, B. Liu, T. Jing, D. Sun, J. E. Price, S. E. Singletary, N. Ibrahim, G. N. Hortobagyi, and M. C. Hung. Overexpression of both p185c-erbB2 and p170mdr-1 renders breast cancer cells highly resistant to taxol. *Oncogene*, 16 :2087–2094, Apr 1998.
- [130] D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, and L. Norton. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.*, 344 :783–792, Mar 2001. **Cette étude montre le rôle important du trastuzumab dans le traitement du cancer du sein métastatique surexprimant HER-2.**
- [131] K. Miller, M. Wang, J. Gralow, M. Dickler, M. Cobleigh, E. A. Perez, T. Shenkier, D. Cella, and N. E. Davidson. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 357 :2666–2676, Dec 2007. **Étude montrant l'effet positif de la combinaison bevacizumab-paclitaxel dans le traitement des stades avancés de cancer du sein.**

- [132] E. P. Mamounas, J. Bryant, B. Lembersky, L. Fehrenbacher, S. M. Sedlacek, B. Fisher, D. L. Wickerham, G. Yothers, A. Soran, and N. Wolmark. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer : results from NSABP B-28. *J. Clin. Oncol.*, 23 :3686–3696, Jun 2005.
- [133] M. Martin, A. Rodriguez-Lescure, A. Ruiz, E. Alba, L. Calvo, M. Ruiz-Borrego, B. Munarriz, C. A. Rodriguez, C. Crespo, E. de Alava, J. A. Lopez Garcia-Asenjo, M. D. Guitian, S. Almenar, J. F. Gonzalez-Palacios, F. Vera, J. Palacios, M. Ramos, J. M. Gracia Marco, A. Lluch, I. Alvarez, M. A. Segui, J. I. Mayordomo, A. Anton, J. M. Baena, A. Plazaola, A. Modolell, A. Pelegri, J. R. Mel, E. Aranda, E. Adrover, J. V. Alvarez, J. L. Garcia Puche, P. Sanchez-Rovira, S. Gonzalez, J. M. Lopez-Vega, M. Martin, J. A. Lopez Garcia-Asenjo, A. Rodriguez-Lescure, A. Ruiz, S. Almenar, E. Alba, L. Vicioso, L. Calvo, M. D. Guitian, M. Ruiz-Borrego, J. Palacios, B. Munarriz, F. Vera, C. A. Rodriguez, C. Crespo, J. F. Gonzalez-Palacios, M. Ramos, A. de la Cruz, J. M. Marco, J. M. Angulo, A. Lluch, J. Ferrer, I. Alvarez, I. Ruiz, M. A. Segui, A. Saez, J. I. Mayordomo, M. Moros, A. Anton, M. J. Rios, J. M. Baena, M. J. Palomo, A. Plazaola, R. Rezola, A. Modolell, P. De las Heras, A. Pelegri, F. Riu, J. R. Mel, J. Alba, E. Aranda, E. Fuentes, E. Adrover, G. Peiro, J. V. Alvarez, J. L. Puche, J. Aneiros, P. Sanchez-Rovira, C. Cueva, S. Gonzalez, J. M. Lopez-Vega, and M. F. Garijo. Randomized phase 3 trial of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide alone or followed by Paclitaxel for early breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 100 :805–814, Jun 2008.
- [134] I. C. Henderson, D. A. Berry, G. D. Demetri, C. T. Cirrincione, L. J. Goldstein, S. Martino, J. N. Ingle, M. R. Cooper, D. F. Hayes, K. H. Tkaczuk, G. Fleming, J. F. Holland, D. B. Duggan, J. T. Carpenter, E. Frei, R. L. Schilsky, W. C. Wood, H. B. Muss, and L. Norton. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 21 :976–983, Mar 2003.
- [135] J. A. Sparano, M. Wang, S. Martino, V. Jones, E. A. Perez, T. Saphner, A. C. Wolff, G. W. Sledge, W. C. Wood, and N. E. Davidson. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 358 :1663–1671, Apr 2008.
- [136] I. C. Smith, S. D. Heys, A. W. Hutcheon, I. D. Miller, S. Payne, F. J. Gilbert, A. K. Ah-See, O. Eremin, L. G. Walker, T. K. Sarkar, S. P. Eggleton, and K. N. Ogston. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer : significantly enhanced response with docetaxel. *J. Clin. Oncol.*, 20 :1456–1466, Mar 2002.
- [137] R. J. Youle and A. Strasser. The BCL-2 protein family : opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9 :47–59, Jan 2008.
- [138] Z. N. Oltvai, C. L. Milliman, and S. J. Korsmeyer. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74 :609–619, Aug 1993.

- [139] Y. T. Hsu and R. J. Youle. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J. Biol. Chem.*, 273 :10777–10783, Apr 1998.
- [140] T. W. Sedlak, Z. N. Oltvai, E. Yang, K. Wang, L. H. Boise, C. B. Thompson, and S. J. Korsmeyer. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92 :7834–7838, Aug 1995.
- [141] A. Nechushtan, C. L. Smith, Y. T. Hsu, and R. J. Youle. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J.*, 18 :2330–2341, May 1999.
- [142] D. Zhai, C. Jin, Z. Huang, A. C. Satterthwait, and J. C. Reed. Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1. *J. Biol. Chem.*, 283 :9580–9586, Apr 2008.
- [143] K. Wang, X. M. Yin, D. T. Chao, C. L. Milliman, and S. J. Korsmeyer. BID : a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev.*, 10 :2859–2869, Nov 1996.
- [144] M. C. Wei, T. Lindsten, V. K. Mootha, S. Weiler, A. Gross, M. Ashiya, C. B. Thompson, and S. J. Korsmeyer. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.*, 14 :2060–2071, Aug 2000.
- [145] N. Ke, A. Godzik, and J. C. Reed. Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J. Biol. Chem.*, 276 :12481–12484, Apr 2001.
- [146] R. Eskes, S. Desagher, B. Antonsson, and J. C. Martinou. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.*, 20 :929–935, Feb 2000.
- [147] A. M. Petros, E. T. Olejniczak, and S. W. Fesik. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1644 :83–94, Mar 2004.
- [148] X. M. Yin, Z. N. Oltvai, and S. J. Korsmeyer. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 369 :321–323, May 1994.
- [149] R. Ray, G. Chen, C. Vande Velde, J. Cizeau, J. H. Park, J. C. Reed, R. D. Gietz, and A. H. Greenberg. BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J. Biol. Chem.*, 275 :1439–1448, Jan 2000.
- [150] J. M. McDonnell, D. Fushman, C. L. Milliman, S. J. Korsmeyer, and D. Cowburn. Solution structure of the proapoptotic molecule BID : a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell*, 96 :625–634, Mar 1999.
- [151] M. G. Hinds, C. Smits, R. Fredericks-Short, J. M. Risk, M. Bailey, D. C. Huang, and C. L. Day. Bim, Bad and Bmf : intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ.*, 14 :128–136, Jan 2007.

- [152] H. Kim, M. Rafiuddin-Shah, H. C. Tu, J. R. Jeffers, G. P. Zambetti, J. J. Hsieh, and E. H. Cheng. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat. Cell Biol.*, 8 :1348–1358, Dec 2006.
- [153] J. M. Adams and S. Cory. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26 :1324–1337, Feb 2007.
- [154] J. Zha, H. Harada, E. Yang, J. Jockel, and S. J. Korsmeyer. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, 87 :619–628, Nov 1996.
- [155] F. Tsuruta, J. Sunayama, Y. Mori, S. Hattori, S. Shimizu, Y. Tsujimoto, K. Yoshioka, N. Masuyama, and Y. Gotoh. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.*, 23 :1889–1899, Apr 2004.
- [156] S. N. Willis, L. Chen, G. Dewson, A. Wei, E. Naik, J. I. Fletcher, J. M. Adams, and D. C. Huang. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.*, 19 :1294–1305, Jun 2005.
- [157] Y. Takahashi, M. Karbowski, H. Yamaguchi, A. Kazi, J. Wu, S. M. Sebti, R. J. Youle, and H. G. Wang. Loss of Bif-1 suppresses Bax/Bak conformational change and mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 25 :9369–9382, Nov 2005.
- [158] J. E. Chipuk, T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N. M. Droin, D. D. Newmeyer, M. Schuler, and D. R. Green. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 303 :1010–1014, Feb 2004.
- [159] J. I. Leu, P. Dumont, M. Hafey, M. E. Murphy, and D. L. George. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol.*, 6 :443–450, May 2004.
- [160] H. Zhang, Q. Xu, S. Krajewski, M. Krajewska, Z. Xie, S. Fuess, S. Kitada, K. Pawlowski, A. Godzik, and J. C. Reed. BAR : An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97 :2597–2602, Mar 2000.
- [161] C. Brooks, Q. Wei, L. Feng, G. Dong, Y. Tao, L. Mei, Z. J. Xie, and Z. Dong. Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 :11649–11654, Jul 2007.
- [162] F. Shibasaki, E. Kondo, T. Akagi, and F. McKeon. Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature*, 386 :728–731, Apr 1997.
- [163] Q. Wang, F. Gao, W. S. May, Y. Zhang, T. Flagg, and X. Deng. Bcl2 negatively regulates DNA double-strand-break repair through a nonhomologous end-joining pathway. *Mol. Cell*, 29 :488–498, Feb 2008.

- [164] I. Sanchez and J. Yuan. A convoluted way to die. *Neuron*, 29 :563–566, Mar 2001.
- [165] J. R. Chao, J. M. Wang, S. F. Lee, H. W. Peng, Y. H. Lin, C. H. Chou, J. C. Li, H. M. Huang, C. K. Chou, M. L. Kuo, J. J. Yen, and H. F. Yang-Yen. *mcl-1* is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signaling pathway and is one component of the GM-CSF viability response. *Mol. Cell. Biol.*, 18 :4883–4898, Aug 1998.
- [166] C. D. Bingle, R. W. Craig, B. M. Swales, V. Singleton, P. Zhou, and M. K. Whyte. Exon skipping in *Mcl-1* results in a *bcl-2* homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J. Biol. Chem.*, 275 :22136–22146, Jul 2000.
- [167] D. M. Hockenbery, Z. N. Oltvai, X. M. Yin, C. L. Milliman, and S. J. Korsmeyer. *Bcl-2* functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 75 :241–251, Oct 1993.
- [168] L. O'Connor, A. Strasser, L. A. O'Reilly, G. Hausmann, J. M. Adams, S. Cory, and D. C. Huang. *Bim* : a novel member of the *Bcl-2* family that promotes apoptosis. *EMBO J.*, 17 :384–395, Jan 1998.
- [169] X. M. Yin. *Bid*, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene*, 369 :7–19, Mar 2006.
- [170] M. C. Bassik, L. Scorrano, S. A. Oakes, T. Pozzan, and S. J. Korsmeyer. Phosphorylation of *BCL-2* regulates ER  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and apoptosis. *EMBO J.*, 23 :1207–1216, Mar 2004.
- [171] H. Puthalakath, D. C. Huang, L. A. O'Reilly, S. M. King, and A. Strasser. The proapoptotic activity of the *Bcl-2* family member *Bim* is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell*, 3 :287–296, Mar 1999.
- [172] G. Fang, B. S. Chang, C. N. Kim, C. Perkins, C. B. Thompson, and K. N. Bhalla. *domain* is necessary for taxol-induced mobility shift and phosphorylation of *Bcl-2* as well as for inhibiting taxol-induced cytosolic accumulation of cytochrome *c* and apoptosis. *Cancer Res.*, 58 :3202–3208, Aug 1998.
- [173] M. S. Poruchynsky, E. E. Wang, C. M. Rudin, M. V. Blagosklonny, and T. Fojo. *Bcl-xL* is phosphorylated in malignant cells following microtubule disruption. *Cancer Res.*, 58 :3331–3338, Aug 1998.
- [174] K. Yamamoto, H. Ichijo, and S. J. Korsmeyer. *BCL-2* is phosphorylated and inactivated by an *ASK1/Jun* N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol. Cell. Biol.*, 19 :8469–8478, Dec 1999.
- [175] S. Haldar, J. Chintapalli, and C. M. Croce. Taxol induces *bcl-2* phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 56 :1253–1255, Mar 1996.
- [176] J. Wang, M. Beauchemin, and R. Bertrand. *Bcl-xL* phosphorylation at Ser49 by polo kinase 3 during cell cycle progression and checkpoints. *Cell. Signal.*, 23 :2030–2038, Dec 2011.

- [177] E. H. Cheng, D. G. Kirsch, R. J. Clem, R. Ravi, M. B. Kastan, A. Bedi, K. Ueno, and J. M. Hardwick. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*, 278 :1966–1968, Dec 1997.
- [178] R. J. Clem, E. H. Cheng, C. L. Karp, D. G. Kirsch, K. Ueno, A. Takahashi, M. B. Kastan, D. E. Griffin, W. C. Earnshaw, M. A. Velicuona, and J. M. Hardwick. Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95 :554–559, Jan 1998.
- [179] T. Lindsten, A. J. Ross, A. King, W. X. Zong, J. C. Rathmell, H. A. Shiels, E. Ulrich, K. G. Waymire, P. Mahar, K. Frauwirth, Y. Chen, M. Wei, V. M. Eng, D. M. Adelman, M. C. Simon, A. Ma, J. A. Golden, G. Evan, S. J. Korsmeyer, G. R. MacGregor, and C. B. Thompson. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell*, 6 :1389–1399, Dec 2000.
- [180] M. C. Wei, W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson, and S. J. Korsmeyer. Proapoptotic BAX and BAK : a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292 :727–730, Apr 2001.
- [181] W. X. Zong, T. Lindsten, A. J. Ross, G. R. MacGregor, and C. B. Thompson. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.*, 15 :1481–1486, Jun 2001.
- [182] L. Zhang, J. Yu, B. H. Park, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science*, 290 :989–992, Nov 2000.
- [183] T. Shimazu, K. Degenhardt, A. Nur-E-Kamal, J. Zhang, T. Yoshida, Y. Zhang, R. Mathew, E. White, and M. Inouye. NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition. *Genes Dev.*, 21 :929–941, Apr 2007.
- [184] A. G. Letai. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*, 8 :121–132, Feb 2008.
- [185] N. Motoyama, E. Wang, K. A. Roth, H. Sawa, K. Nakayama, K. Nakayama, I. Negishi, S. Senju, Q. Zhang, and S. Fujii. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*, 267 :1506–1510, Mar 1995.
- [186] J. L. Rinkenberger, S. Horning, B. Klocke, K. Roth, and S. J. Korsmeyer. Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev.*, 14 :23–27, Jan 2000.
- [187] J. T. Opferman, H. Iwasaki, C. C. Ong, H. Suh, S. Mizuno, K. Akashi, and S. J. Korsmeyer. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science*, 307 :1101–1104, Feb 2005.
- [188] D. J. Veis, C. M. Sorenson, J. R. Shutter, and S. J. Korsmeyer. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, 75 :229–240, Oct 1993.

- [189] P. Bouillet, S. Cory, L. C. Zhang, A. Strasser, and J. M. Adams. Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev. Cell*, 1 :645–653, Nov 2001.
- [190] C. G. Print, K. L. Loveland, L. Gibson, T. Meehan, A. Stylianou, N. Wreford, D. de Kretser, D. Metcalf, F. Kontgen, J. M. Adams, and S. Cory. Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95 :12424–12431, Oct 1998.
- [191] C. M. Knudson, G. M. Johnson, Y. Lin, and S. J. Korsmeyer. Bax accelerates tumorigenesis in p53-deficient mice. *Cancer Res.*, 61 :659–665, Jan 2001.
- [192] A. Villunger, E. M. Michalak, L. Coultas, F. Mullauer, G. Bock, M. J. Ausserlechner, J. M. Adams, and A. Strasser. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science*, 302 :1036–1038, Nov 2003.
- [193] J. R. Jeffers, E. Parganas, Y. Lee, C. Yang, J. Wang, J. Brennan, K. H. MacLean, J. Han, T. Chittenden, J. N. Ihle, P. J. McKinnon, J. L. Cleveland, and G. P. Zambetti. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell*, 4 :321–328, Oct 2003.
- [194] E. Naik, E. M. Michalak, A. Villunger, J. M. Adams, and A. Strasser. Ultraviolet radiation triggers apoptosis of fibroblasts and skin keratinocytes mainly via the BH3-only protein Noxa. *J. Cell Biol.*, 176 :415–424, Feb 2007.
- [195] E. M. Michalak, A. Villunger, J. M. Adams, and A. Strasser. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death Differ.*, 15 :1019–1029, Jun 2008.
- [196] P. Bouillet, D. Metcalf, D. C. Huang, D. M. Tarlinton, T. W. Kay, F. Kontgen, J. M. Adams, and A. Strasser. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, 286 :1735–1738, Nov 1999.
- [197] X. M. Yin, K. Wang, A. Gross, Y. Zhao, S. Zinkel, B. Klocke, K. A. Roth, and S. J. Korsmeyer. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, 400 :886–891, Aug 1999.
- [198] N. N. Danial, L. D. Walensky, C. Y. Zhang, C. S. Choi, J. K. Fisher, A. J. Molina, S. R. Datta, K. L. Pitter, G. H. Bird, J. D. Wikstrom, J. T. Deeney, K. Robertson, J. Morash, A. Kulkarni, S. Neschen, S. Kim, M. E. Greenberg, B. E. Corkey, O. S. Shirihai, G. I. Shulman, B. B. Lowell, and S. J. Korsmeyer. Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat. Med.*, 14 :144–153, Feb 2008.
- [199] F. Braun, S. de Carne Trecesson, J. Bertin-Ciftci, and P. Juin. Protect and serve : Bcl-2 proteins as guardians and rulers of cancer cell survival. *Cell Cycle*, 12 :2937–2947, Sep 2013.
- [200] S. Cory, D. C. Huang, and J. M. Adams. The Bcl-2 family : roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 22 :8590–8607, Nov 2003.

- [201] A. Chattopadhyay, C. W. Chiang, and E. Yang. BAD/BCL-[X(L)] heterodimerization leads to bypass of G0/G1 arrest. *Oncogene*, 20 :4507–4518, Jul 2001.
- [202] L. Bai, H. M. Ni, X. Chen, D. DiFrancesca, and X. M. Yin. Deletion of Bid impedes cell proliferation and hepatic carcinogenesis. *Am. J. Pathol.*, 166 :1523–1532, May 2005.
- [203] N. Bonnefoy-Berard, A. Aouacheria, C. Verschelde, L. Quemeneur, A. Marçais, and J. Marvel. Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim. Biophys. Acta*, 1644 :159–168, Mar 2004.
- [204] M. E. Vail, M. L. Chaisson, J. Thompson, and N. Fausto. Bcl-2 expression delays hepatocyte cell cycle progression during liver regeneration. *Oncogene*, 21 :1548–1555, Feb 2002.
- [205] Y. M. Janumyan, C. G. Sansam, A. Chattopadhyay, N. Cheng, E. L. Soucie, L. Z. Penn, D. Andrews, C. M. Knudson, and E. Yang. Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *EMBO J.*, 22 :5459–5470, Oct 2003.
- [206] N. Cheng, Y. M. Janumyan, L. Didion, C. Van Hofwegen, E. Yang, and C. M. Knudson. Bcl-2 inhibition of T-cell proliferation is related to prolonged T-cell survival. *Oncogene*, 23 :3770–3780, May 2004.
- [207] S. W. Fesik. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Cancer*, 5 :876–885, Nov 2005.
- [208] L. D. Walensky, A. L. Kung, I. Escher, T. J. Malia, S. Barbuto, R. D. Wright, G. Wagner, G. L. Verdine, and S. J. Korsmeyer. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science*, 305 :1466–1470, Sep 2004.
- [209] T. Oltersdorf, S. W. Elmore, A. R. Shoemaker, R. C. Armstrong, D. J. Augeri, B. A. Belli, M. Brunccko, T. L. Deckwerth, J. Dinges, P. J. Hajduk, M. K. Joseph, S. Kitada, S. J. Korsmeyer, A. R. Kunzer, A. Letai, C. Li, M. J. Mitten, D. G. Nettesheim, S. Ng, P. M. Nimmer, J. M. O'Connor, A. Oleksijew, A. M. Petros, J. C. Reed, W. Shen, S. K. Tahir, C. B. Thompson, K. J. Tomaselli, B. Wang, M. D. Wendt, H. Zhang, S. W. Fesik, and S. H. Rosenberg. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 435 :677–681, Jun 2005.
- [210] N. Sharma, S. Ramachandran, M. Bowers, M. Yegappan, R. Brown, S. Aziz, R. Chapman, and B. W. Yu. Multiple factors other than p53 influence colon cancer sensitivity to paclitaxel. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 46 :329–337, 2000. [△](#) **Accès refusé via BiblioVie.**
- [211] A. M. Ibrado, L. Liu, and K. Bhalla. Bcl-xL overexpression inhibits progression of molecular events leading to paclitaxel-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Cancer Res.*, 57 :1109–1115, Mar 1997.

- [212] Y. Huang, A. M. Ibrado, J. C. Reed, G. Bullock, S. Ray, C. Tang, and K. Bhalla. Co-expression of several molecular mechanisms of multidrug resistance and their significance for paclitaxel cytotoxicity in human AML HL-60 cells. *Leukemia*, 11 :253–257, Feb 1997.
- [213] Y. Huang, S. Ray, J. C. Reed, A. M. Ibrado, C. Tang, A. Nawabi, and K. Bhalla. Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 42 :73–81, Jan 1997.
- [214] R. K. Srivastava, A. R. Srivastava, S. J. Korsmeyer, M. Nesterova, Y. S. Cho-Chung, and D. L. Longo. Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 18 :3509–3517, Jun 1998.
- [215] T. Strobel, L. Swanson, S. Korsmeyer, and S. A. Cannistra. BAX enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93 :14094–14099, Nov 1996.
- [216] T. Strobel, Y. T. Tai, S. Korsmeyer, and S. A. Cannistra. BAD partly reverses paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Oncogene*, 17 :2419–2427, Nov 1998.
- [217] M. L. Flores, C. Castilla, R. Avila, M. Ruiz-Borrego, C. Saez, and M. A. Japon. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells requires efficient mitotic arrest and disruption of Bcl-xL/Bak interaction. *Breast Cancer Res. Treat.*, 133 :917–928, Jun 2012.
- [218] O. Kutuk and A. Letai. Alteration of the mitochondrial apoptotic pathway is key to acquired paclitaxel resistance and can be reversed by ABT-737. *Cancer Res.*, 68(19) :7985–7994, Oct 2008.
- [219] O. Kutuk and A. Letai. Displacement of Bim by Bmf and Puma rather than increase in Bim level mediates paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Cell Death Differ.*, 17 :1624–1635, Oct 2010.
- [220] M. E. Harley, L. A. Allan, H. S. Sanderson, and P. R. Clarke. Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *EMBO J.*, 29 :2407–2420, Jul 2010.
- [221] I. E. Wertz, S. Kusam, C. Lam, T. Okamoto, W. Sandoval, D. J. Anderson, E. Helgason, J. A. Ernst, M. Eby, J. Liu, L. D. Belmont, J. S. Kaminker, K. M. O'Rourke, K. Pujara, P. B. Kohli, A. R. Johnson, M. L. Chiu, J. R. Lill, P. K. Jackson, W. J. Fairbrother, S. Seshagiri, M. J. Ludlam, K. G. Leong, E. C. Dueber, H. Maecker, D. C. Huang, and V. M. Dixit. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature*, 471 :110–114, Mar 2011.
- [222] N. Barboule, I. Truchet, and A. Valette. Localization of phosphorylated forms of Bcl-2 in mitosis : co-localization with Ki-67 and nucleolin in nuclear structures and on mitotic chromosomes. *Cell Cycle*, 4 :590–596, Apr 2005.

- [223] M. Schwickart, X. Huang, J. R. Lill, J. Liu, R. Ferrando, D. M. French, H. Maecker, K. O'Rourke, F. Bazan, J. Eastham-Anderson, P. Yue, D. Dornan, D. C. Huang, and V. M. Dixit. Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature*, 463 :103–107, Jan 2010.
- [224] J. Shi, Y. Zhou, H. C. Huang, and T. J. Mitchison. Navitoclax (ABT-263) accelerates apoptosis during drug-induced mitotic arrest by antagonizing Bcl-xL. *Cancer Res.*, 71 :4518–4526, Jul 2011.
- [225] N. Tan, M. Malek, J. Zha, P. Yue, R. Kassees, L. Berry, W. J. Fairbrother, D. Sampath, and L. D. Belmont. Navitoclax enhances the efficacy of taxanes in non-small cell lung cancer models. *Clin. Cancer Res.*, 17 :1394–1404, Mar 2011.
- [226] L. Du, C. S. Lyle, and T. C. Chambers. Characterization of vinblastine-induced Bcl-xL and Bcl-2 phosphorylation : evidence for a novel protein kinase and a coordinated phosphorylation/dephosphorylation cycle associated with apoptosis induction. *Oncogene*, 24 :107–117, Jan 2005.
- [227] M. Upreti, E. N. Galitovskaya, R. Chu, A. J. Tackett, D. T. Terrano, S. Granell, and T. C. Chambers. Identification of the major phosphorylation site in Bcl-xL induced by microtubule inhibitors and analysis of its functional significance. *J. Biol. Chem.*, 283 :35517–35525, Dec 2008.
- [228] P. P. Ruvolo, X. Deng, and W. S. May. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia*, 15 :515–522, Apr 2001. [⚠ Accès refusé.](#)
- [229] A. Basu and S. Haldar. Identification of a novel Bcl-xL phosphorylation site regulating the sensitivity of taxol- or 2-methoxyestradiol-induced apoptosis. *FEBS Lett.*, 538 :41–47, Mar 2003.
- [230] Y. Tamura, S. Simizu, M. Muroi, S. Takagi, M. Kawatani, N. Watanabe, and H. Osada. Polo-like kinase 1 phosphorylates and regulates Bcl-x(L) during pironetin-induced apoptosis. *Oncogene*, 28 :107–116, Jan 2009.
- [231] L. Bricchese and A. Valette. PP1 phosphatase is involved in Bcl-2 dephosphorylation after prolonged mitotic arrest induced by paclitaxel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294 :504–508, Jun 2002.
- [232] K. W. Sherrill, M. P. Byrd, M. E. Van Eden, and R. E. Lloyd. BCL-2 translation is mediated via internal ribosome entry during cell stress. *J. Biol. Chem.*, 279 :29066–29074, Jul 2004.
- [233] L. Marash, N. Liberman, S. Henis-Korenblit, G. Sivan, E. Reem, O. Elroy-Stein, and A. Kimchi. DAP5 promotes cap-independent translation of Bcl-2 and CDK1 to facilitate cell survival during mitosis. *Mol. Cell*, 30 :447–459, May 2008.
- [234] M. J. Moore, Q. Wang, C. J. Kennedy, and P. A. Silver. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell*, 142 :625–636, Aug 2010.
- [235] J. Wang, M. Beauchemin, and R. Bertrand. Phospho-Bcl-xL(Ser62) plays a key role at DNA damage-induced G<sub>2</sub> checkpoint. *Cell Cycle*, 11, Jun 2012.

- [236] E. Schmitt, M. Beauchemin, and R. Bertrand. Nuclear colocalization and interaction between bcl-xL and cdk1(cdc2) during G2/M cell-cycle checkpoint. *Oncogene*, 26 :5851–5865, Aug 2007.
- [237] O. J. Shah, X. Lin, L. Li, X. Huang, J. Li, M. G. Anderson, H. Tang, L. E. Rodriguez, S. E. Warder, S. McLoughlin, J. Chen, J. Palma, K. B. Glaser, C. K. Donawho, S. W. Fesik, and Y. Shen. Bcl-XL represents a druggable molecular vulnerability during aurora B inhibitor-mediated polyploidization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107 :12634–12639, Jul 2010.
- [238] C. Zhang, Z. Ao, A. Seth, and S. F. Schlossman. A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J. Immunol.*, 157 :3980–3987, Nov 1996.
- [239] Y. Nagahara, M. Tanaka, and T. Shinomiya. Mechanism of mitochondrial 7A6 antigen exposure triggered by distinct apoptotic pathways : involvement of caspases. *Cytometry A*, 71 :232–241, Apr 2007.
- [240] K. Kuřelova, D. Grebeřova, and B. Brodska. Dose-dependent effects of the caspase inhibitor Q-VD-OPh on different apoptosis-related processes. *J. Cell. Biochem.*, 112 :3334–3342, Nov 2011.
- [241] H. Kurokawa, K. Nishio, H. Fukumoto, A. Tomonari, T. Suzuki, and N. Saijo. Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild-type MCF-7, breast cancer cells. *Oncol. Rep.*, 6 :33–37, 1999.
- [242] J. Ryan and A. Letai. BH3 profiling in whole cells by fluorimeter or FACS. *Methods*, 61 :156–164, Jun 2013.
- [243] J. A. Ryan, J. K. Brunelle, and A. Letai. Heightened mitochondrial priming is the basis for apoptotic hypersensitivity of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107 :12895–12900, Jul 2010.
- [244] T. Ni Chonghaile, K. A. Sarosiek, T. T. Vo, J. A. Ryan, A. Tammareddi, V. d. e. l. G. Moore, J. Deng, K. C. Anderson, P. Richardson, Y. T. Tai, C. S. Mitsiades, U. A. Matulonis, R. Drapkin, R. Stone, D. J. Deangelo, D. J. McConkey, S. E. Sallan, L. Silverman, M. S. Hirsch, D. R. Carrasco, and A. Letai. Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science*, 334 :1129–1133, Nov 2011.
- [245] M. F. van Delft, A. H. Wei, K. D. Mason, C. J. Vandenberg, L. Chen, P. E. Czabotar, S. N. Willis, C. L. Scott, C. L. Day, S. Cory, J. M. Adams, A. W. Roberts, and D. C. Huang. 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, Nov 2006.
- [246] H. Goto, Y. Yasui, A. Kawajiri, E. A. Nigg, Y. Terada, M. Tatsuka, K. Nagata, and M. Inagaki. Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J. Biol. Chem.*, 278 :8526–8530, Mar 2003.

- [247] D. E. Wood, A. Thomas, L. A. Devi, Y. Berman, R. C. Beavis, J. C. Reed, and E. W. Newcomb. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene*, 17 :1069–1078, Sep 1998.
- [248] J. Bertin-Ciftci, B. Barre, J. Le Pen, L. Maillet, C. Couriaud, P. Juin, and F. Braun. pRb/E2F-1-mediated caspase-dependent induction of Noxa amplifies the apoptotic effects of the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737. *Cell Death Differ.*, 20 :755–764, May 2013.
- [249] S. W. Tait, M. J. Parsons, F. Llambi, L. Bouchier-Hayes, S. Connell, C. Munoz-Pinedo, and D. R. Green. Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Dev. Cell*, 18 :802–813, May 2010.
- [250] M. Thery. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J. Cell. Sci.*, 123 :4201–4213, Dec 2010.
- [251] Z. Li, T. Tian, F. Lv, Y. Chang, X. Wang, L. Zhang, X. Li, L. Li, W. Ma, J. Wu, and M. Zhang. Six1 promotes proliferation of pancreatic cancer cells via upregulation of cyclin D1 expression. *PLoS ONE*, 8 :e59203, 2013.
- [252] S. M. Farabaugh, D. S. Micalizzi, P. Jedlicka, R. Zhao, and H. L. Ford. Eya2 is required to mediate the pro-metastatic functions of Six1 via the induction of TGF- $\beta$  signaling, epithelial-mesenchymal transition, and cancer stem cell properties. *Oncogene*, 31 :552–562, Feb 2012.
- [253] J. P. Chow, R. Y. Poon, and H. T. Ma. Inhibitory phosphorylation of cyclin-dependent kinase 1 as a compensatory mechanism for mitosis exit. *Mol. Cell. Biol.*, 31 :1478–1491, Apr 2011.
- [254] N. Sakurikar, J. M. Eichhorn, and T. C. Chambers. Cyclin dependent kinase-1 (Cdk1)/cyclin B1 dictates cell fate after mitotic arrest via phospho-regulation of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J. Biol. Chem.*, Sep 2012.
- [255] R. W. King, J. M. Peters, S. Tugendreich, M. Rolfe, P. Hieter, and M. W. Kirschner. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell*, 81 :279–288, Apr 1995.
- [256] J. W. Raff, K. Jeffers, and J. Y. Huang. The roles of Fzy/Cdc20 and Fzr/Cdh1 in regulating the destruction of cyclin B in space and time. *J. Cell Biol.*, 157 :1139–1149, Jun 2002.
- [257] K. Crasta, H. H. Lim, T. H. Giddings, M. Winey, and U. Surana. Inactivation of Cdh1 by synergistic action of Cdk1 and polo kinase is necessary for proper assembly of the mitotic spindle. *Nat. Cell Biol.*, 10 :665–675, Jun 2008.
- [258] N. J. Winston. Stability of cyclin B protein during meiotic maturation and the first mitotic cell division in mouse oocytes. *Biol. Cell*, 89 :211–219, Jun 1997. [△ Accès refusé.](#)

- [259] L. A. Hyslop, V. L. Nixon, M. Levasseur, F. Chapman, K. Chiba, A. McDougall, J. P. Venables, D. J. Elliott, and K. T. Jones. Ca(2+)-promoted cyclin B1 degradation in mouse oocytes requires the establishment of a metaphase arrest. *Dev. Biol.*, 269 :206–219, May 2004.
- [260] H. C. Huang, J. Shi, J. D. Orth, and T. J. Mitchison. Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly. *Cancer Cell*, 16 :347–358, Oct 2009.
- [261] J. M. Eichhorn, N. Sakurikar, S. E. Alford, R. Chu, and T. C. Chambers. Critical role of anti-apoptotic Bcl-2 protein phosphorylation in mitotic death. *Cell Death Dis*, 4 :e834, 2013.
- [262] H. Dai, H. Ding, X. W. Meng, S. H. Lee, P. A. Schneider, and S. H. Kaufmann. Contribution of Bcl-2 Phosphorylation to Bak Binding and Drug Resistance. *Cancer Res.*, Oct 2013.
- [263] M. Wong, N. Tan, J. Zha, F. V. Peale, P. Yue, W. J. Fairbrother, and L. D. Belmont. Navitoclax (ABT-263) reduces Bcl-x(L)-mediated chemoresistance in ovarian cancer models. *Mol. Cancer Ther.*, 11 :1026–1035, Apr 2012.
- [264] H. C. Huang, T. J. Mitchison, and J. Shi. Stochastic competition between mechanistically independent slippage and death pathways determines cell fate during mitotic arrest. *PLoS ONE*, 5 :e15724, 2010.
- [265] I. Vitale, M. Jemaa, L. Senovilla, L. Galluzzi, S. Rello-Varona, D. Metivier, H. Ripoche, V. Lazar, P. Dessen, M. Castedo, and G. Kroemer. Involvement of p38alpha in the mitotic progression of p53(-/-) tetraploid cells. *Cell Cycle*, 9 :2823–2829, Jul 2010.
- [266] L. Senovilla, I. Vitale, L. Galluzzi, S. Vivet, N. Joza, A. B. Younes, S. Rello-Varona, M. Castedo, and G. Kroemer. p53 represses the polyploidization of primary mammary epithelial cells by activating apoptosis. *Cell Cycle*, 8 :1380–1385, May 2009.

## Résumé

Les poisons des microtubules, comme le paclitaxel, sont des composés qui modifient la dynamique des microtubules, et bloquent les cellules en mitose par non-satisfaction du point de contrôle mitotique. La principale cible du point de contrôle mitotique est l'APC/C, une ligase E3 qui régule la dégradation de protéines importantes pour la progression de la mitose. Un des substrats est la cycline B1, le cofacteur essentiel à l'activité de Cdk1, et par conséquent essentiel pour le maintien de la mitose. Sous paclitaxel, le point de contrôle mitotique est actif, et cela aboutit à un blocage en mitose due à l'inhibition d'APC/C via la séquestration de Cdc20. Cet arrêt mitotique peut aboutir à plusieurs devenir cellulaires, notamment la mort mitotique et l'échappement à l'arrêt mitotique. Nous nous sommes intéressés au rôle de Bel-xL pendant l'arrêt mitotique induit par le paclitaxel et l'extinction de Cdc20, dans des lignées de cancer du sein. Il apparaît que la mort mitotique induite par le paclitaxel ou l'extinction de Cdc20 n'est pas dépendante des caspases, ni de Bax et Bak. L'extinction de Bel-xL, ou le traitement par l'ABT-737, pendant l'arrêt mitotique induisait une conversion de la mort mitotique en une apoptose classique dépendante des caspases et de Bax. Cette activité de Bel-xL est dépendante de sa phosphorylation sur la sérine 62, modulant ainsi son interaction avec Bax, ~

**Mots-clés:** famille Bel-2, arrêt mitotique, mort cellulaire, polyploïdie, agents antimitotiques, BH3-mimetics, BH3-profiling

## Résumé

Antimitotic agents such as microtubule inhibitors (paclitaxel) are widely used in cancer therapy while new agents blocking mitosis onset are currently in development. All these agents impose a prolonged mitotic arrest in cancer cells that relies on sustained activation of the spindle assembly checkpoint and may lead to subsequent cell death by incompletely understood molecular events. We have investigated the role played by anti-apoptotic Bcl-2 family members in the fate of mitotically arrested mammary tumor cells treated with paclitaxel, or depleted in Cdc20, the activator of the anaphase promoting complex. Under these conditions, a weak and delayed mitotic cell death occurs that is caspase- and Bax/Bak-independent. Moreover, BH3 profiling assays indicate that viable cells during mitotic arrest are primed to die by apoptosis and that Bcl-xL is required to maintain mitochondrial integrity. Consistently, Bcl-xL depletion, or treatment with its inhibitor ABT-737 (but not with the specific Bcl-2 inhibitor ABT-199), during mitotic arrest converts cell response to antimitotics to efficient caspase and Bax-dependent apoptosis. Apoptotic priming under conditions of mitotic arrest relies, at least in part, on the phosphorylation on serine 62 of Bcl-xL, which modulates its interaction with Bax and its sensitivity to ABT-737. The phospho-mimetic S62D-Bcl-xL mutant is indeed less efficient than the corresponding phospho-deficient S62A-Bcl-xL mutant in sequestering Bax and in protecting cancer cells from mitotic cell death or yeast cells from Bax-induced growth inhibition. Our results provide a rationale for combining Bcl-xL targeting to antimitotic agents to improve clinical efficacy of antimitotic strategy in cancer therapy.

**Key Words :** BCL2 family, mitotic arrest, cell death, polyploidy, BH3 mimetics, BH3 profiling, anti-mitotic agents