

Thèse de Doctorat

Céline VUILLIER

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Nantes sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Biologie Cellulaire*

Spécialité : *Cancérologie*

Unité de recherche : *CRCNA – U892*

Soutenue le *19 décembre 2016*

Thèse N° :

Régulation de l'apoptose mitochondriale par E2F1

Implication de la localisation mitochondriale d'E2F1 et des interactions engagées avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

JURY

Rapporteurs : **Béatrice Eymin**, Directeur de recherche INSERM, Institut Albert Bonniot de Grenoble
Muriel Priault, Chargé de recherche CNRS, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires de Bordeaux

Examineurs : **Martine Amiot**, Directeur de recherche CNRS, Centre de recherche en cancérologie Nantes-Angers
Jonathan Lopez, Maître de conférence universitaire, Centre de recherche en cancérologie de Lyon

Directeur de Thèse : **Laurent Maillet**, Chargé de recherche INSERM, Centre de recherche en cancérologie Nantes-Angers

Sommaire

Vous vous apprêtez à lire cette thèse ou peut être juste les remerciements pour les moins courageux, ce que je conçois, alors avant tout je voulais dire que la thèse c'est une expérience qui restera gravée dans ma mémoire et que j'ai vécu à 200%. C'est non seulement un travail de recherche, de méthodologie, de rigueur mais c'est aussi les montagnes russes des émotions. C'est incroyable à quel point, une multitude de sentiments peuvent se bousculer en un rien de temps. C'est le passage de l'adrénaline, l'excitation des manips et des résultats, à l'incertitude ou la déception lorsque les hypothèses ne se confirment pas. C'est l'envie de toujours avancer plus loin et plus vite, ce qui vaut d'ailleurs beaucoup de soirs et weekends passés au labo, pour parfois laisser place au découragement. Et pourtant au final, on est fier de ce que l'on a réussi à produire et exploiter car tout ces efforts, à leur échelle, participent à faire avancer la recherche, même si cela reste minime.

Alors bien sûr rien de tout cela n'aurait été possible sans **Philippe** et **Laurent**. Un énorme merci à toi, Philippe, pour m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire et avoir su me redonner l'énergie qu'il fallait à chacune de nos réunions. Laurent, merci pour ton encadrement, de m'avoir accompagnée, suivie et probablement par moment supportée pendant ces trois années de thèse. Je ne suis pas prête d'oublier tout ces raisonnements sur nos résultats de Bret et nos débats à ce sujet. Que la puissance de l'outil Bret combiné à la force de l'outil levure soit !!! Je tenais à vous remercier également pour la liberté avec laquelle vous m'avez laissé mener à bien ce projet de recherche car il est vrai que j'ai ce côté solitaire où j'apprécie d'avancer, dans un premier temps, seule pour me confronter par la suite à votre avis ou vos critiques. Par ailleurs, grâce à vous j'ai eu l'opportunité de participer au congrès Cold Spring Harbor de New-York et d'intégrer durant ma thèse un autre laboratoire à l'étranger donc encore un grand merci à vous deux !

Je tiens également à remercier mes deux rapporteurs de thèse **Béatrice Eymín** et **Muriel Priault** pour l'évaluation de mon travail de thèse, ainsi que les autres membres du jury : **Jonathan Lopez** et **Martine Amiot**. Par ailleurs, je tiens à remercier **Laurence Dubrez** ainsi que **Frédérique Braun** pour le suivi de mes travaux lors des comités de suivi de thèse et tous leurs conseils et suggestions pour le faire avancer au mieux. Une mention spéciale pour toi, Fred, qui m'a appris les bases du travail en laboratoire pendant mon M2 et toutes ses petites habitudes essentielles pour faire un travail soigné. De plus, je tiens à témoigner ma reconnaissance au Pr **Andrew Gilmore** pour m'avoir accueillie à deux reprises dans son laboratoire à Manchester et m'avoir enseigné, avec son étudiante **Louise King**, tous les rudiments de la technique de FRAP.

Sommaire

Pendant ces trois années de thèse, j'ai eu l'occasion de rencontrer pleins de personnes formidables. Un grand merci à toi **Fabien** pour tes conseils sur le Bret et surtout ne change rien à ces petits sourires en coin, qui lors de nos réunions d'équipe, veulent tout dire et m'ont toujours tellement amusés. **Fred** (Souazé), tu as été à la fois la source de nombreux rires pendant nos pauses repas et aussi une maman au labo, qui surveille ses petits doctorants et les conseille en cas de problème, encore merci. Je n'oublierai jamais la merveilleuse **Chacha**, qui exprime avec tellement de sincérité toutes ses émotions : les positives pour notre plus grand bonheur comme parfois les négatives mais toujours en humour. Merci également à **Soph**, dont les nombreux conseils en matière de qPCR m'ont beaucoup aidé. Tu resteras pour moi l'effigie de la rigueur au laboratoire. En tout cas, j'ai adoré nos discussions, tard le soir quand j'étais en retard dans mes manips, qui remontaient toujours le moral. Merci également à toi **Céline S.** alias la grande Céline pour avoir su faire de moi une FACS loveuse ce qui n'a pas été une mince à faire !! **Sophie**, je te remercie pour tes conseils en matière d'analyse du FACS et ta bonne humeur au labo. Je tiens également à remercier la petite **Auréli**e, technicienne en or, qui a su produire des plasmides en folie dont j'ai bien profité pendant ma thèse. Une petite pensée pour **Antonin**, qui a également connu le clonage E2F1, merci encore !

Et bien sûr, je n'aurai jamais autant apprécié ces trois années de thèse si je n'avais pas rencontré la Boob's Team. Je me souviens encore à mon arrivé en M2, **Nounou** me dire « la thèse c'est comme la cigarette, il ne faut jamais commencer ». Tu n'as pas tort, on devient accro à ce que l'on fait. **Janic**, dénommée Pucelle de Lorient, merci d'avoir amené un vent de folie dans cette équipe et pour tous nos craquages en salle de culture dès le lundi matin. Merci de m'avoir initiée au rite de la Beer session, je pense avoir été un bon apprenti. **Ma Loloïse**, soit disant Vierge Eloïse, merci pour tous nos instants potins du labo ou ramenés tout droit de la maison. Les meilleurs sont ceux avec QuiQui !! Je suppose que la thèse fait grandir puisque tu ne me fais plus peur du tout ! En tout cas sans toi, fini les Sushis Party pour ma plus grande tristesse. Sainte **Jessie**, ma Jessie adorée, un énorme merci pour tous ces instants partagés au labo et en dehors. La salle de culture : lieu de tous nos instants privilégiés que ce soit pour nos confidences ou pour nos délires musicaux, sans oublier ces instants fous rires lors de discussions plus ... Chut c'est entre nous ! En tout cas merci pour tous tes conseils, bien sûr le plus important c'est que « pour vaincre sa peur il faut devenir sa peur ». Nos instants fufous me manquent !!

La Boob's Team certes, mais pas que ! Un énorme merci à **Audrey** pour tous nos moments partagés ensemble, les pauses paninis et bentos. Tes instants maladroits m'auront valu quelques éclats de rire ! Surtout ne change rien c'est extra !! **Lucie**, une copine de labo, une copine de lasagne et bien entendu une copine d'apéro !! Merci pour

Sommaire

toutes nos discussions pendant les pauses centré et en salle de culture. Et à très vite sur Lyon, compte sur moi !! Mon petit **Kévinou**, tu es si mignon, à prendre soin de tous tes CAFounets ! J'étais déjà contente de ta présence en M2, c'est ravie que je t'ai retrouvé en thèse pour toujours plus de moments papotages, de soirées croque-monsieur ou Disney en folie !! Tu n'as pas fini de me voir chez toi !! Même si ce n'est que de passage, **David**, tu as été un véritable compagnon de manip. Je me rappelle encore la fois où je t'expliquais comment faire de A à Z ta manip de Western Blot !! Tes grands yeux écarquillés m'ont fait comprendre que j'avais encore beaucoup de chemin à faire en terme de pédagogie, mais cela m'aura bien amusé. En tout cas c'est noté : HSP90 Forever !!! **Steven**, merci d'avoir instauré les Nesquik Time, rien ne vaut un chocoprince et un bon chocolat chaud pour repartir plus fort que jamais faire une foultitude de manips en folie. Merci pour tous nos instants partagés au FACS et en salle de culture et nos discussions le weekend quand la motivation n'était pas forcément là.

Ma petite **Nina**, c'est depuis la L1 que l'on se soutient mutuellement et que l'on partage nos moments de bonheurs ou de tristesse et j'espère que cela continuera encore pendant longtemps. Nos rendez-vous au RU me manqueront ! Merci d'avoir été une oreille attentive pendant toutes ses années. J'espère avoir su te rendre la pareille. Je te souhaite bon courage pour ta dernière année de thèse. Je suis persuadée que tu déchireras tout !!!

Que serais-je sans ma merveilleuse petite fille ? **Ma petite Kéline**, tu m'auras accompagnée pendant ses huit années d'études ! Tu es ce qui me donne chaque jour la force d'aller de l'avant, de ne jamais regarder en arrière et surtout ne rien regretter. Grâce à toi mon petit bébé, j'ai su trouvé un équilibre entre le labo et la maison. Merci d'avoir été si compréhensive pour toutes ses nombreuses fois où je n'ai pas été toujours disponible. **Mon Doudou d'amour**, j'ai tellement de chance de t'avoir rencontré ! Te voir chaque jour, me remplit d'énergie ! Merci d'être là à mes côtés, de me reconforter dans les moments difficiles et bien sûr de partager avec moi tous ces moments de bonheurs : les petits du quotidien (dédicace aux pancakes Pandas + Nutella) comme les plus grands. Je pense que sans vous, j'aurais probablement dormi au labo tant il est difficile de se détacher de son travail. Je l'ai d'ailleurs constaté quand j'étais à Manchester, il n'y avait plus aucune raison de rentrer le soir. Mais le travail a beau être passionnant, c'est grâce à vous deux si je suis aujourd'hui heureuse et épanouie, encore merci !!!

.....Introduction.....14

A. Le cancer, avant tout une pathologie génétique.....15

I. Altérations génétiques à l'origine des cancers	15
1. Les oncogènes.....	15
2. Les gènes suppresseurs de tumeur	16
II. Acquisition d'un phénotype tumoral suite à l'accumulation de mutations géniques	17
1. Signalisation proliférative soutenue	18
2. Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs.....	19
3. Résistance à la mort cellulaire	19
4. Immortalité répllicative	20
5. Induction de l'angiogénèse.....	20
6. Capacité invasive et formation de métastases	21
7. Caractéristiques tumorales supplémentaires	22

B. La mort cellulaire : nombreuses sont les voies qui y mènent.....24

I. Morts cellulaires apoptotiques.....	24
1. Caractéristiques morphologiques.....	25
2. Stimuli pro-apoptotiques.....	25
3. Apoptose extrinsèque.....	27
4. Apoptose intrinsèque	28
a. Complexes moléculaires responsables de la MOMP	29
b. Cinétique de déclenchement de la MOMP	32
c. Libération de facteurs pro-apoptotiques de l'espace inter-membranaire après la MOMP	32
d. Le réseau mitochondrial : Rôle passif ou actif dans le déclenchement de la MOMP ?	34
e. Formation de l'apoptosome, activation de la caspase 9 et éléments régulateurs.....	35
5. Mort cellulaire indépendante des caspases	37
6. Mécanismes d'échappement à l'apoptose caspase dépendante et caspase indépendante.....	39
II. Morts cellulaires non apoptotiques.....	41
1. Mort cellulaire autophagique, interconnectée à l'apoptose	41
2. Nécroptose et interconnexion à la voie apoptotique.....	44

C. La famille Bcl-2.....	47
I. Classification des membres de la famille Bcl-2 sur des bases structurales et fonctionnelles	47
II. Structure moléculaire des complexes entre les membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques et sélectivité associée	49
III. Les modèles d'interactions contrôlant l'activation des effecteurs Bax et Bak	50
1. Modèle d'activation indirecte ou de neutralisation	50
2. Modèle d'activation directe	51
3. Modèle unifié	52
IV. Activation des effecteurs Bax et Bak	54
1. Rôle central des BH3-Only activateurs dans l'activation et la dimérisation symétrique des effecteurs	55
2. Rôle coopératif des BH3-Only avec les effecteurs pour induire la formation d'oligomères asymétriques.....	57
3. La MOM survient-elle systématiquement en présence d'oligomères de Bax et Bak ?	57
4. Le rôle des BH3-Only activateurs est-il vraiment redondant dans l'activation de Bax et Bak ?	58
V. Apoptose uniquement dépendante de Bak	59
VI. Régulation de l'activation des effecteurs Bax et Bak par le ciblage intracellulaire des protéines de la famille Bcl-2	61
1. Localisation des membres de la famille Bcl-2 en absence de stress.....	61
a. Ciblage des protéines anti-apoptotiques.....	61
b. Ciblage des protéines pro-apoptotiques effectrices	63
c. Ciblage des protéines pro-apoptotiques BH3-Only	64
2. Relocalisation des protéines de la famille Bcl-2 lors d'un stress apoptotique	65
a. Changement de localisation des anti-apoptotiques	65
b. La localisation mitochondriale des effecteurs lors d'un stress régit leur activation et oligomérisation : Rôle de la translocation mitochondriale de Bax et des interactions engagées au cytosol et à la MOM	65
c. Translocation mitochondriale des BH3-Only	67
3. Phénomène de rétro-translocation	69
VII. Régulation de l'activation de Bax et Bak par des voies suppressives de tumeur	73
1. Voie tumeur suppressive p53	73
a. Première évidence d'un rôle pro-apoptotique non transcriptionnel.....	73
b. Découverte d'un rôle pro-apoptotique de p53 directement aux mitochondries.....	74
c. Lien entre la famille Bcl-2 et p53 localisé aux mitochondries ou au cytosol	74
d. Bases moléculaires de l'interaction p53 – Bcl-xL	75
e. Mécanisme proposé de translocation mitochondriale de p53	76
2. Voie tumeur suppressive pRb.....	76
VIII. Régulation pharmacologique de la famille Bcl-2 comme stratégie anti-tumorale	77
1. Dérégulation de la famille Bcl-2 dans les cancers.....	78
2. Définition du priming mitochondrial et du profilage BH3	79
3. Ciblage thérapeutique des protéines anti-apoptotiques	81

D. La voie pRB/E2F1.....	85
--------------------------	----

I. Les facteurs de transcription E2Fs : toute une famille	85
1. Découverte de pRB/E2F : une histoire vieille de 30 ans	85
2. La famille E2F/pRB prend de l'ampleur	87
3. Structure protéique des facteurs de transcription E2Fs	88
4. Classification des membres E2Fs : activateurs ou répresseurs transcriptionnels	90
a. Mécanisme d'activation de la transcription par les E2Fs	91
b. Mécanisme de répression passive de la transcription dépendante des E2Fs	92
c. Mécanisme de répression active de la transcription dépendante des E2Fs par les protéines pRB	92
d. Mécanisme de répression active de la transcription directement par les E2Fs indépendamment des protéines pRB et DP5	93
e. Deux groupes d'E2Fs : activateurs et répresseurs, une classification discutable	94
5. L'intégralité des membres de la famille E2Fs intervient dans le cycle cellulaire	94
a. Les E2Fs répresseurs sont en action durant la phase G ₀	95
b. Les E2Fs activateurs : rôle central dans la transition des phases G ₁ /S	96
c. Atténuation de l'activité des E2Fs activateurs en fin de phase S	97
d. Un rôle certain mais encore mal défini des E2Fs au cours de la phase M	98
II. E2F1 : Une protéine aux fonctions si paradoxales	98
1. Découverte d'un rôle pro-apoptotique d'E2F1	98
2. Voie d'apoptose initiée par E2F1 et dépendante de p53	99
a. Stabilisation de p53 par E2F1	100
b. Stimulation de l'activité transcriptionnelle de p53 par E2F1	100
c. Coopération d'E2F1 et p53 pour induire efficacement l'apoptose	101
d. Boucle de rétrocontrôle négatif d'E2F1 sur l'activité de p53	101
3. Voie d'apoptose initiée par E2F1 et indépendante de p53	102
a. E2F1 régule l'expression de composants critiques de la voie d'apoptose mitochondriale	103
b. E2F1 induit l'apoptose par des voies détournées	104
4. Voie d'apoptose induite par E2F1 indépendamment de ses fonctions transcriptionnelles	105
5. Mécanismes de régulation des fonctions apoptotiques d'E2F1	106
a. Régulation par modifications post-traductionnelles	106
b. Régulation par interaction avec divers partenaires protéiques	110
III. E2F1 : Oncogène ou Suppresseur de tumeur ?	113
1. La voie pRB/E2Fs dans les cancers	113
2. E2F1 : Propriété oncogénique	115
3. E2F1 : Propriété suppressive de tumeur	115
4. Comment expliquer l'ambivalence d'E2F1 dans les tumeurs ?	116
IV. Régulation de la voie pRB/E2F1 par des actions non canoniques de la famille Bcl-2	117
1. Régulation du cycle cellulaire	117
2. Régulation de la réparation des dommages à l'ADN	118
3. Régulation de l'apoptose	119

.....**Objectifs de la thèse.....121**

.....**Résultats de thèse.....124**

I. L'apoptose induite par un stress génotoxique est dépendante d'E2F1 125

II. Mise au point d'un modèle de mort cellulaire induite par E2F1 127

III. La mort cellulaire induite par E2F1 implique une voie non transcriptionnelle..... 132

1. Protéines E2F1 déficientes pour ses fonctions transcriptionnelles 133

2. Rôle des fonctions transcriptionnelles d'E2F1 dans la progression du cycle cellulaire 134

3. Rôle des fonctions transcriptionnelles d'E2F1 dans la voie d'induction de l'apoptose..... 135

IV. Localisation de la protéine E2F1 au niveau des mitochondries 138

V. Rôle du pool d'E2F1 mitochondrial..... 140

1. Mise au point d'un modèle d'étude du ciblage d'E2F1 aux mitochondries 140

2. La progression du cycle cellulaire est insensible à la forme mitochondriale d'E2F1..... 142

3. E2F1 exerce une fonction pro-apoptotique directement aux mitochondries indépendante de ses fonctions transcriptionnelles 143

4. Caractérisation de la mort cellulaire induite par E2F1 mitochondrial..... 146

VI. Fraction E2F1 mitochondriale et stress génotoxique 148

1. Un stress génotoxique favorise le recrutement d'E2F1 aux mitochondries..... 148

2. E2F1 mitochondrial favorise la réponse apoptotique induite par un stress génotoxique 150

3. E2F1 mitochondrial amplifie l'action pro-apoptotiques des protéines BH3-Only..... 152

4. Rôle indispensable des caspases dans l'apoptose promue par E2F1 aux mitochondries et les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 155

VII. Recherche du mécanisme moléculaire mis en œuvre par E2F1 aux mitochondries pour promouvoir l'apoptose. 156

1. Implication de la voie autophagique dans la mort induite par E2F1 mitochondrial ?..... 156

2. Implication de la dynamique mitochondriale dans la mort induite par E2F1 mitochondrial ? 157

3. L'inhibition des protéines anti-apoptotiques favorise les réponses apoptotiques induites par un stress génotoxique ou par expression directe des protéines BH3-Only et effectrices Bak et Bax 159

4. E2F1 interagit avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 161

VIII. Caractérisation de l'interaction E2F1 – Bcl-xL 163

1. L'interaction E2F1 – Bcl-xL est retrouvée dans différentes lignées tumorales..... 163

2. Bcl-xL favorise le recrutement d'E2F1 aux mitochondries 165

3. Recherche des domaines de Bcl-xL impliqués dans son interaction avec E2F1 167

a. L'interaction se fait indépendamment du sillon hydrophobe de Bcl-xL..... 167

b. Bcl-xL inhibe l'apoptose induite par E2F1 mitochondrial par le biais de ses fonctions canoniques 170

c. L'interaction E2F1 – Bcl-xL est-elle semblable à celle entre p53 et Bcl-xL ?..... 172

d. Rôle de la région N-terminale de Bcl-xL dans son interaction à E2F1 173

Sommaire

4.	Recherche des domaines protéiques d'E2F1 impliqués dans son association à Bcl-xL	174
a.	L'interaction se fait au niveau de la région N-terminale d'E2F1 comprenant le DBD	174
b.	La région N-terminale d'E2F1 comporte des domaines responsables de la mort non transcriptionnelle	176
IX.	Influence d'E2F1 et Bcl-xL sur leurs fonctions respectives	179
1.	Bcl-xL ne modifie pas les fonctions nucléaires transcriptionnelles d'E2F1.....	179
a.	Bcl-xL ralentit le transport nucléocytoplasmique d'E2F1.....	179
b.	Bcl-xL n'inhibe pas les fonctions transcriptionnelles d'E2F1.....	180
2.	E2F1 module les fonctions mitochondriales de Bcl-xL	183
a.	E2F1 ralentit la dynamique de Bcl-xL et Mcl-1 aux mitochondries	183
b.	La régulation de la mobilité de Bcl-xL par E2F1 se fait indépendamment de ses fonctions transcriptionnelles	187
c.	Localisation, mobilité et fonction anti-apoptotique de Bcl-xL sont autant de paramètres étroitement liés	189

.....Discussion.....192

I.	Régulation de l'apoptose par E2F1 en réponse à un stress génotoxique	193
II.	Régulation de l'apoptose par surexpression d'E2F1 en absence de stress génotoxique ...	194
1.	Modèle d'étude de la mort induite par E2F1	194
2.	Implication de l'activité transcriptionnelle d'E2F1 dans la mort cellulaire	194
a.	E2F1 induit la transcription de gènes cibles pro-apoptotiques.....	194
b.	E2F1 induit une apoptose dépendante des caspases associée à la MOMP	196
c.	E2F1 induit une apoptose en absence de ses fonctions transcriptionnelles.....	196
III.	Localisation mitochondriale d'E2F1 et fonctions apoptotiques associées	198
1.	Identification d'une fraction de protéines E2F1 aux mitochondries	198
2.	Régulation de l'apoptose par E2F1, directement ciblé aux mitochondries.....	199
IV.	Enjeux de l'apoptose régulée par E2F1 directement aux mitochondries	201
1.	Variation du pool E2F1 mitochondrial en réponse à un stress génotoxique.....	201
2.	L'augmentation du pool d'E2F1 mitochondrial accroît la sensibilité des cellules à l'apoptose	202
V.	Lien direct entre E2F1 et la famille Bcl-2	203
1.	E2F1 interagit avec les protéines anti-apoptotiques	203
2.	La capacité d'E2F1 à interagir avec Bcl-xL semble requise pour ses fonctions apoptotiques	206
3.	Bcl-xL régule la dynamique d'E2F1 sans perturber ses fonctions transcriptionnelles.....	207
4.	E2F1 régule la dynamique des protéines anti-apoptotiques.....	208
5.	Les fonctions anti-apoptotiques de Bcl-xL dépendent de sa dynamique	209
VI.	Conclusions générales.....	210

.....**Matériels et Méthodes.....213**

I.	Lignées cellulaires	214
II.	Transfections de plasmides / siRNAs et infections lentivirales	216
III.	Extraction d'ARN et RT-qPCR (Real Time quantitative Polymerization Chain Reaction)....	218
IV.	Western blot (WB)	220
V.	Immunoprécipitation (IP)	221
VI.	Fractionnement cellulaire	222
VII.	BRET Assay (Bioluminescence Resonance Energy Transfer).....	223
VIII.	Pull Down	224
IX.	Microscopie	224
1.	FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)	224
2.	FLIP (Fluorescence Loss After Photobleaching)	225
3.	Marquage du noyau et des mitochondries.....	226
X.	Cytométrie en flux	226
1.	Analyse du cycle cellulaire	226
2.	Analyse de l'activation de la caspase 3.....	227
3.	Analyse de l'apoptose.....	227
XI.	Analyses statistiques.....	228

.....**Bibliographie.....229**

.....**Annexes.....252**

Annexe 1 - Constitutive p53 heightens mitochondrial apoptotic priming and favors cell deathinductionbyBH3mimetic inhibitors ofBCL-XL.....	253
Annexe 2 - Tight sequestration of BH3 proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes Contributes to Apoptotic Resistance.....	266
Annexe 3 - E2F1 interacts with BCL-xL and regulates its subcellular localization dynamics to trigger cell death.....	286

Tables des Figures

Figure 1	Caractéristiques acquises dans les cancers	18
Figure 2	Processus de dissémination métastatique des cellules cancéreuses.....	21
Figure 3	Nouvelles caractéristiques définies dans les cancers.....	22
Figure 4	Voies d'apoptose intrinsèque (gauche) et extrinsèque (droite)	26
Figure 5	Activation des caspases	28
Figure 6	Modèle proposé de composition du PTP (Permeability Transition Pore).....	30
Figure 7	Formation du pore apoptotique par les effecteurs Bax et Bak.....	31
Figure 8	Régulation du relargage des protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial à postériori de la MOMP	33
Figure 9	Formation de l'apoptosome : plateforme d'activation de la caspase 9.....	36
Figure 10	Mort cellulaire indépendante des caspases : CICD.....	38
Figure 11	Modèle de repeuplement mitochondrial, requis pour la survie cellulaire après MOMP	40
Figure 12	Mécanisme général d'autophagie	41
Figure 13	Rôle paradoxal de l'autophagie dans la voie apoptotique.....	42
Figure 14	Mécanisme général de la nécroptose.....	44
Figure 15	Structure des protéines de la famille Bcl-2.....	48
Figure 16	Structure des complexes Domaine BH3 – Poche hydrophobe et sélectivité des protéines de la famille Bcl-2.....	49
Figure 17	Modèles de régulation de l'apoptose par les protéines de la famille Bcl-2.....	50
Figure 18	Modèle unifié des interactions entre protéines de la famille Bcl-2.....	53
Figure 19	Modèle d'activation de la protéine effectrice Bax	55
Figure 20	Mécanisme d'oligomérisation de Bax (et Bak) aux membranes.....	57
Figure 21	Localisation des protéines de la famille Bcl-2.....	64
Figure 22	Régulation de la translocation et rétro-translocation de Bax par Bcl-xL et sa forme tronquée Bcl-xL Δ C	72
Figure 23	Activité pro-apoptotique mitochondriale et cytosolique de p53, indépendante de la transcription	75
Figure 24	Mécanisme de dérégulation de la famille Bcl-2 dans les cancers	78
Figure 25	Le priming mitochondrial module la réponse aux signaux pro-apoptotiques	80
Figure 26	Interaction des BH3-mimétiques avec la poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques cibles	82
Figure 27	Rupture de l'interaction entre la protéine Rétinoblastoma et E2F par l'oncoprotéine virale E1A	86
Figure 28	Structure des E2Fs et interaction avec les protéines des familles pRB et DP	87
Figure 29	Représentation schématique de la structure de la protéine pRB.....	89
Figure 30	Mécanisme général du contrôle de l'activité transcriptionnelle des E2Fs.....	90
Figure 31	Des complexes coactivateurs et corépresseurs sont requis dans la régulation transcriptionnelle réalisée par des récepteurs nucléaires.....	91
Figure 32	Expression et activité des E2Fs au cours du cycle cellulaire.....	95
Figure 33	E2F1 régule les niveaux de protéine p53 et son activité.....	99
Figure 34	Représentation des différentes voies apoptotiques dépendante d'E2F1.....	102
Figure 35	Représentation schématique des différents mécanismes d'induction de l'apoptose par E2F1 et E2F1tr	106
Figure 36	Régulation des niveaux intracellulaires d'E2F1 et modifications post-traductionnelles associées.....	107
Figure 37	Influence de pRB sur l'activité d'E2F1 en réponse aux dommages à l'ADN.....	111
Figure 38	Régulation de l'apoptose dépendante d'E2F1 par ses co-activateurs et co-répresseurs	113
Figure 39	Régulation de la voie pRB/E2F1 par la famille Bcl-2.....	117
Figure 40	Fonctions transcriptionnelles et non transcriptionnelles d'E2F1 dans la réparation de l'ADN.....	119
Figure 41	Sous stress génotoxique E2F1 s'accumule et l'expression d'un set spécifique de gènes cibles est induit.....	126
Figure 42	Un stress génotoxique induit une apoptose E2F1 dépendante	127
Figure 43	Rôle duel d'E2F1 dû à la régulation de l'expression de gènes cibles pro-apoptotiques et associé à la progression du cycle cellulaire.....	128
Figure 44	La surexpression d'E2F1 est suffisante pour déclencher l'apoptose des cellules.....	130
Figure 45	L'expression d'E2F1 dans les cellules tumorales provoque le déclenchement d'une MOMP associée à l'apoptose	131
Figure 46	Validation de la déficience transcriptionnelle des mutants d'E2F1.....	133
Figure 47	Effet de la protéine E2F1 ou ses mutants transcriptionnellement inactifs sur la progression du cycle cellulaire	134
Figure 48	Indépendamment de ses fonctions transcriptionnelles E2F1 induit l'apoptose.....	136
Figure 49	E2F1 est localisé de façon constitutive aux mitochondries.....	139

Tables des Figures

Figure 50 Ciblage mitochondrial d'E2F1, associé à une perte d'activité transcriptionnelle	141
Figure 51 Effet de la protéine E2F1 ciblée aux mitochondries sur la progression du cycle cellulaire	142
Figure 52 E2F1 induit l'apoptose intrinsèque en agissant directement aux mitochondries indépendamment de ses fonctions transcriptionnelles	144
Figure 53 Rôle des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans l'apoptose induite par E2F1 et sa forme ciblée aux mitochondries	147
Figure 54 La présence d'E2F1 aux mitochondries varie sous stress génotoxique et sensibilise à l'apoptose subséquente	150
Figure 55 E2F1 mitochondrial promeut l'action des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.....	153
Figure 56 La voie autophagique n'est pas requise lors de la mort induite par E2F1 et sa forme ciblée directement aux mitochondries	157
Figure 57 Le blocage de la fragmentation mitochondriale n'affecte pas l'apoptose induite par E2F1 et sa forme ciblée aux mitochondries	158
Figure 58 Effet synergique de l'inhibition des protéines anti-apoptotiques avec un stress génotoxique ou les protéines pro-apoptotiques pour induire efficacement l'apoptose	160
Figure 59 E2F1 interagit avec certaines protéines anti-apoptotiques qui contrecarrent ses fonctions pro-apoptotiques	162
Figure 60 L'interaction E2F1 – Bcl-xL est présente dans différentes lignées tumorales et est validée par BRET et GST-Pull Down.....	164
Figure 61 Interaction E2F1 – Bcl-xL dans les lignées HCT116 p53 ^{-/-} et WT où Bcl-xL augmente le recrutement d'E2F1 aux mitochondries sans y être indispensable.....	167
Figure 62 La poche hydrophobe de Bcl-xL n'est pas requise pour son interaction avec la protéine E2F1	169
Figure 63 Bcl-xL inhibe l'apoptose médiée par E2F1 en utilisant ses fonctions canoniques et sa poche hydrophobe	171
Figure 64 L'interaction E2F1-Bcl-xL semble différente de celle entre p53 et Bcl-xL	173
Figure 65 La région N-Terminale d'E2F1 est impliquée dans son interaction avec Bcl-xL	175
Figure 66 La région N-terminale d'E2F1 comporte les domaines responsables de ses fonctions pro-apoptotiques non transcriptionnelles	177
Figure 67 Bcl-xL ralentit le transport nucléocytoplasmique d'E2F1.....	179
Figure 68 Bcl-xL ne modifie pas l'activité transcriptionnelle d'E2F1 en condition basale	181
Figure 69 Bcl-xL n'interfère pas avec l'expression des cibles d'E2F1 induites lors d'un stress génotoxique	182
Figure 70 E2F1 ralentit la mobilité des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1.....	185
Figure 71 La dynamique intracellulaire de Bcl-xL est altérée par E2F1 mitochondrial ou déficient transcriptionnellement	188
Figure 72 La mobilité et la localisation de Bcl-xL jouent un rôle clé dans son potentiel anti-apoptotique	190
Figure 73 Représentation schématique de la régulation de l'apoptose par E2F1	210

Liste des abréviations

<i>AIF</i> : Apoptosis Inducing Factor	<i>HP-1</i> : Heterochromatine Protein-1
<i>APAF-1</i> : Apoptotic Protease Factor 1	<i>HRK</i> : HaRaKiri
<i>APC/C</i> : Anaphase-Promoting Complex/cyclosome	<i>IMS</i> : InterMembraneSpace
<i>ATG</i> : Autophagy Related Protein	<i>Jab-1</i> : Jun Activation domain-Binding protein-1
<i>ATM</i> : Ataxia Telangiectasia Mutated	<i>KAP-1</i> : Krüppel-associated box (KRAB)-associated corepressor-1
<i>ATR</i> : ATM and Rad3 related	<i>kDa</i> : kilo Dalton
<i>BAD</i> : Bcl-2 Associated Death promoter	<i>LSD-1</i> : Lysine Demethylase-1
<i>BAK</i> : BCL2 Antagonist Killer-1	<i>LZ</i> : Leucine Zipper
<i>BAX</i> : BCL2 Associated X : apoptosis regulator	<i>MAC</i> : Mitochondrial Apoptosis-induced Channel
<i>BBC-3</i> : BCL2 Binding Component-3	<i>MAMs</i> : Mitochondria Associated Membrane
<i>Bcl-2 A1</i> : (BFL-1) Bcl-2 Related protein A1	<i>MAP1LC3</i> : Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3
<i>Bcl-2</i> : B Cell Lymphoma-2	<i>MB</i> : Marked Box
<i>Bcl-w</i> : Bcl-2 Like 2	<i>Mcl-1</i> : Myeloid Cell Leukemia-1
<i>Bcl-xL</i> : BCell Lymphoma extra Large	<i>MEC</i> : Matrice ExtraCellulaire
<i>BH</i> : Bcl-2 Homology	<i>MEF</i> : Mouse Embryonic Fibroblast
<i>BID</i> : BH3 Interacting domain Death agonist	<i>Mfn</i> : MitoFusiNes
<i>BIM</i> : Bcl-2 Interacting Mediator of cell death	<i>MIM</i> : Mitochondrial Inner Membrane
<i>BRCT</i> : BRCA1-Carboxy Terminal	<i>MiR</i> : Micro-RNA
<i>BRET</i> : Bioluminescence Resonance Energy Transfert	<i>MK2</i> : MAPKAP-kinase 2
<i>Caspases</i> : CysteinyL-ASPartate-cleaving protease	<i>MLKL</i> : Mixte Lineage Kinase Like
<i>CDK</i> : Cyclin Dependent Kinase	<i>MMPs</i> : Métalloprotéinases
<i>CDKi</i> : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor	<i>MMR</i> : MisMatch Repair
<i>CHK1/2</i> : CHeckpoint Kinase 1/2	<i>MOM</i> : Mitochondrial Outer Membrane
<i>CICD</i> : Caspase-Independent Cell Death	<i>MOMP</i> : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
<i>CycA</i> : Cyclin A binding site	<i>Mre11</i> : Meiotic Recombination 11
<i>DBD</i> : DNA Binding Domain	<i>MRN</i> : Mre11–Rad50–NBS1
<i>DD</i> : Death Domain	<i>MULE</i> : Mcl-1 Ubiquitin LigaseE
<i>DED</i> : Death Effector Domain	<i>Myc</i> : Myelocytomatosis oncogene
<i>DISC</i> : Death-Inducing Signaling Complex	<i>NBS1</i> : Nijmegen Breakage Syndrome 1
<i>DNMT</i> : DNa MethylTransferase	<i>NEDD8</i> : Neural precursor cell-Expressed Developmentally Downregulated 8
<i>Drp-1</i> : Dystrophin-related Protein 1	<i>NER</i> : Nucleotide Excision Repair
<i>DUSP</i> : Dual Specificity Phosphatase	<i>NES</i> : Nuclear Export Signal
<i>E1A</i> : Early Region 1A	<i>NLS</i> : Nuclear Localization Signal
<i>E2F</i> : E2 Factor	<i>4-OHT</i> : 4-hydroxytamoxifen
<i>EGF-R</i> : Epidermal Growth Factor Receptor	<i>OPA-1</i> : Optic Nerve Atrophy-1
<i>EMT</i> : Transition Epithélio-Mésenchymateuse	<i>OTC</i> : Ornithin Transcarbamyase
<i>Endo-G</i> : Endonucléase-G	<i>PCAF</i> : p300/CBP-Associated Factor
<i>EPC1</i> : Enhancer of Polcmob Homolog 1	<i>PcG</i> : Polycomb Group
<i>eYFP</i> : enhanced Yellow Fluorescent Protein	<i>PI3K</i> : PhosphoInositide-3-Kinase
<i>EZH2</i> : Enhancer of Zeste Homolog 2	<i>PiC</i> : Phosphate Carrier
<i>FGF</i> : Fibroblast Growth Factor	<i>PIG</i> : P53-Induced Gene
<i>FKBP38</i> : Mitochondrial FK506-Binding Protein-38	<i>PMAIP-1</i> : Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein-1
<i>FLIP</i> : Fluorescence Loss After Photobleaching	<i>PMAIP-1</i> : Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein-1
<i>FRAP</i> : Fluorescence Recovery After Photobleaching	<i>PP2A</i> : Protein Phosphatase 2A
<i>Gab-2</i> : Grb-2 Associated Binding-2	<i>PRMT5</i> : protein arginine methyltransferase 5
<i>GAPDH</i> : GlycerAldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	<i>PS</i> : PhosphatidylSérines
<i>GCN5</i> : General Control of amino acid synthesis 5	<i>PTP</i> : Permeability Transition Pore
<i>GFP</i> : Green Fluorescent Protein	
<i>HAT</i> : Histone AcetylTransferase	
<i>HCF-1</i> : Host Cell Factor-1	
<i>HDAC</i> : Histone DeACetylase	

Liste des abréviations

PUMA : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RAD50 : RADiation 50
Ras : Rat Sarcoma
RB : RetinoBlastoma
RE : Réticulum Endoplasmique
RHIM : RIP Homology Interaction Motifs
RIP-1 : Receptor Interacting Protein 1
RIPK : Receptor Interacting Protein Kinase
RLuc : Renilla Luciferase
ROS : Reactive Oxygen Species
S1P : Sphingosine-1-Phosphate
SETD7 : SET Domain Containing 7
Smac : Second Mitochondria-derived Activator of Caspase
SWI/SNF : SWItch/Sucrose NonFermentable

TBP : TATA box Binding Protein
TCR : T Cell Receptor
Tip60 : Tat-Interacting Protein 60
TLR : Toll Like Receptor
TMD : Transmembrane Domain
TNF- α : Tumor Necrosis Factor
TopBP1 : TOPoisomerase II Binding Protein 1
TP73 : Tumor Protein p73
TRADD : TNFR-Associated Death Domain protein
TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
tRNA : ARN de transfert
TSP-1 : ThrompoSPondine-1
VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis

Introduction

A. Le cancer, avant tout une pathologie génétique

Le cancer est une pathologie qui traverse le temps. En effet, les premières descriptions de la maladie remontent à des écrits du médecin Hippocrate (460-370 av. J.-C.). Il y décrit des grosseurs qui deviennent progressivement fatales avec les termes grecs « carcinos » et « carcinoma », d'où provient le terme actuel de cancer ou carcinome. Au fil des époques professeurs, médecins et chercheurs ont tenté d'élucider l'origine de la pathologie. Dans les années 1970, le cancer fut considéré comme une maladie contagieuse ce qui valut la construction d'un hôpital exclusivement dédié aux personnes atteintes d'un cancer (Raven, 1990). A la même époque bon nombre de chercheurs se lancent dans la « guerre contre le cancer ». Diverses observations indiquèrent que la maladie n'était pas contagieuse contrairement à l'hypothèse initialement émise. En revanche, la théorie que le cancer était une pathologie due à certains gènes donnés fut grandement explorée et conduisit à l'identification de mutations géniques somatiques, pouvant survenir suite à des infections rétrovirales ou à l'exposition à certaines substances chimiques présentant des propriétés carcinogènes (Weinberg, 2014).

I. Altérations génétiques à l'origine des cancers

Bien que des infections virales soient associées à la pathogénèse de certains cancers comme le lymphome de Burkitt, le carcinome naso-pharyngien ou certains hépatomes, il n'a pu être établi qu'ils en soient l'unique cause initiatrice. En effet bon nombre de cancers développés dans les années 1970 ne présentaient aucune trace de virus, c'est pourquoi l'hypothèse d'un virus cancéreux a été abandonnée et a laissé place à l'éventualité que des gènes cellulaires endommagés pouvaient être responsables de l'apparition de cellules cancéreuses.

1. Les oncogènes

Le terme d'oncogène est apparu suite à la découverte du proto-oncogène Src par les scientifiques Bishop J.M et Varmus H. Ce gène provenant du virus de Sarcome de Rous (RSV), une fois intégré dans des cellules normales, provoque leur transformation tumorale (Stehelin et al., 1976). Suite à ces travaux, un répertoire croissant d'oncogènes a été mis en évidence par ce même groupe et d'autres chercheurs (Bishop, 1983). Chaque proto-oncogène ainsi identifié, a été nommé d'après le rétrovirus dont il était issu. Par exemple, Myc est l'homologue de l'oncogène viral : v-Myc, issu du virus de la myelocytomatose aviaire, alors que Ras est l'homologue de l'oncogène

viral : v-Ras, issu du virus du sarcome de rat (RSV). Néanmoins l'existence de ces proto-oncogènes ne permet pas d'expliquer l'origine du cancer car certains de ces rétrovirus comme le RSV ne sont pas en mesure d'infecter les cellules humaines. Des travaux de Weinberg R.A. ont indiqué la capacité de certaines substances chimiques à induire des mutations géniques associées à la mise en place d'un processus de carcinogénèse (Shih et al., 1979). C'est au début des années 1980 que des altérations génétiques ont été mises en avant. Ainsi l'oncogène Ras présente une mutation ponctuelle dans la séquence d'ADN, l'oncogène ABL est créée suite à une translocation chromosomique et l'oncogène Myc présente une amplification génique dans de nombreux cancers, mais la liste des gènes ainsi mutés est en réalité bien plus imposante (Weinberg, 1994). Une définition simple du terme oncogène a été donnée par Bishop afin de discriminer parmi ces gènes mutés, ceux qui sont impliqués dans l'initiation de la tumorigénèse de ceux qui ne le sont pas. Un oncogène correspond à un gène cellulaire : proto-oncogène, qui une fois altéré va induire l'acquisition d'un phénotype tumoral ; ainsi son introduction dans des cellules saines induit leur transformation tumorale (Bishop, 1985). Ces gènes sont généralement associés aux voies de signalisation proliférative. Tandis que le proto-oncogène va induire la division cellulaire en réponse à un stimulus mitogénique, sa version oncogénique va faire de même mais sans avoir recours à un quelconque stimulus.

2. Les gènes suppresseurs de tumeur

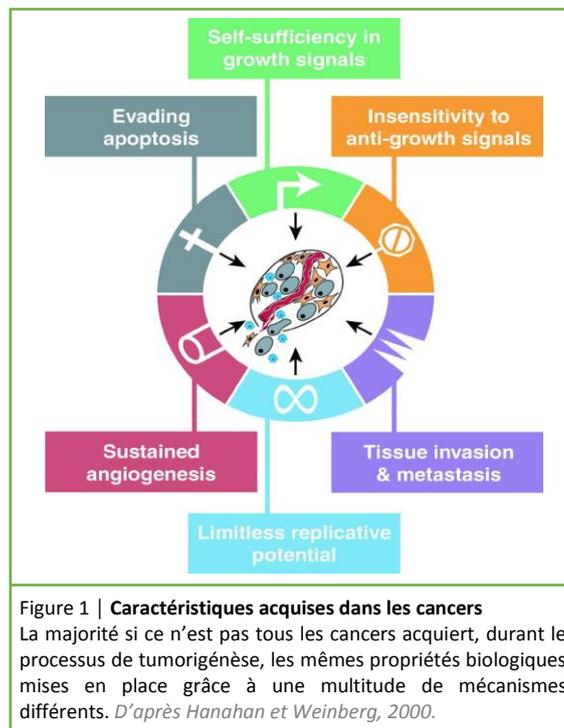
Outre la découverte d'oncogènes capables d'induire la transformation de cellules saines en cellules cancéreuses, la notion de gènes suppresseurs de tumeur fit son apparition dans le milieu des années 1980. La prolifération des cellules est un événement finement régulé. Ainsi l'hypothèse que l'hyperactivité d'un oncogène soit contrecarrée par un gène suppresseur de tumeur prit tout son sens. La croissance incontrôlée des cellules tumorales peut donc résulter de l'apparition d'oncogènes comme de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Vogelstein B. et Hopkins J. furent les premiers scientifiques à présenter le processus de carcinogénèse comme un modèle à multiples étapes où des mutations au niveau d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur s'accumulent au fur et à mesure de la progression tumorale (Fearon et Vogelstein, 1990). Dans la plupart des tumeurs humaines ces deux événements surviennent conjointement. Cela permet une activation anormale de la prolifération cellulaire par les oncogènes, associée à une levée de l'inhibition, initialement effectuée par les gènes suppresseurs de tumeur, ici inactivés. L'un des premiers gènes suppresseurs de tumeur à avoir été identifié est le gène retinoblastoma (RB), qui

tient son appellation de la tumeur oculaire infantile rare dans laquelle il a été découvert. L'absence des deux copies du gène dans les cellules provoque leur prolifération anarchique (Weinberg, 1991). Knudson A.G. fut l'un des premiers à émettre le concept d'une prédisposition génétique au développement de certains cancers. En effet ces travaux (Knudson, 1971) et ceux de (Yunis et Ramsay, 1978) mentionnèrent l'existence de mutations germinales du gène RB transmises héréditairement. Leur présence prédispose au développement du rétinoblastome chez les enfants car une simple mutation somatique supplémentaire suffit à inactiver le gène RB suppresseur de tumeur. D'autres gènes suppresseurs de tumeur ont été par la suite identifiés et souvent associés à une transmission héréditaire d'une copie inactive prédisposant à diverses pathologies. Par exemple, une version mutée du gène WT1 prédispose aux tumeurs de Wilms, le gène APC muté sur un allèle prédispose au développement de polypose colorectale familiale (Weinberg, 1994). Un mécanisme distinct fut découvert dans le cas du gène suppresseur de tumeur TP53 où une seule copie altérée conduit à la présence d'une protéine mutée de p53 exerçant une action de dominant négatif sur la protéine sauvage au sein des cellules (Oren, 1985). Une vaste majorité des tumeurs humaines présentent des mutations du gène TP53 indiquant l'importance de ce gène dans le contrôle de la tumorigénèse. Le terme de gène suppresseur de tumeur a alors été défini comme un élément génétique dont la perte ou l'inactivation permet aux cellules une croissance dérégulée (Weinberg, 1991).

II. Acquisition d'un phénotype tumoral suite à l'accumulation de mutations géniques

La découverte croissante d'oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur a permis une avancée majeure dans la compréhension des événements initiateurs et promoteurs du cancer. Néanmoins cela a également mis en avant la complexité de la tumorigénèse. En effet, selon les types de tumeurs et même au sein d'un même type donné, les gènes mutés impliqués sont très variables. La succession de changement génétique est loin d'être uniforme et ne suit aucun ordre chronologique prédictible. Hanahan et Weinberg ont alors établi des caractéristiques communes aux cellules tumorales, quel que soit les types de tumeurs et les gènes mutés présents (Hanahan et Weinberg, 2000). Pour cela ils se sont davantage intéressés aux conséquences de la dérégulation des voies de signalisation afin d'étudier le phénotype acquit par les cellules tumorales. Dans un premier temps ce sont six grandes caractéristiques qui émergent, à savoir : une signalisation proliférative soutenue, l'échappement aux facteurs anti-prolifératifs, la résistance à la mort

cellulaire, l'induction de l'angiogénèse, l'activation d'un processus d'invasion et de formation de métastases et l'immortalité réplivative.



1. Signalisation proliférative soutenue

Les cellules tumorales ont développé différentes stratégies leur permettant de maintenir en continu une voie de signalisation proliférative active. Entre autres, il a été identifié un mécanisme de stimulation mitogénique autocrine où les cellules tumorales sécrètent d'elles-mêmes les facteurs de croissance dont elles ont besoin pour proliférer de façon anarchique. Une expression accrue des récepteurs de facteurs de croissance rend les cellules tumorales hautement répondeuses aux ligands de ces récepteurs comme la surexpression du récepteur Her2/Neu dans les carcinomes mammaires. Par ailleurs une activation constitutive d'éléments de la voie de signalisation en aval des récepteurs aux facteurs de croissance assure le maintien de la prolifération cellulaire même en absence de stimuli mitogéniques (Fedi et al., 1997). Une inactivation des boucles de rétro-contrôle négatives activées en temps normal conjointement à certaines voies de signalisation données peut se produire dans les tumeurs. C'est notamment le cas de la voie de signalisation Ras où la mutation oncogénique altère ses fonctions de GTPase requise pour le rétro-contrôle de la voie (Amit et al., 2007). En outre, une contribution des cellules avoisinantes peut fournir les signaux prolifératifs requis pour la croissance des cellules tumorales (Bussard et al., 2016).

2. Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs

La prolifération cellulaire est régulée par le biais de différentes voies de signalisation dont les principales sont celles impliquant les protéines pRb ou p53, or il se trouve que ces deux gènes suppresseurs de tumeurs sont fréquemment altérés dans les tumeurs, supprimant leurs actions dans le contrôle de la prolifération (Zhu et al., 2015). pRb inhibe la progression du cycle cellulaire, en restreignant l'activité des facteurs de transcription E2Fs en absence des signaux prolifératifs adéquats. La protéine p53 agit comme senseur d'une variété de stress qui iraient à l'encontre d'une prolifération cellulaire en de bonnes conditions tel que la présence de dommages à l'ADN ou des niveaux trop faibles de nucléotides, facteurs de croissance ou glucose (Sherr et McCormick, 2002). Selon les stress détectés, p53 agira en conséquence en induisant l'arrêt du cycle cellulaire ou la mort des cellules. Par ailleurs, le facteur sécrété TGF- β , puissant transducteur de signaux anti-prolifératifs, est détourné par les cellules tumorales pour promouvoir la progression et l'agressivité du cancer (Bierie et Moses, 2006).

3. Résistance à la mort cellulaire

En plus de voies de signalisation prolifératives dérégulées, les cellules tumorales présentent souvent des altérations dans les voies de réponse à des stress cellulaires. Le phénomène de mort cellulaire constitue une barrière naturelle au développement des tumeurs. Différentes voies de mort cellulaire peuvent être déclenchées selon le stimulus extracellulaire ou intracellulaire détecté. Les plus connues correspondent à l'apoptose, l'autophagie et la nécrose (Green et Llamby, 2015). Toutes trois se retrouvent fréquemment inactives ou détournées à des fins antagonistes par les cellules tumorales. La perte de fonction du gène suppresseur de tumeur TP53, l'augmentation de l'expression de régulateurs anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL), de signaux de survie (Igf1/2) ou la diminution de l'expression de facteurs pro-apoptotiques (Bax, Bim, Puma) sont autant de mécanismes mis en place dans les cellules tumorales pour échapper à une réponse apoptotique (Lowe et al., 2004). Par ailleurs, l'autophagie présente des effets conflictuels dans la progression tumorale (Levine, 2007). Les voies de signalisation Bcl-2 comme pRB-E2Fs, toutes deux amenées à être dérégulées dans les cancers, effectuent une régulation de l'activité autophagique dans les cellules (Booth et al., 2014; Jiang et al., 2010). La nécrose permet le recrutement de cellules inflammatoires du système immunitaire, cependant son action profite au développement tumoral car elle contribue à la libération de facteurs pro-prolifératifs (tels que l'IL1- α) par les cellules nécrotiques (Hanahan et Weinberg, 2011).

4. Immortalité réplivative

La formation de tumeur visible d'un point de vue macroscopique implique l'acquisition d'un potentiel réplivatif illimité par les cellules tumorales. Chaque cellule présente un nombre de division bien défini et limité, phénomène identifié en 1961 par Hayflick. L., d'où son appellation : « la limite de Hayflick ». A l'extrémité des chromosomes se trouvent une succession d'hexanucléotides en tandem : les séquences télomériques dont le but est de protéger les chromosomes. Leur quantité dicte le nombre de divisions que la cellule pourra effectuer, car à chacun des cycles cellulaires réalisés des répétitions sont perdues. Lorsque les télomères sont érodés, les cellules entrent en sénescence, un état de viabilité irréversible non prolifératif, ou en « état de crise » qui conduit dans ce cas à la mort cellulaire. Dans une grande majorité des tumeurs, les cellules cancéreuses, *a contrario* des cellules saines, expriment des niveaux importants de télomérase dont la fonction est justement d'ajouter des segments de télomères à l'extrémité des chromosomes. Cela conduit à un processus d'immortalisation spontané qui outrepatte les deux barrières anti-cancéreuses que sont la sénescence ou l'état de crise (O'Sullivan et Karlseder, 2010). La limite de Hayflick peut être outrepatte grâce à l'inactivation des voies p53 et pRB. En effet, parmi les facteurs de transcription E2Fs, dont l'activité est régulée négativement par pRb, certains, comme E2F1, peuvent induire l'expression de la télomérase (Alonso et al., 2006).

5. Induction de l'angiogénèse

Les cellules tumorales, bien qu'elles présentent une capacité à proliférer de façon anarchique, illimitée et soient résistantes à la mort cellulaire, restent cependant dépendantes d'un apport en nutriments et oxygène et nécessitent une voie d'élimination des déchets métaboliques ou du dioxyde de carbone. De ce fait, la tumeur requiert une vascularisation. Dans l'organisme, les vaisseaux se trouvent majoritairement quiescents et le processus d'angiogénèse n'est déclenché que dans des situations bien précises comme pour la cicatrisation de plaies (Hanahan et Weinberg, 2011). Les cellules tumorales par le biais d'une altération de leur programme transcriptionnel acquièrent la capacité d'induire un « switch angiogénique » qui sort les cellules endothéliales de leur état de quiescence. En effet, une expression élevée de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ou le FGF (*Fibroblast Growth Factor*) ou une diminution des facteurs anti-angiogéniques tels que la thrombospondine-1 (TSP-1) sont détectées dans les cellules tumorales (Carmeliet et Jain, 2011). Les oncogènes comme Ras ou Myc, peuvent induire directement l'expression de facteurs pro-angiogéniques. La voie pRB-E2Fs régule l'expression de

plusieurs facteurs pro et anti-angiogéniques (Gabellini et al., 2006). L'expression du facteur TSP-1, quant à elle, est régulée entre autres par p53. De fait une grande partie des tumeurs, présentant des dysfonctions dans la voie p53, s'est affranchie de ce contrôle anti-angiogénique (Hanahan et Folkman, 1996). Par ailleurs, les cellules péri-tumorales inflammatoires peuvent contribuer au déclenchement du « switch angiogénique ». Les signaux ainsi émis par les cellules tumorales ou avoisinantes, promeuvent une étape de néo-angiogénèse, permettant une prolifération tumorale accrue et donnant un moyen aux cellules tumorales de coloniser d'autres sites dans l'organisme. Cela constitue la sixième caractéristique présentée par les cellules cancéreuses, décrite ci-dessous.

6. Capacité invasive et formation de métastases

Lorsqu'un cancer atteint un stade de progression métastatique, le pronostic de survie du patient est fortement diminué. Aux stades les plus avancés de la tumorigénèse, les cellules cancéreuses sont parvenues à former d'autres tumeurs à distance du site tumoral primaire. Ce pouvoir invasif et métastatique s'acquiert ici aussi du fait d'une déviation du programme transcriptionnel dans les cellules tumorales. Brièvement, ce processus consiste en une succession d'étapes présentées **Figure 2** (Reymond et al., 2013).

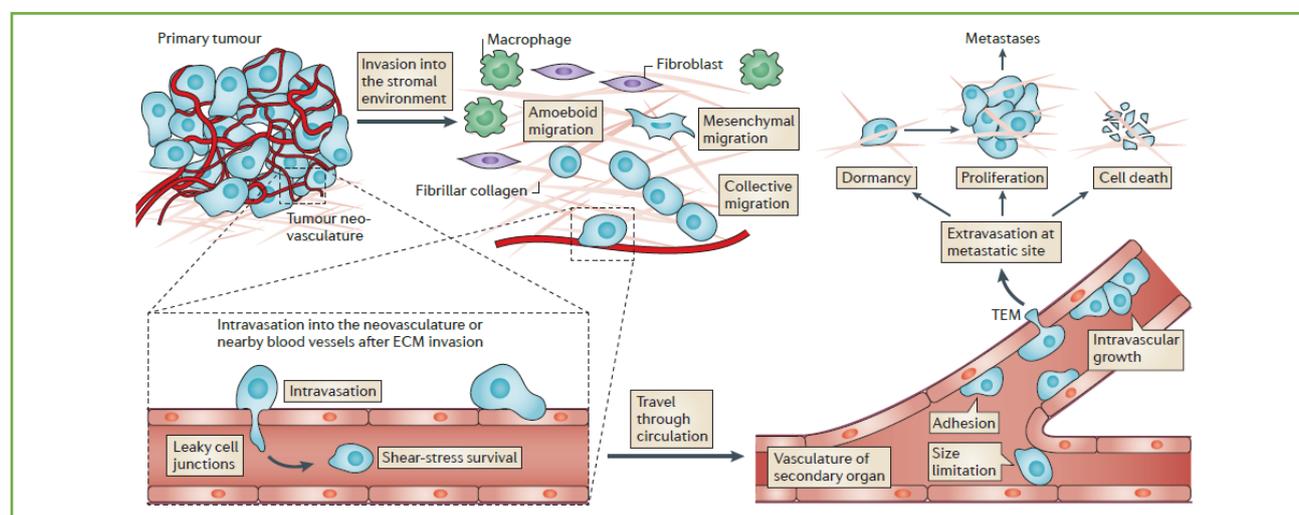


Figure 2 | **Processus de dissémination métastatique des cellules cancéreuses**

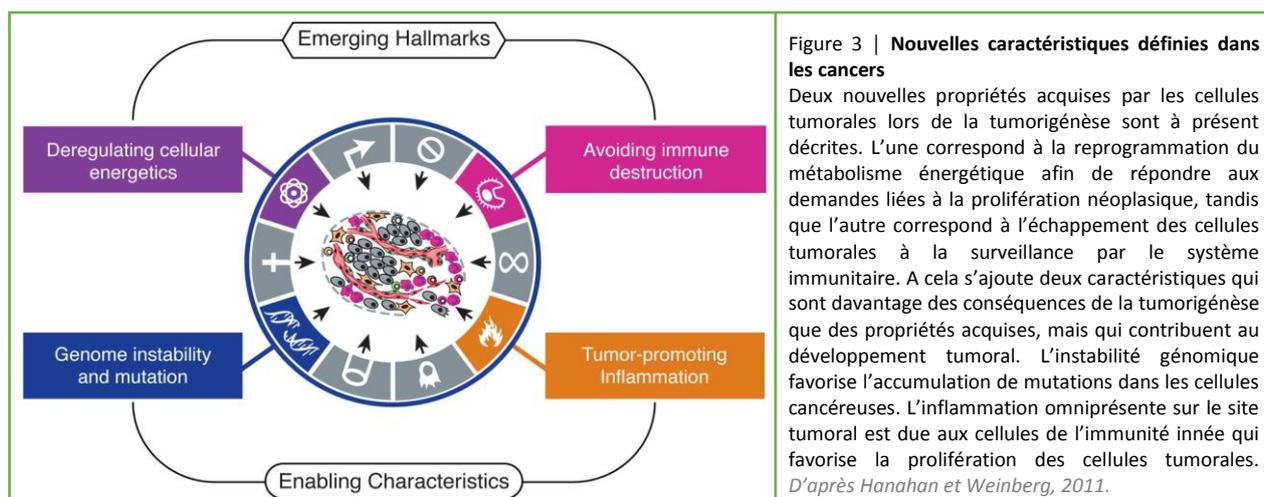
Une faible proportion des cellules tumorales acquiert des propriétés invasives et migratoires. Ces cellules quittent le site tumoral primaire pour envahir les tissus avoisinants puis se dirigent vers les vaisseaux sanguins à proximité. Le processus d'intravasation représente l'entrée des cellules dans les vaisseaux qui implique leur passage entre les jonctions des cellules endothéliales. Elles sont alors libres de circuler dans l'organisme. Les cellules tumorales finissent par quitter la circulation par extravasation, processus impliquant une migration transendothéliale (TEM: Transendothelial Migration). Elles envahissent alors la membrane basale juxtaposée aux vaisseaux et colonisent ainsi un nouveau site. Au niveau de ce site tumoral secondaire, les cellules peuvent entrer en dormance ou proliférer, créant des micrométastases qui évolueront en macrométastases. Une autre partie des cellules n'en sera pas capable et engagera un programme de mort cellulaire. *D'après Reymond et al., 2013.*

Il y a dans un premier temps une perte d'attachement entre les cellules permettant une invasion locale, ce qui est souvent due à une perte d'expression de la E-Cadhérine : molécule

d'adhésion entre les cellules. S'en suit une dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), permettant l'accès aux vaisseaux se trouvant à proximité de la tumeur. Dans ce cas, il y a fréquemment une surexpression d'enzymes de dégradation de la MEC telles que les métalloprotéinases (MMPs) par les cellules tumorales. Celles-ci effectuent ensuite une migration trans-endothéliale pour entrer dans les vaisseaux (intravasation) puis en sortir (extravasation). Lors de ce phénomène une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) s'effectue, responsable entre autres de la perte de jonctions adhérentes, de changement morphologique et d'une résistance accrue à l'apoptose (Hanahan et Weinberg, 2011). Une fois cette étape passée, il pourra y avoir formation de micro-métastases. Comme pour le site primaire, une vascularisation est nécessaire pour obtenir des tumeurs métastatiques macroscopiques. La voie pRB-E2Fs intervient également dans le contrôle de l'expression de la E-Cadhérine, de MMPs et de protéines ZEB impliquées dans l'EMT (Schaal et al., 2014). Par ailleurs, le membre anti-apoptotique Bcl-xL de la famille Bcl-2 favorise la formation de métastases en agissant directement au noyau sur l'expression du TGF- β , facteur favorisant notamment l'EMT (Choi et al., 2016).

7. Caractéristiques tumorales supplémentaires

Outre ces six grandes caractéristiques partagées par les cellules tumorales, toutes issues d'altérations génétiques, Hanahan et Weinberg complétèrent leur modèle avec quatre nouveaux points retrouvés dans les tumeurs (**Figure 3**) (Hanahan et Weinberg, 2011).



Premièrement, l'instabilité génomique. En effet, elle est présente dans les cellules tumorales ce qui explique l'accumulation successive de mutations au cours de la tumorigénèse. Cela est dû à un dysfonctionnement des systèmes de surveillance et maintenance de l'intégrité du génome dont

fait partie la protéine p53, nommée comme la « gardienne du génome ». Deuxièmement, la tumeur est un site inflammatoire où un recrutement important de cellules du système immunitaire est réalisé directement par les cellules tumorales. L'inflammation participe grandement à la progression tumorale sur différents aspects. Elle constitue une source de molécules bio-actives dans le micro-environnement tumoral avec notamment des facteurs de croissance, des facteurs pro-survie, des facteurs pro-angiogéniques, des protéines de dégradation de la MEC. Enfin, en plus de promouvoir prolifération, résistance à la mort, angiogénèse et invasion, les cellules contribuant à l'inflammation fournissent des signaux inducteurs de la transition épithélio-mésenchymateuse augmentant le pouvoir métastatique des cellules tumorales. Troisièmement, un phénomène de reprogrammation du métabolisme a lieu dans les cellules tumorales : l'effet Warburg, qui tient son nom du chercheur qui l'a mis en évidence. Le métabolisme énergétique se retrouve dans ce cas limité à la voie de la glycolyse. Cela semble permettre une meilleure biosynthèse des macromolécules et organelles requis pour la division cellulaire. Une fois de plus, un lien a été mis en évidence entre les oncogènes Ras, Myc, ou la perte du suppresseur de tumeur p53 et le déclenchement de ce « switch métabolique ». Il en est de même avec la voie pRB-E2Fs où le facteur de transcription E2F1, en absence de répression par pRB, module la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme glycolytique tels que Cox5a, Cpt-1, Ucp1/2, Tfma, etc (Blanchet et al., 2011). Enfin, la dernière caractéristique décrite par Hanahan et Weinberg consiste dans la capacité qu'ont acquise les cellules tumorales à échapper au système immunitaire.

Le cancer est donc une pathologie issue de multiples altérations génétiques, comme épigénétiques, qui conduit à la dérégulation de plusieurs voies de signalisation données. Au vu de la complexité des voies touchées, resituer les conséquences de leurs dérégulations en termes de fonctions biologiques s'est avéré indispensable, ce que les chercheurs Hanahan et Weinberg ont brillamment effectué. Ainsi prolifération incontrôlée et illimitée, résistance aux signaux de mort et colonisation de sites secondaires sont les maîtres mots pour définir les cellules tumorales. La constatation peut être faite, qu'une seule voie dérégulée peut suffire à permettre l'acquisition de plusieurs des caractéristiques mentionnées ci-dessus par les cellules tumorales. C'est notamment, le cas des voies Ras, Bcl-2, p53 ou encore pRb-E2Fs. Dans l'étude qui vous est présentée ici, un intérêt tout particulier a été accordé aux voies de signalisation pRb-E2Fs et Bcl-2. Comme ces deux voies interviennent dans différentes fonctions biologiques, je me suis principalement restreinte à leur rôle dans la mort cellulaire apoptotique.

B. La mort cellulaire : nombreuses sont les voies qui y mènent

Il n'existe pas un seul et unique mécanisme responsable de la mort cellulaire. En effet, différentes voies de signalisation mènent à la mort cellulaire et leur activation dépend en règle générale du stimulus initial. Ainsi selon le mécanisme de déclenchement orchestré, la mort cellulaire prendra des aspects divers. En 1973, Schweichel et Merker proposèrent une première classification sur la base de critères morphogéniques afin de discriminer les différentes morts cellulaires les unes des autres. Trois grands types de mort ont alors été présentés. Le type I correspond à l'apoptose et fut associé à l'hétérophagie. Le type II, quant à lui, correspond à la mort cellulaire autophagique et a été associé à l'autophagie. Enfin le type III n'est autre que la mort nécrotique et n'a pu être associé à aucun phénomène de digestion (Schweichel et Merker, 1973).

De par les acteurs intervenant dans le contrôle de la mort cellulaire apoptotique, dont une partie se situe au cœur de mon étude, je m'attarderai sur les mécanismes mis en jeu lors d'une réponse apoptotique. Je ne mentionnerai que brièvement les deux autres types de mort, et je m'intéresserai davantage aux relations entre ces différentes voies de mort cellulaire.

I. Morts cellulaires apoptotiques

L'apoptose correspond à une mort cellulaire programmée, tolérogène et physiologique. De par ces attributs elle s'oppose à la nécrose qui présente les caractéristiques inverses, à savoir qu'elle se déclenche de manière accidentelle, est immunogène et survient principalement dans un contexte pathologique. Ainsi l'apoptose, bien qu'étant un phénomène destructeur, participe au développement de l'organisme et contribue au maintien de son bon fonctionnement. C'est pourquoi ce processus est tout à fait physiologique. Au cours du développement embryonnaire, l'apoptose intervient dans l'élimination de cellules superflues telles que les cellules interdigitales lors de la formation des membres. Un processus de mort cellulaire apoptotique survient également pour éliminer l'excès de neurones ou de spermatozoïdes. Par ailleurs, la formation des canaux au niveau des glandes mammaires fait intervenir cette mort cellulaire. Enfin l'apoptose joue un rôle essentiel dans la création d'un répertoire de lymphocytes T. En effet, lors de l'éducation thymique il existe une étape dite de sélection négative, visant à éliminer les cellules immunes aptes à reconnaître des antigènes du soi, qui s'avèreraient dans ce cas extrêmement dangereuses pour l'organisme. En dehors de la période de développement, l'apoptose permet le maintien de

l'homéostasie cellulaire et est particulièrement suscitée au niveau des tissus présentant un fort taux de renouvellement cellulaire comme c'est le cas du tissu hématopoïétique ou de l'épithélium intestinal (Czabotar et al., 2014).

L'apoptose est donc un événement primordial pour maintenir l'organisme en bonne santé. Il n'est donc pas étonnant que des dysfonctions engendrent diverses pathologies. Un excès ou un défaut d'apoptose peut conduire à des maladies neurodégénératives, lésionnelles ou des pathologies auto-immunes dans le premier cas et cancéreuses dans le second (Tait et al., 2014).

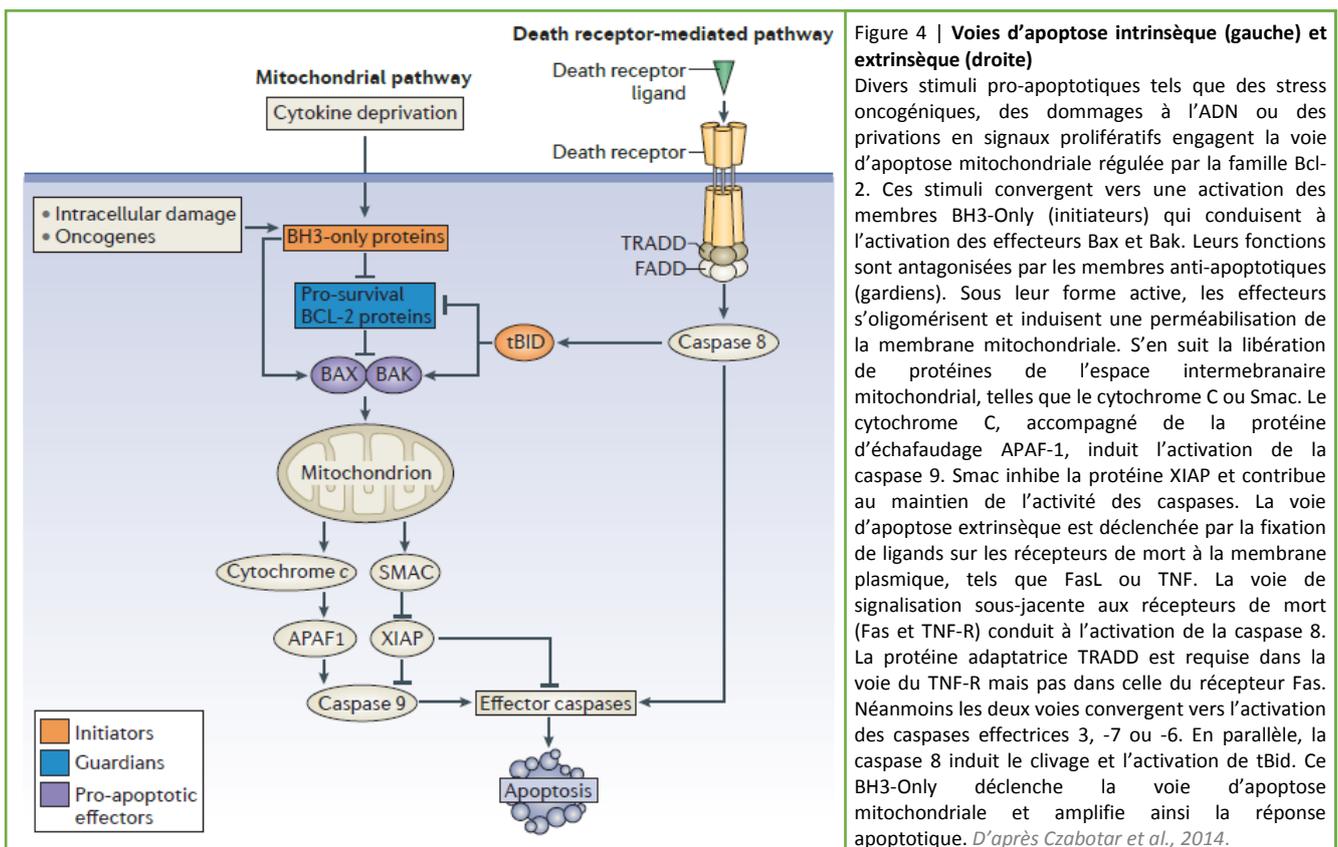
1. Caractéristiques morphologiques

Une succession de changements morphogéniques se produit dans une cellule en apoptose. Typiquement, il y a une condensation de la chromatine qui sera suivie d'une fragmentation de l'ADN. Les cellules apoptotiques présentent donc des noyaux dits pycnotiques. Une contraction des compartiments nucléaires et cytoplasmiques se produit également, associée au bourgeonnement de la membrane plasmique, propre aux phénomènes d'apoptose. L'étape finale se traduit par la formation de corps apoptotiques où des fractions de membrane plasmique emprisonnent le contenu cellulaire. C'est grâce à ce processus que l'apoptose n'est pas immunogène. Bien que la membrane plasmique préserve son intégrité durant ce processus, une exposition des phosphatidylsérines (PS) de la face interne à la face externe de la membrane s'effectue. Cela constitue un signal « eat me » destiné aux cellules phagocytaires avoisinantes. Ainsi les corps apoptotiques seront rapidement éliminés par ces cellules où ils seront soumis à une digestion lysosomale (Czabotar et al., 2014). Cet événement de transfert des phospholipides : PS permet une détection relativement précoce du déclenchement d'une réponse apoptotique.

2. Stimuli pro-apoptotiques

Il existe différents stimuli capables de déclencher une réponse apoptotique. Selon le stress perçu par la cellule, la voie de signalisation orchestrée en aval diffèrera (**Figure 4**). La fixation de ligands au niveau des récepteurs de mort présents à la surface de la membrane plasmique des cellules engendre une réponse apoptotique dite « extrinsèque ». Dans ce cas le signal de mort provient de l'environnement extracellulaire et est généralement émis par des cellules immunitaires. Par exemple la voie d'apoptose extrinsèque survient lorsque des lymphocytes T cytotoxiques sont en charge d'éliminer des cellules infectées ou transformées. Cette voie de déclenchement de l'apoptose s'oppose à la voie dite « mitochondriale » ou « intrinsèque » qui est initiée de façon

autonome par les cellules. Elle se produit lorsque ces dernières détectent la présence de dommages irréremédiables dus à un stress intracellulaire, tels que des dommages à l'ADN, un stress du réticulum endoplasmique (RE) ou une stimulation mitogénique aberrante par des oncogènes. Les cellules peuvent également engager une réponse apoptotique intrinsèque dans le cas d'une privation en facteur de croissance. Enfin l'anoikis constitue un autre exemple d'induction de l'apoptose intrinsèque. Ce terme issu du grec signifie « être sans-abri ». Il a été introduit par Frisch et Francis en 1994 et désigne le déclenchement d'une réponse apoptotique de cellules adhérentes ayant perdu les contacts cellules – matrice extracellulaire. La survie des cellules adhérentes non transformées dépend de signaux pro-survie transduits par les récepteurs de la MEC : intégrines ou aux facteurs de croissance : EGF-R (*Epidermal Growth Factor Receptor*). En absence de contact avec la MEC, ces récepteurs n'émettent plus ces signaux et les cellules répondent à ce manque par la mort cellulaire (Green et Llambi, 2015).

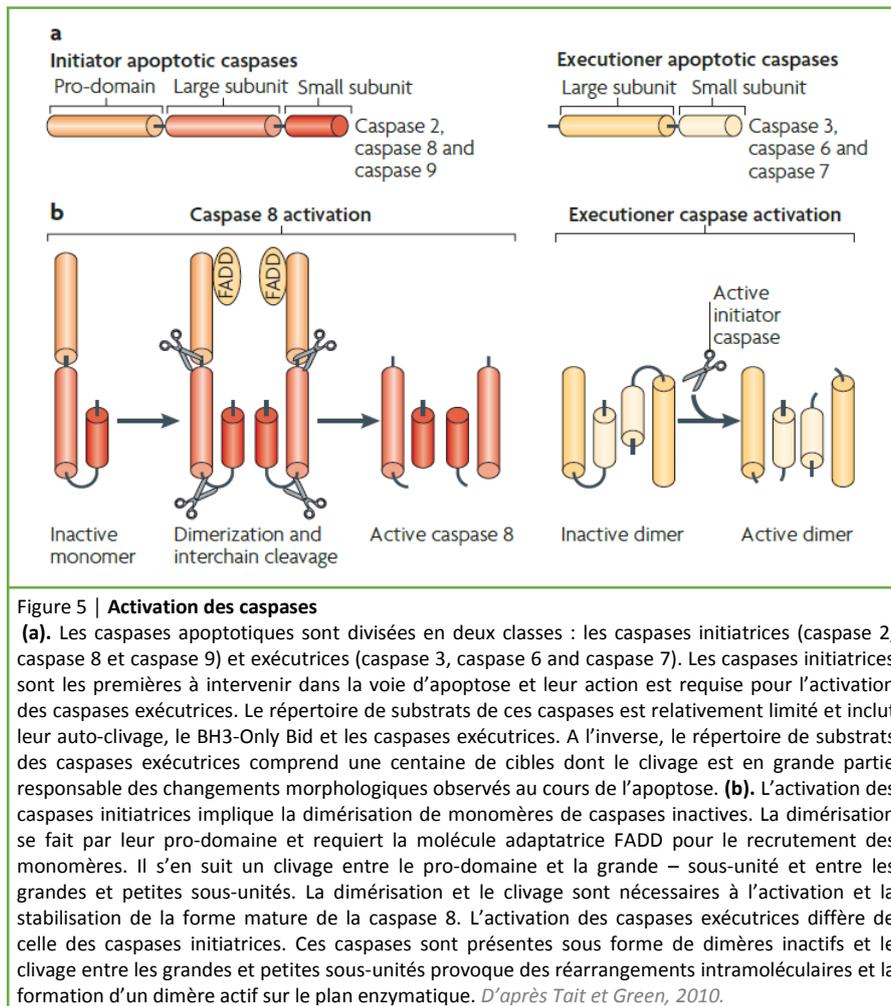


3. Apoptose extrinsèque

L'apoptose extrinsèque est initiée par la liaison de ligands létaux aux récepteurs de mort correspondants exprimés au niveau de la membrane plasmique des cellules (**Figure 4**). Les molécules TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*), FASL/CD95L ou encore TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) sont les ligands des récepteurs de la superfamille TNFR comprenant TNF-R1, Fas ou TRAIL-R. Leurs interactions s'effectuent au niveau du domaine extracellulaire des récepteurs. Au niveau de leur région intracellulaire, les récepteurs ainsi fixés par leurs ligands vont recruter par leur domaine DD (*Death Domain*) divers partenaires aboutissant à la formation d'imposant complexe macromoléculaire. Dans le cas des récepteurs Fas et TRAIL-R, la molécule adaptatrice FADD interagit via son propre domaine de mort DD avec celui des récepteurs, ce qui démasque son domaine DED (*Death Effector Domain*). La forme inactive de la caspase 8 va alors s'y fixer par le biais du DED se trouvant dans son pro-domaine. Le complexe ainsi formé se nomme DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*). Le rapprochement de monomères de caspase 8 déclenche son activité protéase et permet son clivage auto-catalytique entre ses grandes et petites sous-unités, ce qui stabilise un dimère actif et entre son pro-domaine et ses grandes sous-unités ce qui la libère du DISC (**Figure 5**). La voie de signalisation du TNF-R1 s'avère plus complexe. L'interaction au TNF- α , induit le recrutement par le récepteur d'une protéine adaptatrice TRADD (*TNFR-Associated Death Domain protein*), impliquant des interactions DD-DD. A son tour TRADD va recruter la protéine RIP-1 (*Receptor Interacting Protein 1*). Selon les partenaires de RIP-1, la finalité du signal transduit par le TNF-R sera différente. La liaison d'ubiquitine ligases comme TRAF-2 ou cIAP1/2 conduira à l'activation de la voie de signalisation NF κ B et *in fine* à une réponse inflammatoire, tandis que celle d'enzyme de dé-ubiquitination telle que CYLD conduira à l'activation de la caspase 8 et à terme à la mort cellulaire (Llambi et Galuzzi 2012).

Lorsque la caspase 8 se retrouve active, elle va cliver différents substrats (**Figure 5**). Deux réponses distinctes peuvent se produire. Dans les cellules dites de « type I », la caspase 8 clive et active les caspases effectrices 3 et 7 qui induisent directement la mort des cellules. Dans les cellules de « type II », il y a clivage de la protéine pro-apoptotique Bid (*Bcl-2 Homology3 (BH3)-Interacting Domain Death Agonist*). La forme tronquée : tBid, ainsi générée, est transloquée aux mitochondries où elle y induit une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (*MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*). Cela se traduit par une perte du potentiel mitochondrial $\Delta\psi_m$ et la libération de protéines toxiques, initialement retenues dans l'espace inter-membranaire (IMS) mitochondrial. Celles-ci contribuent à l'activation de la caspase 9 initiatrice, qui

comme la caspase 8, permettra l'activation des caspases effectrices 3 et 7. Dans cette 2^{ème} voie, il y a une coopération entre la voie d'apoptose extrinsèque et intrinsèque car elle requiert une étape indispensable de MOMP pour que la mort n'ait lieu.



4. Apoptose intrinsèque

Contrairement à la voie extrinsèque qui peut conduire à la mort cellulaire indépendamment des mitochondries, la voie d'apoptose intrinsèque est également nommée apoptose mitochondriale du fait de l'absolue nécessité des mitochondries pour aboutir à la mort des cellules. Dans les cellules saines les mitochondries contrôlent différents points cruciaux à leur bon fonctionnement. En effet, la production énergétique, la régulation du statut d'oxydation-réduction, la génération de dérivée réactifs de l'oxygène (*ROS : Reactive Oxygen Species*), l'homéostasie calcique, l'apport de précurseurs biosynthétiques tels que l'acétyl-coA ou les pyrimidines sont autant de paramètres que les mitochondries régulent. Dans les cellules stressées par le stimulus adéquat, les mitochondries deviennent la plateforme centrale d'initiation de l'apoptose (**Figure 4**).

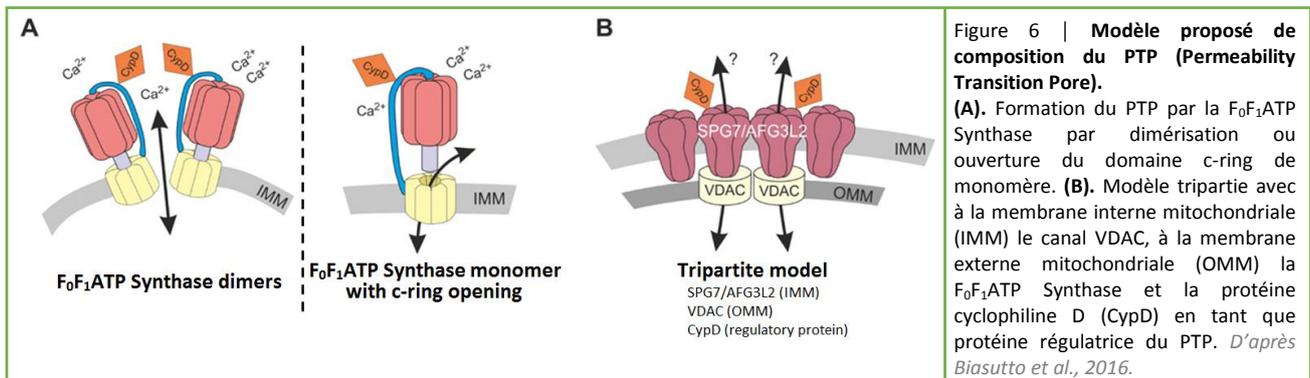
A ce niveau s'affrontent alors des signaux pro et anti-apoptotiques qui régulent de façon antagoniste la MOMP. La famille Bcl-2 est au cœur du contrôle de l'intégrité de la membrane externe mitochondriale (MOM). Une description plus ample de cette famille sera effectuée par la suite donc nous nous restreindrons ici à un mécanisme d'action général. Brièvement, la famille Bcl-2 est divisée en deux grandes catégories de protéines : des membres anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-xL et des membres pro-apoptotiques : les protéines BH3-Only et les effecteurs Bax et Bak. La réception de stimuli apoptotiques comme des dommages à l'ADN ou un stress du RE va induire une augmentation du niveau de BH3-Only intracellulaire. Un déséquilibre se crée alors entre les signaux anti et pro-apoptotiques où ces derniers s'avèrent être en supériorité. Cela amène à l'activation des effecteurs de cette famille : les protéines Bax et Bak. Le modèle de MOMP le plus classiquement décrit correspond à l'oligomérisation de Bax et Bak suite à leur activation, ce qui permet la formation de pores dans la membrane externe mitochondriale. Cependant de nombreuses études ont caractérisé d'autres structures protéiques ou lipidiques, pouvant expliquer la perte d'intégrité de la MOM, mentionnées ci-dessous.

a. Complexes moléculaires responsables de la MOMP

Le rôle évident des effecteurs Bax et Bak de la famille Bcl-2 dans l'apoptose intrinsèque, a conduit à de vastes investigations sur leur potentiel inducteur de mort. Les protéines Bax comme Bcl-xL présentent en certains points une structure semblable aux toxines bactériennes formant des pores telles que la toxine diphtérique et les colicines (Muchmore et al., 1996; Suzuki et al., 2000). C'est pourquoi la question s'est posée de savoir si ces protéines pouvaient également former des pores. Une des premières études indiquant l'activité de formation de pores par Bax a été effectuée avec un modèle de liposome encapsulant de la carboxyfluoresceine où l'ajout de protéine Bax recombinante permet sa libération. La formation de canaux, dépendante de Bax, dans une bicouche lipidique plane a également été détectée (Antonsson et al., 1997). Une activité semblable de formation de canaux dans des vésicules lipidiques ou sur bicouche plane a également été mise en évidence pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2 (Minn et al., 1997; Schendel et al., 1997). Les canaux ainsi formés par ces trois protéines ont été caractérisés comme sélectifs de certains ions, sensibles au pH et de conductance variable ce qui se traduit par des tailles variables. Les canaux ioniques formés par Bcl-xL et Bcl-2 sont sélectifs des cations tandis que ceux formés par Bax sont sélectifs des anions. Par ailleurs la formation de canaux ioniques par Bax est inhibée par Bcl-2. Un modèle a alors été proposé où les protéines pro et anti-apoptotiques réguleraient la balance ionique mitochondriale. Un déséquilibre dans cette régulation, avec notamment

l'augmentation de l'activité des canaux formés par Bax durant l'apoptose, amènerait à un gonflement des mitochondries, une rupture de la MOM et l'ouverture d'un second canal nommé PTP (*Permeability Transition Pore*). Néanmoins les canaux ioniques formés par les protéines de la famille Bcl-2 présentent une conductance bien moindre comparée à celle du canal mitochondrial VDAC-2, questionnant sur la pertinence du rôle de ces canaux dans l'apoptose.

Le complexe multi-protéique PTP est formé au niveau de la membrane mitochondriale interne (*MIM : Mitochondrial Inner Membrane*) mais est également présent au niveau de la MOM (**Figure 6**). Ce canal ionique a pour fonction de relarguer les ions calciques Ca^{2+} des mitochondries lorsqu'une charge excessive s'y trouve. Il présente des conductances donc des tailles variables et son ouverture est réversible. Celle-ci est favorisée par une surcharge calcique, un stress oxydatif ou une dépolarisation de la MIM. Une ouverture soutenue va induire la perméabilisation de la MIM, conduisant à une libération indirecte des facteurs pro-apoptotiques de l'espace inter-membranaire. Ceci est dû à une rupture de la MOM survenant suite au gonflement de l'espace matriciel. La composition de ce canal reste mal comprise.



En effet, s'il est certain que la cyclophiline D est un constituant majeur et systématiquement retrouvée (Baines et al., 2005; Nakagawa et al., 2005), il ne peut pas en être dit autant des protéines ANT, VDAC, TP50, PiC, dont l'absence n'inhibe pas la formation du canal. Tandis que ces protéines semblent être davantage des régulateurs que des éléments à proprement parlé du PTP, d'autres protéines de la MIM : la F_0F_1 ATP Synthase et les AAA ATPases SPG7/AFG3L2 semblent en revanche être des constituants du PTP. Différents modèles de composition du canal ont été proposés. Le rôle du PTP dans l'apoptose est plus que controversé. Tandis que certains chercheurs penchent en faveur d'une action initiatrice de l'apoptose d'autres considèrent son ouverture comme une conséquence du déclenchement de l'apoptose. Ces derniers s'appuient notamment sur l'évidence que des cellules déficientes pour la cyclophiline D conservent des voies d'apoptose

intrinsèque comme extrinsèque pleinement actives (Biasutto et al., 2016; Kinnally et Antonsson, 2007).

Bien que les deux structures décrites ci-dessus contribuent au déclenchement de la MOMP, leurs actions semblent relativement limitées. L'une des structures intervenant de façon majoritaire dans l'induction de la MOMP correspond au pore apoptotique MAC (*Mitochondrial Apoptosis-induced Channel*) (Dejean et al., 2006). Il a été identifié par analyse Patch-clamp sur des mitochondries isolées de cellules apoptotiques (Dejean et al., 2005). Les effecteurs Bax comme Bak sont des constituants directs de ce pore dont la formation résulte de l'oligomérisation de ces deux protéines et dont la taille peut varier (**Figure 7**). En effet, des structures allant de 4 à 100 molécules ont été décrites (Nechushtan et al., 2001; Saito et al., 2000; Zhou et Chang, 2008), conduisant à un diamètre minimum de 4nm, ce qui est suffisant pour le passage d'un des facteurs pro-apoptotiques de l'espace inter-membranaire qu'est le cytochrome C. Dans ce cas, le MAC correspond à un pore protéinique uniquement formé des oligomères Bax ou Bak. Des études récentes indiquent que les oligomères de Bax forment des structures circulaires semblables à un anneau, pouvant atteindre 400nm, dépourvu des protéines mitochondriales telles que Tom20/22 ou Sam50 (Große et al., 2016; Salvador-Gallego et al., 2016). Un modèle alternatif a été décrit où le MAC serait plutôt un pore lipidique. L'interaction des formes activées de Bax et Bak modifierait la courbure de la MOM aboutissant à la formation d'un pore lipidique transitoire ou à une inversion micellaire menant à terme à la libération de protéines de l'espace inter-membranaire (Basañez et al., 2002; Hardwick et Polster, 2002). Ce modèle est en accord avec certaines études indiquant que la taille des pores formés par Bax peut atteindre 100nm, et dont les bords sont lisses et dépourvus de matériel protéinique (Schafer et al., 2009). Qu'il soit de type protéinique ou lipidique, le pore apoptotique MAC représente le principal mécanisme de déclenchement de la MOMP.

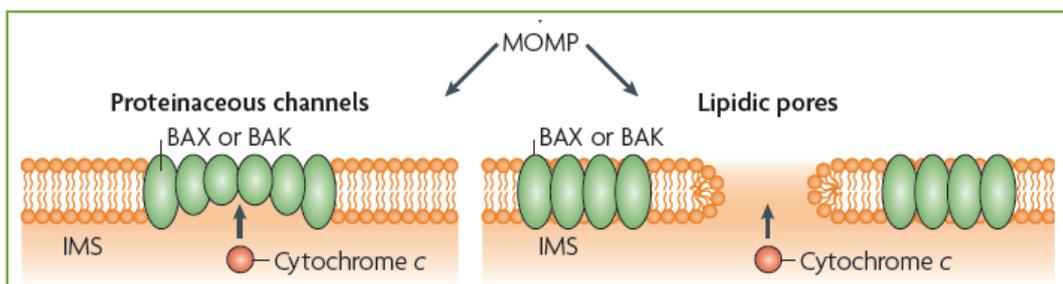


Figure 7 | Formation du pore apoptotique par les effecteurs Bax et Bak
Après activation par les protéines BH3-Only, les effecteurs Bax et Bak subissent des changements conformationnels permettant leur oligomérisation. Deux modèles de pores issus des oligomères Bax/Bak sont proposés. Il peut s'agir d'un pore protéinique uniquement formé des protéines effectrices ou/et d'un pore lipidique correspondant à une ouverture de la bicouche lipidique de la membrane externe mitochondriale, conséquence directe de l'oligomérisation des effecteurs. D'après Tait et Green, 2010.

b. Cinétique de déclenchement de la MOMP

L'initiation de la MOMP peut se faire au niveau d'une ou plusieurs mitochondries dans les cellules. Des études mentionnent sa propagation au reste du réseau mitochondrial par vagues successives (Lartigue et al., 2008; Rehm et al., 2009). Cela semble en partie dépendre de modifications post-traductionnelles de protéines comme de la signalisation calcique au niveau du RE (Bhola et al., 2009). Par ailleurs, une 1^{ère} vague de MOMP permet l'activation des caspases, qui en induisant le clivage de tBid (comme décrit précédemment dans la voie extrinsèque), contribuent à l'apparition d'une nouvelle vague de MOMP. Le rôle d'enzymes dans le processus de propagation de la MOMP reste cependant incertain car la durée entre la 1^{ère} et la dernière mitochondrie à subir une MOMP reste inchangée lors d'une baisse de température qui inhibe l'activité enzymatique (Goldstein et al., 2000). Le PTP ne constitue pas un puissant mécanisme d'induction de la MOMP *à contrario* du pore MAC. Son ouverture dépend probablement indirectement de ce dernier, cependant par son action il peut participer à la libération complète des protéines de l'IMS et ainsi amplifier la cascade de signalisation apoptotique médiée par le pore MAC. Le PTP constitue donc un mécanisme favorisant l'apparition de nouvelles vagues de MOMP. Bien que la cinétique d'initiation de la MOMP parmi les mitochondries soit très variable et dépende notamment du phénomène de propagation, le déroulement de la MOMP en lui-même est rapide et suit une cinétique invariable. Les travaux de Goldstein définissent une vitesse de libération de la protéine de l'IMS : Cytochrome C dans une cellule donnée. Elle correspond à la durée de libération du cytochrome C entre la 1^{ère} à la dernière mitochondrie à être concernée par une initiation de la MOMP et ne requiert que cinq minutes pour se produire. En revanche, à l'échelle intracellulaire, les mitochondries entrent elles ne libèrent pas le cytochrome C à une vitesse équivalente : tandis que certaines requièrent à peine une minute pour libérer l'intégralité de leur contenu en Cytochrome C, d'autres n'auront effectué qu'une libération incomplète pour le même temps imparti (Goldstein et al., 2000).

c. Libération de facteurs pro-apoptotiques de l'espace inter-membranaire après la MOMP

Lorsque les mitochondries présentent une perte d'intégrité de leur membrane externe, elles libèrent dans le cytosol les protéines qui étaient retenues dans l'espace inter-membranaire, telles que le cytochrome C, Smac (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspase*, aussi nommée Diablo), Omi (aussi nommée HtrA2), AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) et Endo-G (*Endonucléase-G*). Certaines études suggèrent un mécanisme sélectif de libération des protéines de l'IMS. Tandis que la perméabilisation de liposome par Bax libère tout aussi efficacement les molécules de dextran de 10kDa ou 2MDa (Kuwana et al., 2002), la libération de protéines IMS en contexte de cellules

entières après induction de la MOMP présente une certaine limite de taille. En effet des dimères GFP-Smac d'environ 100kDa sont relargués de l'IMS après MOMP alors que des tétramères dsRed-Smac de 190 kDa ne le sont pas (Rehm et al., 2003). La sélectivité a surtout été mise en avant par une étude dans des cellules déficientes pour Drp-1 (*Dystrophin-related Protein-1*). Cette protéine est requise pour le processus de fission des mitochondries. En son absence, Smac est libérée dans le cytosol après induction de la MOMP contrairement à la plupart du cytochrome C qui reste retenue aux mitochondries (Estaquier et Arnoult, 2007). Il a été suggéré que cette éventuelle sélectivité dépende d'interactions entre les protéines IMS et les membranes mitochondriales ou soit due à un remodelage de la membrane mitochondriale interne. Par exemple des interactions électrostatiques entre le cytochrome C et la cardiolipine (lipide mitochondrial) régulent sa libération. Par ailleurs, AIF présente une libération de l'IMS différée comparée à celle du cytochrome C. Cette protéine est insérée dans la MIM et requiert un clivage par la protéase Calpaine I provenant du cytosol pour permettre son relargage. Enfin certains travaux ont mis en évidence un remodelage des crêtes mitochondriales durant l'apoptose notamment dépendant des protéines BH3-Only et effecteurs Bax et Bak. La MIM présente des crêtes qui augmentent la surface disponible pour le métabolisme énergétique. C'est à ce niveau que se localise le cytochrome C. Le remodelage qui s'effectue pendant l'apoptose élargit les jonctions inter-crêtes ce qui entraîne une mobilisation du cytochrome C dans l'espace inter-membranaire (**Figure 8**). Ce phénomène survient suite à la rupture des oligomères de la protéine IMS OPA-1 et peut être inhibé par la protéine IMS PARL qui clive OPA-1 (*Optic Nerve Atrophy-1*) sous une forme qui maintient des jonctions serrées, empêchant la libération du cytochrome C (Tait et Green, 2013).

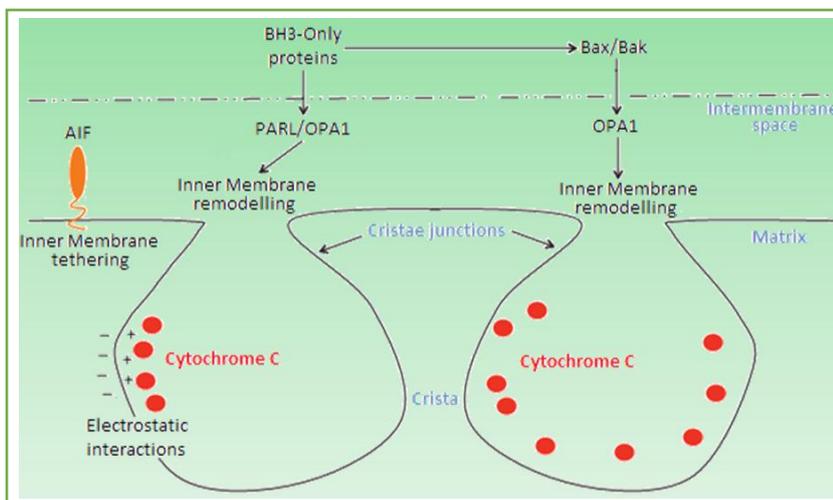


Figure 8 | Régulation du relargage des protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial à postériori de la MOMP

La protéine de l'IMS AIF est ancrée dans la membrane interne mitochondriale (MIM) et requiert un clivage afin d'être relarguée des mitochondries lors de la MOMP. La majorité du cytochrome C est séquestré dans les crêtes mitochondriales et associé à la MIM par des interactions électrostatiques. Il semble qu'un remodelage des crêtes se produise lors de la MOMP et soit nécessaire pour la libération du cytochrome C. Le remodelage des crêtes est régulé par les protéines BH3-Only et les effecteurs Bax et Bak sous leur forme active et dépend des deux protéines : PARL (Rhomboid protéase) et OPA-1 (dynamine-like GTPase). D'après Tait et Green, 2013.

d. Le réseau mitochondrial : Rôle passif ou actif dans le déclenchement de la MOMP ?

Pour que l'apoptose n'ait lieu il doit y avoir déclenchement de la MOMP. Cela requiert une relocalisation des effecteurs aux mitochondries et leur activation. Au cœur de tous ces événements se trouvent donc les mitochondries. Celles-ci ne restent pas isolées en nombre fixe dans les cellules, mais forment au contraire un réseau mitochondrial dynamique alternant en permanence des phénomènes de fission et fusion des mitochondries. La fusion mitochondriale est gouvernée principalement par trois protéines que sont les mitofusines : Mfn 1 et 2 et la protéine Opa-1. La machinerie protéique impliquée dans la fission mitochondriale fait intervenir les protéines Drp-1, plutôt cytosolique et Fis-1, localisée à la MOM. Fis-1 semble agir en tant que récepteur de Drp-1 permettant sa relocalisation à la MOM où la protéine s'oligomérisse provoquant la fission mitochondriale. Il se trouve que l'équilibre entre fission et fusion mitochondriale est inexorablement perturbé durant l'apoptose provoquant l'apparition d'un réseau mitochondrial fragmenté. Cela peut survenir suite à une augmentation de la fission et/ou une diminution de la fusion (Autret et Martin, 2009; Jourdain et Martinou, 2009). Cet événement a longtemps été considéré comme une simple conséquence de la voie d'apoptose. Cependant, des évidences indiquent qu'en son absence, la libération du cytochrome C est altérée, diminuant la réponse apoptotique. En effet, l'inhibition de la fission en restreignant l'activité de Drp-1 ou Fis-1 grâce à l'utilisation de dominant négatif, ARN interférence réduit de manière significative l'apoptose des cellules (Estaquier et Arnoult, 2007; Frank et al., 2001; Lee et al., 2004). *A contrario*, la surexpression de ces protéines sensibilise les cellules à l'apoptose induite par divers traitements, il en est de même lors d'une inhibition de la fusion, qui se traduit par une fragmentation du réseau mitochondrial. De façon concordante, la surexpression des protéines Mfn 1/2 ou Opa-1 inhibe la fragmentation du réseau et l'apoptose (Arnoult et al., 2005; Brooks et Dong, 2007; Neuspiel et al., 2005). Cependant ces effets restent sujets à controverse car s'il est vrai que l'inhibition de la fragmentation du réseau abroge la libération du cytochrome C, elle ne semble pas perturber celle de Smac ce qui retarde la réponse apoptotique mais ne l'élimine pas (Parone et al., 2006)

Il se trouve que la famille Bcl-2 intervient dans la régulation de cette dynamique mitochondriale que ce soit dans les cellules saines ou apoptotiques (Autret et Martin, 2009; Jourdain et Martinou, 2009; Karbowski et al., 2006). Bien qu'il y ait quelques controverses, des tendances se dégagent des différentes études sur le sujet. Il semble que les protéines anti-apoptotiques limitent la fission des mitochondries tandis que les pro-apoptotiques la favorisent. La fragmentation du réseau survient notamment en réponse à des traitements tels que la

staurosporine mais est inhibée par la surexpression de Bcl-2 ou Bcl-xL. Un rôle critique de Bak dans l'induction de la fission mitochondriale au cours de l'apoptose a été mis en évidence, action qui ne semble pas redondante avec Bax. En effet, des cellules déficientes pour Bak ne présentent plus de réseau fragmenté en réponse à un signal apoptotique *a contrario* de cellules déplétées en Bax. La protéine Bak est capable d'interagir à la fois avec Mfn1 et Mfn-2 en condition basale. Lors d'un stress, il y a une perte des complexes Bak – Mfn-2 en faveur de la formation accrue de complexes Bak – Mfn-1. Ces deux événements sont responsables de la fragmentation mitochondriale régulée par Bak (Brooks et Dong, 2007; Brooks et al., 2007). Au cours du processus de fission mitochondriale, il se produit une modification de la forme des mitochondries avec notamment l'apparition de membranes extrêmement courbées. Or des données suggèrent que la forte courbure des membranes mitochondriales permet un meilleur recrutement de Bax et de protéines BH3-Only et favorise la libération de cytochrome C (Prudent et al., 2015).

La dynamique mitochondriale intervient directement dans la régulation du déclenchement de la MOMP. La fragmentation du réseau mitochondrial se produisant lors d'une réponse apoptotique constitue plus qu'un phénomène passif. En effet au cours de l'apoptose, les effecteurs stimulent la fission mitochondriale favorisant d'une part leur association à la MOM et d'autre part une libération efficace de cytochrome C.

e. Formation de l'apoptosome, activation de la caspase 9 et éléments régulateurs

Une fois que la MOMP s'est produite et a permis la libération des protéines de l'IMS, c'est au tour de l'apoptosome de prendre en charge la suite de la réponse apoptotique. Cette structure macroléculaire permet d'activer la caspase 9 ; sa formation s'effectue comme suit (**Figure 9**). Le cytochrome C libéré dans le cytosol interagit avec la protéine APAF-1 (*Apoptotic Protease Factor 1*) ce qui constitue la plateforme d'échafaudage autour de laquelle l'apoptosome va s'assembler. Cela induit l'hydrolyse du cofacteur d'APAF-1 : dATP en dADP, mais sous cette forme APAF-1-dADP reste inhibée. S'en suit un échange des molécules de dADP avec du dATP libre, ce qui entraîne l'oligomérisation de 7 complexes [Cytochrome C – Apaf-1/dATP] formant ainsi un apoptosome actif. Au centre de cette structure, la protéine APAF-1 voit son domaine CARD exposé et en mesure de lier celui de la pro-caspase 9. La proximité des monomères de caspase 9 inactifs est telle qu'un auto-clivage s'effectue, ce qui stabilise les dimères de caspases 9 et donne naissance à sa forme active. Précisons que dans le cas de la caspase initiateur 9 son activation repose sur sa dimérisation et non sur son clivage. Bien que l'objectif de l'apoptosome ait été atteint, son action ne s'arrête pas pour autant. En effet, un cycle continu de recrutement de pro-caspases 9, activation, clivage et

relargage se réalise au niveau de la plateforme macromoléculaire. Sa durée de vie dépend directement de la quantité de caspase 9 inactive encore présente dans le cytosol, car celle-ci présente une affinité accrue pour l'apoptosome et déloge la forme néo-activée qui s'y trouve. La caspase 9 une fois activée va déclencher la mise en route de la dénommée « cascade des caspases » en clivant et activant les caspases effectrices 3 et 7. Ce phénomène assure une amplification du signal et élargit le spectre d'action des caspases à davantage de cibles. Les caspases (*Cysteinyl-ASpartate-cleaving proteASE*) sont des protéases très spécifiques qui hydrolysent des ponts peptidiques au niveau de leurs substrats, uniquement après certains résidus d'acide aspartique. Cette réaction dépend de la présence de résidus cystéine au niveau du site catalytique de ces enzymes. Ce n'est pas moins de 100 substrats qui ont été identifiés et dont le clivage peut tout aussi bien les inhiber que les activer selon les cas. Quoi qu'il en soit, la conséquence de ces divers clivages protéiques n'est en règle générale rien d'autre que la mort des cellules. La protéine XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis*) est un puissant régulateur négatif des caspases. En effet, il fixe et inhibe l'activité catalytique de la caspase 9 et des caspases effectrices 3 et 7, et est également capable d'induire leurs ubiquitinations et dégradations protéosomales subséquentes. C'est à ce niveau qu'interviennent les protéines Smac et Omi, afin de contrecarrer les effets anti-apoptotiques de XIAP. (Green et Llambi, 2015; Li et al., 1997; Riedl et Salvesen, 2007).

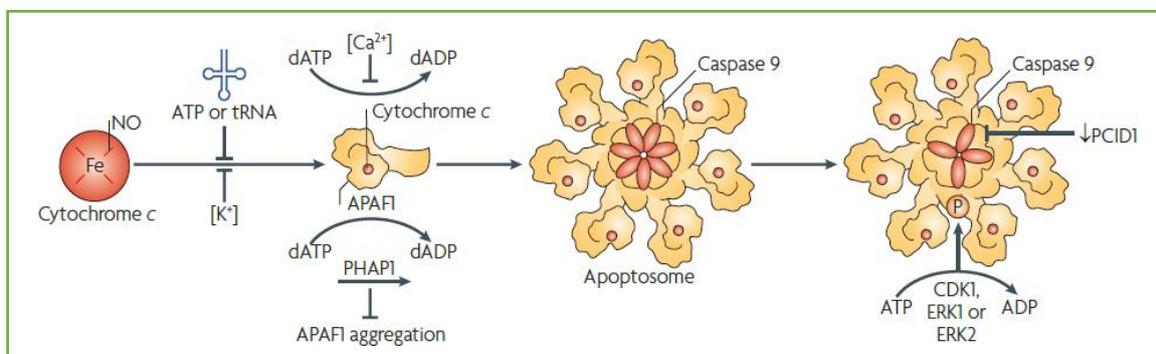


Figure 9 | **Formation de l'apoptosome : plateforme d'activation de la caspase 9**

Une fois libéré des mitochondries, le cytochrome C fixe un monomère d'APAF-1. Cela nécessite au préalable l'ajout d'un groupement hème prosthétique au cytochrome C, qui se produit lors de son passage dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Le complexe cytochrome C – APAF-1 permet une oligomérisation d'APAF-1 sous la forme d'un héptamère discoïde, structure correspondant à l'apoptosome. Sa formation implique l'hydrolyse du dATP par APAF-1, stimulée par le cytochrome C. Les niveaux physiologiques d'ATP et ARN de transfert (tRNA), en fixant le cytochrome C, peuvent bloquer la formation de l'apoptosome. De même, les niveaux intracellulaires de potassium inhibent la formation de l'apoptosome en compétitant avec le cytochrome C pour la liaison à APAF-1. A l'inverse, la protéine PHAF-1 (*Putative HLADR-associated Protein-1*) favorise la formation de l'apoptosome en stimulant l'échange nucléotidique (le calcium intracellulaire peut bloquer cette étape) et en évitant l'agrégation des monomères d'APAF-1. L'apoptosome constitue une plateforme de recrutement des monomères inactifs de caspase 9 et la génération de dimères actifs. La phosphorylation de la caspase 9 par les complexes CDK1 – CyclineB1, ERK1 et 2 inhibe l'activité de la caspase 9; la diminution de protéine PCID-1 (*PCI Domain-containing protein-1*) conduit au même effet. D'après Tait et Green, 2010.

Les niveaux physiologiques de nucléotides et ARNs de transfert (tRNA) inhibent l'interaction du cytochrome C avec APAF-1, et les niveaux intracellulaires de potassium et ions calciques

bloquent également l'assemblage de l'apoptosome en perturbant l'échange de dADP par du dATP. Ce niveau de régulation de la formation de l'apoptosome soulève la question de la survenue accidentelle de MOMP dans des cellules saines qu'il serait nécessaire de contrôler (Tait and Green, 2010).

5. Mort cellulaire indépendante des caspases

Un modèle alternatif de déclenchement d'une mort cellulaire apoptotique indépendante des caspases a été proposé en 2008 par Tait et Green. Les auteurs recourent l'ensemble des travaux ayant mis en évidence la survenue d'une mort cellulaire en présence d'une inhibition de l'activité des caspases. Ils emploient alors le terme de CICD (*Caspase-Independent Cell Death*) qu'ils définissent comme étant la mort survenant suite à un déclenchement par des signaux apoptotiques qui activent normalement les caspases, sans y parvenir dans ce cas (Tait et Green, 2008). Bien que partageant des traits caractéristiques de l'apoptose intrinsèque tels que la MOMP, la CICD s'en démarque néanmoins. L'exposition des phosphatidylsérines comme la condensation de la chromatine sont respectivement absentes ou partielles. En revanche, une cellule sujette à la CICD présente une vacuolisation cytoplasmique à large échelle, l'accumulation d'autophagosomes et une condensation nucléaire périphérique. Tandis que le phénotype des cellules apoptotiques est presque invariant, celui de la CICD au contraire se présente sous une grande variété de caractéristiques qui dépend entre autres du stimulus initial comme du contexte cellulaire. L'observation d'une réponse apoptotique en absence des caspases remonte à la fin des années 1990, notamment en présence de l'inhibiteur pharmacologique des caspases : z VAD-fmk ou lors d'une surexpression de XIAP, protéine inhibitrice des caspases (Hirsch et al., 1997; Wilkinson et al., 2004). L'hypothèse d'une inhibition incomplète des caspases avait été émise pour expliquer ce phénomène. Néanmoins l'apoptose a été également observée en absence des constituant de l'apoptosome : APAF-1, cytochrome C et caspase 9 invalidant cette hypothèse (Hakem et al., 1998; Haraguchi et al., 2000; Li et al., 2000). Il a été proposé deux mécanismes par lesquels la MOMP induit à terme une mort cellulaire indépendante des caspases (**Figure 10**) (Galluzzi et al., 2012). Le premier implique un déclin des fonctions mitochondriales dues à la MOMP et le second correspond à un rôle actif des protéines de l'IMS libérées lors de la MOMP pour induire la CICD. La perméabilisation de la membrane mitochondriale, en plus d'induire l'activation des caspases lorsque cela est possible, provoque une perte progressive du potentiel mitochondrial ce qui perturbe non seulement la production d'ATP essentiel à la survie cellulaire, mais également l'import

de protéines mitochondriales ce qui peut déréguler de nombreuses fonctions mitochondriales (Colell et al., 2007). La protéine AIF libérée de l'IMS est transloquée au noyau où elle favorise la condensation de la chromatine. Néanmoins cette dernière n'est que partielle dans la CICD, le rôle prépondérant d'AIF dans la CICD semble plutôt dépendre de ses fonctions dans la respiration mitochondriale qui se retrouvent donc abrogées lors de son transfert au noyau (Lorenzo et al., 1999; Vahsen et al., 2004). Il apparaît donc qu'AIF, plutôt que d'agir comme un inducteur direct de la CICD, exerce son action indirectement en favorisant la perte de fonctions mitochondriales. Un parallèle peut être fait avec la protéine de l'IMS : EndoG. En effet, elle aussi présente un rôle important dans les fonctions mitochondriales notamment en régulant la biogénèse mitochondriale, la synthèse d'ADN et sa réparation. Lors de la MOMP, EndoG, comme AIF se retrouve transloquée au noyau où elle semble induire la dégradation de l'ADN. Mais ce transfert signifie également que la protéine n'assurera plus ses fonctions mitochondriales contribuant ainsi à la CICD. La sérine protéase Omi semble induire la CICD de façon plus directe car sa surexpression au cytoplasme suffit à promouvoir une mort qui n'est pas inhibée par le z VAD-fmk (Jones et al., 2003). Néanmoins, elle participe aussi au maintien de l'homéostasie mitochondriale donc comme dans le cas d'AIF et EndoG, son relargage au cytoplasme lors de la MOMP supprime son action aux mitochondries.

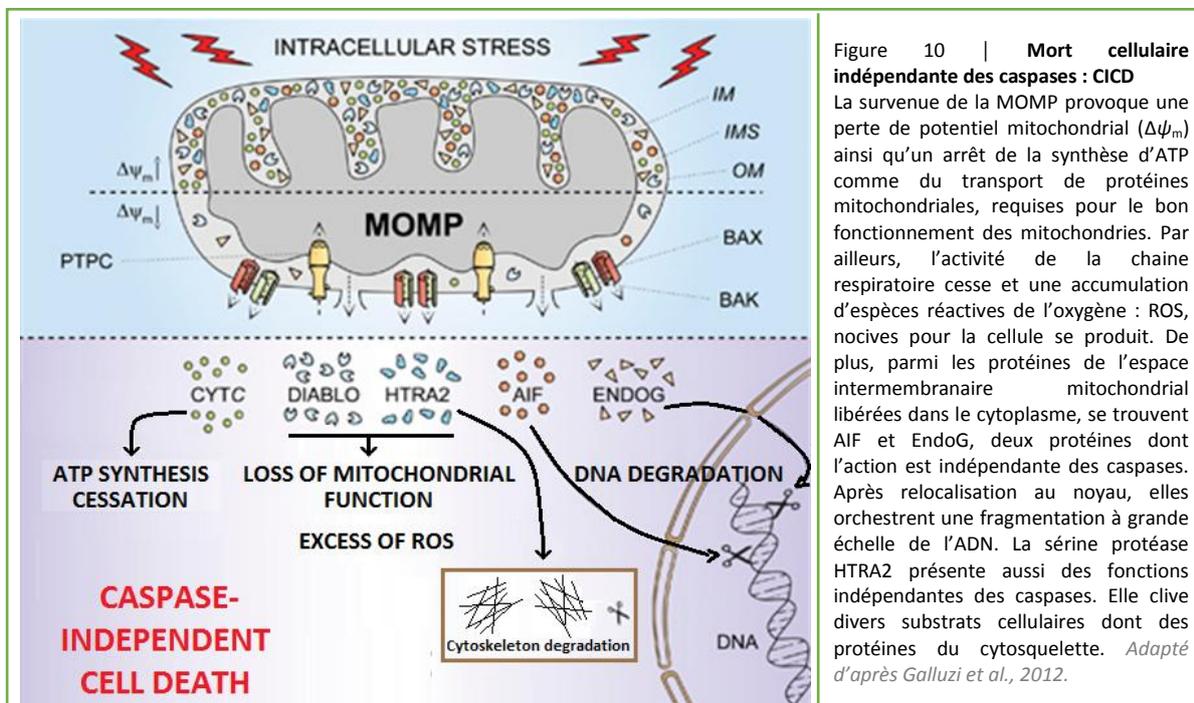


Figure 10 | **Mort cellulaire indépendante des caspases : CICD**
 La survenue de la MOMP provoque une perte de potentiel mitochondrial ($\Delta\psi_m$) ainsi qu'un arrêt de la synthèse d'ATP comme du transport de protéines mitochondriales, requises pour le bon fonctionnement des mitochondries. Par ailleurs, l'activité de la chaîne respiratoire cesse et une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène : ROS, nocives pour la cellule se produit. De plus, parmi les protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial libérées dans le cytoplasme, se trouvent AIF et EndoG, deux protéines dont l'action est indépendante des caspases. Après relocalisation au noyau, elles orchestrent une fragmentation à grande échelle de l'ADN. La sérine protéase HTRA2 présente aussi des fonctions indépendantes des caspases. Elle clive divers substrats cellulaires dont des protéines du cytosquelette. *Adapté d'après Galluzi et al., 2012.*

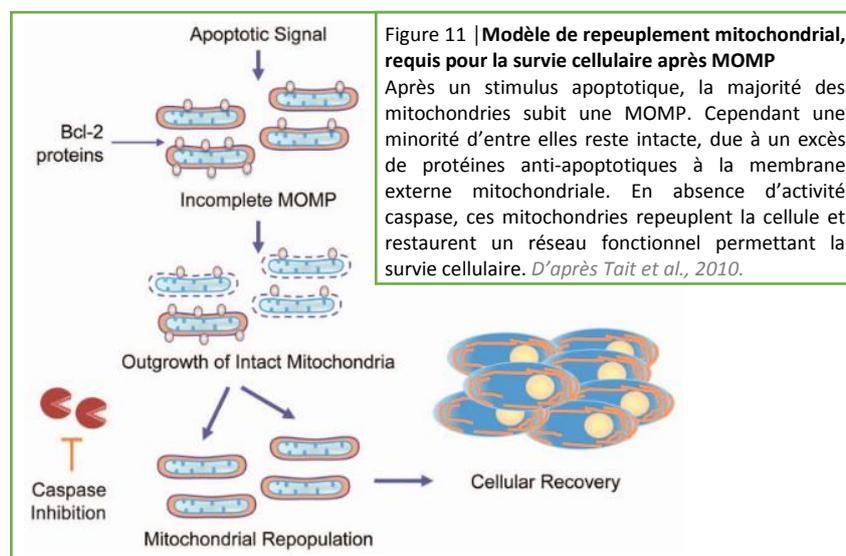
6. Mécanismes d'échappement à l'apoptose caspase dépendante et caspase indépendante

Que la mort apoptotique intrinsèque soit dépendante des caspases ou non, la MOMP n'en reste pas moins l'élément incontournable pour que ces deux voies atteignent leur objectif. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la famille Bcl-2 joue un rôle central dans le déclenchement de la MOMP. Il est fréquent qu'une dérégulation de cette voie survienne lors de la tumorigénèse. Ainsi une surexpression des membres anti-apoptotiques comme une diminution de l'expression de leur contrepartie pro-apoptotique contribue à la résistance des cellules tumorales à la mort cellulaire (Lopez et Tait, 2015).

La formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9 sont des processus multi-étapes sujets à de nombreuses régulations (**Figure 9**). Les cellules tumorales présentent des altérations de ces mécanismes de régulation contribuant à leur résistance à l'apoptose intrinsèque dépendante des caspases. Les protéines HSP70 et HSP90, dont la surexpression fréquente dans les cancers est associée à de faibles pronostiques pour les patients, régulent négativement l'assemblage de l'apoptosome ou le recrutement de la pro-caspase 9. *A contrario*, la protéine PHAP-1 promeut l'activité de l'apoptosome en empêchant l'agrégation des molécules d'APAF-1 et en favorisant l'échange nucléotidique. Une diminution de son expression est associée à une résistance à l'apoptose et à une survie clonogénique accrue, caractéristique retrouvée lors de la tumorigénèse. Par ailleurs, le niveau d'expression de la caspase 9 influe directement sur le contrôle de l'activité des caspases. La protéine PCID-1 régule positivement l'expression de la caspase 9 et son absence, souvent retrouvée dans les cancers pancréatiques, est associée à une diminution de l'activité des caspases pendant l'apoptose. Enfin la phosphorylation de la caspase 9 régule négativement son activité. Le résidu Thréonine 125 de la protéase est ciblé par de nombreuses kinases telles que ERK 1/2, CDK1-CyclineB1, or ces voies sont souvent dérégulées dans les cancers. En outre, une variété de lignées tumorales a perdu l'expression d'APAF-1 ou surexprime l'inhibiteur de caspases XIAP (Green et Llambi, 2015; Tait et Green, 2010).

Face à ces nombreux mécanismes d'inhibition de l'activité des caspases qui contrecarrent l'apoptose dépendante de celles-ci, la CICD peut constituer un mécanisme de sureté assurant l'achèvement de la voie de signalisation jusqu'à la mort cellulaire. La MOMP est un évènement considéré comme un point de non retour pour les cellules qui l'ont déclenchée. Dans une grande majorité des cas cela s'avère juste, néanmoins dans certains autres une restauration cellulaire peut s'effectuer après la MOMP. L'étude de (Colell et al., 2007) a effectué un criblage des protéines

capables d'induire une résistance à la CICD et a identifié la GAPDH (Glyceraldéhyde-3-Phosphate DeHydrogenase) comme candidat. Lors d'une CICD, la protéine induit une augmentation de la transcription de protéines de la machinerie autophagique (ATG-12). Il y a alors une augmentation du flux autophagique permettant d'une part d'éliminer les mitochondries endommagées par la MOMP, et d'autre part, de faciliter la production d'énergie. Par ailleurs, Tait et Green ont mis en évidence un phénomène de MOMP incomplet responsable de la résistance à la CICD (**Figure 11**) (Tait et al., 2010). Ces mitochondries restées intactes durant le déclenchement de la CICD, présentent une MOMP après inhibition pharmacologique des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, suggérant que leur résistance à entrer en MOMP est due à un défaut d'activation des effecteurs Bax et Bak. Il est possible que la répartition des membres de la famille Bcl-2 ne soit pas homogène entre les différentes mitochondries du réseau. Celles présentant un niveau plus élevé d'anti-apoptotiques pourraient donc échapper au déclenchement de la MOMP en réponse à un stimulus apoptotique. Les auteurs proposent un modèle de repopulation mitochondrial où la minorité de mitochondries restées intactes après la vague de MOMP suffit à restaurer le réseau mitochondrial. Le déclenchement d'une MOMP partielle est non seulement propice à une résistance à la CICD, par restauration du réseau mitochondrial, mais a également été associé à un effet directement pro-tumorigénique du à une augmentation de l'instabilité génomique (Ichim et al., 2015). Les différents mécanismes moléculaires de résistance à la CICD sont probablement mis à contribution durant la tumorigénèse car les cellules métastatiques présentent des niveaux élevés de GAPDH, glycolyse, et autophagie, sans compter la surexpression des protéines anti-apoptotiques (Tait et Green, 2008, 2010).

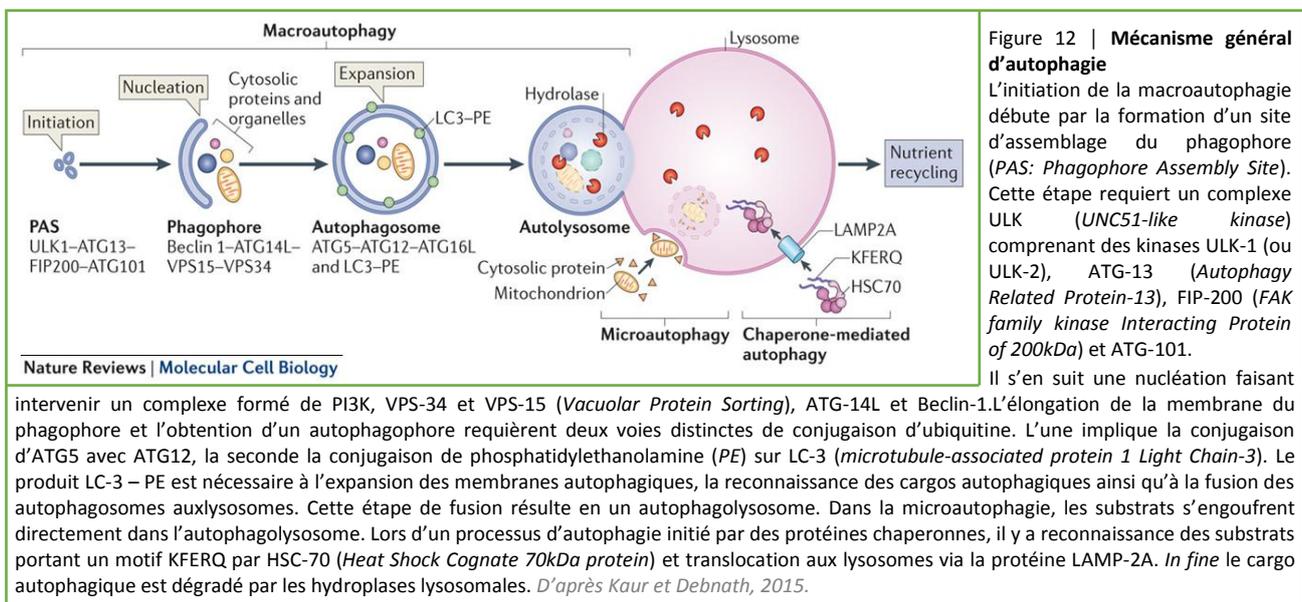


II. Morts cellulaires non apoptotiques

Comme mentionné au début de cette partie B, je ne m'apresentirai pas sur les morts cellulaires non apoptotiques. C'est pourquoi, j'ai fait le choix d'aborder brièvement les mécanismes généraux relatifs à l'autophagie et la nécroptose.

1. Mort cellulaire autophagique, interconnectée à l'apoptose

L'autophagie est un processus dépendant de l'activité des lysosomes qui permet la dégradation de divers éléments cellulaires allant de simples molécules à des organelles entières. Initialement ce phénomène a été décrit comme un mécanisme pro-survie orchestré en cas de stress métabolique tel qu'une privation en nutriment ou des déficits bioénergétiques. Cela s'effectue par une séquestration de fractions cytosoliques (cargo) dans une vésicule à double membrane nommée l'autophagosome. La fusion de celui-ci avec les lysosomes génère un autophagolysosome où le cargo autophagique est dégradé. *In fine* la voie autophagique assure une biodisponibilité de substrats métaboliques indispensables à la survie cellulaire lors d'une pénurie. Par ailleurs, l'autophagie permet l'élimination d'organelles entières endommagées, d'agrégats protéiques ou de pathogènes. (Kaur et Debnath, 2015).



La voie autophagique fait intervenir un très grand nombre d'acteurs protéiques dont plusieurs protéines ATG pour *Autophagy Related Protein* (**Figure 12**). Brièvement : ① la formation d'une double membrane : phagophore s'effectue grâce au complexe de pré-initiation composé des protéines ULK-1, FIP-200 et ATG-13 dont l'activation requiert AMPK. ② Cette structure recrute et

active le complexe d'initiation, formé de Beclin-1, Vps34 et 15, qui génère alors le lipide PI3P. Beclin-1 recrute d'autres partenaires tels que AMBRA-1 pour permettre la formation de l'autophagosome. ③ L'élongation et la clôture de la membrane de l'autophagosome implique deux voies de conjugaison : ATG5-12 et LC3-PE (aussi nommé LC3-II). La lipidation de la protéine LC3 (aussi connu sous l'appellation MAP1LC3 : *Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3*) avec la phosphatidyléthanolamine (PE) est utilisé comme marqueur d'une voie autophagique active. Cette protéine LC3 est requise pour l'expansion de la membrane. ④ L'étape ultime de fusion des autophagosomes avec les lysosomes qui conduit à la dégradation du contenu cytoplasmique nécessite diverses protéines (Stx-17, SNAP-29, VAMP8 et LAMP-1/2). Il s'en suit un efflux de métabolites utilisés dans diverses fonctions anaboliques telles que la synthèse protéique, la production d'ATP etc. De plus, un processus de reformation des lysosomes : ALR (*Autophagic Lysosome Reformation*) se produit afin de maintenir l'homéostasie des lysosomes pendant et après l'autophagie. (Kaur and Debnath, 2015)

La mort cellulaire autophagique a été mise en évidence dans un contexte où les cellules sont incapables d'induire l'apoptose mitochondriale par exemple en cas de déficience des effecteurs Bax et Bak ou d'inhibition des caspases. Ce processus est dépendant des protéines autophagiques ATG5, ATG-7 et Beclin-1. La mort survient notamment suite à une élévation des niveaux de ROS jusqu'à atteindre un seuil cytotoxique. Néanmoins la plupart du temps, l'autophagie est associée à un type de mort cellulaire donné, plutôt que d'induire elle-même une mort bien spécifique. Il y a notamment une interconnexion importante entre la voie autophagique et l'apoptose (**Figure 13**).

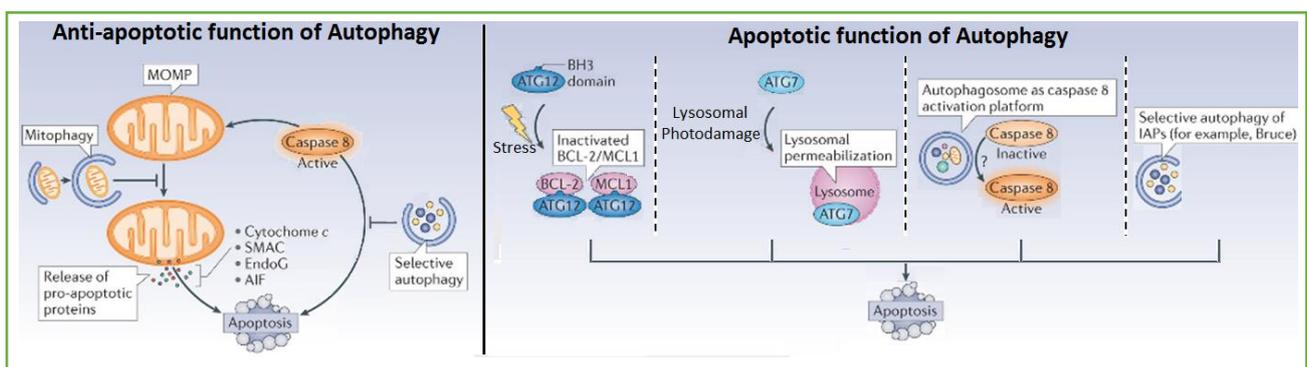


Figure 13 | **Rôle paradoxal de l'autophagie dans la voie apoptotique**

L'autophagie peut inhiber l'apoptose en éliminant spécifiquement les mitochondries endommagées après survenue d'une MOMP. Cela s'effectue par un processus de mitophagie qui retarde l'apoptose intrinsèque, en limitant la libération de facteurs pro-apoptotiques, ainsi que l'apoptose extrinsèque lorsqu'elle implique une action du BH3-Only tBid aux mitochondries. La caspase 8 active peut également être ciblée par l'autophagie, retardant dans ce cas l'apoptose extrinsèque. A l'inverse, l'autophagie peut aussi favoriser l'apoptose en inhibant les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 grâce à ATG-12. De plus, la protéine ATG-7 peut provoquer une rupture des membranes lysosomales conduisant à la mort cellulaire. L'autophagosome semble servir de plateforme d'activation de la caspase 8. Une dégradation sélective de facteurs anti-apoptotiques tels que les IAPs (BRUCE chez la drosophile) confère un rôle pro-apoptotique à l'autophagie. *Adapté d'après Mariño et al., 2014.*

L'autophagie est capable d'inhiber l'apoptose ce qui peut notamment s'effectuer grâce au processus dit de « mitophagie ». L'autophagie est bien souvent décrite comme un processus non sélectif, ce qui n'est pourtant pas toujours le cas. Une sélectivité existe envers les mitochondries endommagées, par exemple suite au déclenchement d'une MOMP. La perte de potentiel mitochondrial $\Delta\psi_m$ provoque l'ubiquitination (sur Lysine₆₃) des protéines mitochondriales VDAC-1, Mfn-1/2 ciblant les mitochondries à la mitophagie. La baisse du $\Delta\psi_m$ induit également une accumulation de la kinase Pink-1 à la surface de ces mitochondries. Elle y recrute l'E3-ubiquitine ligase Parkin qui ubiquitine des substrats à la MOM et envoie ainsi l'organelle endommagée à la destruction autophagique (Geisler et al., 2010). Ainsi un flux autophagique élevé peut augmenter le seuil apoptotique à franchir pour qu'une cellule en meure en réponse à un stimulus apoptotique. En outre, l'autophagie peut atténuer la mort cellulaire en dégradant spécifiquement certaines protéines pro-apoptotiques du cytosol comme il a été observé pour la caspase 8. Enfin, l'autophagie diminue l'abondance de la protéine p62 (aussi nommée SQSTM-1) or celle-ci en excès provoque une accumulation de ROS et la mort cellulaire.

L'apoptose possède le moyen de riposter et inhiber en retour l'autophagie ou la détourner de son rôle pro-survie. L'un des mécanismes repose sur le clivage par les caspases de composants de la machinerie autophagique tels qu'ATG-3, Beclin-1 et AMBRA-1 conduisant à leur dégradation et l'inactivation du programme autophagique. Par ailleurs, les produits de clivage ainsi générés peuvent présenter des fonctions pro-apoptotiques. Les fragments C-terminaux de Beclin-1 se relocalisent aux mitochondries et favorisent la survenue de la MOMP. Similairement, les fragments N-terminaux d'ATG-5 gagnent les mitochondries et sensibilisent les cellules à l'apoptose, du fait de leur liaison à la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. ATG4D également issu d'un clivage par des caspases exerce aussi une action pro-apoptotique. Un second mécanisme correspond à l'interaction de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 avec Beclin-1, qui est unidirectionnelle dans le sens où elle conduit à l'inhibition de l'autophagie sans qu'il n'y ait d'effet réciproque sur l'apoptose.

Bien que nous ayons mentionné un rôle pro-survie de l'autophagie et antagoniste de l'apoptose, l'inverse a également été décrit, où l'autophagie active l'apoptose. La formation de l'autophagosome peut devenir une plateforme d'activation de la caspase 8 où un recrutement de la caspase 8 s'effectue par une interaction avec p62 et LC3 ou avec ATG5. L'autophagie peut promouvoir l'apoptose en dégradant des inhibiteurs tels que les IAPs (observés chez la drosophile). Par ailleurs, la protéine ATG-12 présente des fonctions pro-apoptotiques de par sa capacité à lier et

inhiber les anti-apoptotiques (Bcl-2 et Mcl-1). ATG-7 facilite la voie apoptotique en induisant une rupture des membranes lysosomales qui comme la MOMP déclenche l'apoptose.

(Booth et al., 2014; Mariño et al., 2014; Tait et al., 2014)

2. Nécroptose et interconnexion à la voie apoptotique

La mort nécrotique ne correspond pas à un type de mort bien défini mais englobe plutôt une variété de mécanismes de mort dont le point commun est un gonflement cellulaire qui s'accompagne d'une perte d'intégrité de la membrane plasmique et du déversement du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire ce qui rend cette mort cellulaire hautement immunogène. La nécrose n'implique aucun mécanisme moléculaire particulier pour être activée mais se produit plutôt de façon passive lors de stress cellulaires tels que des élévations de température, des cycles de congélation-décongélation ou des stress mécaniques. Par ailleurs, des cellules entrées en apoptose ou mort autophagique et n'ayant pas été éliminées par phagocytose finiront par présenter les traits de cellules nécrotiques avec une perte d'intégrité de la membrane plasmique.

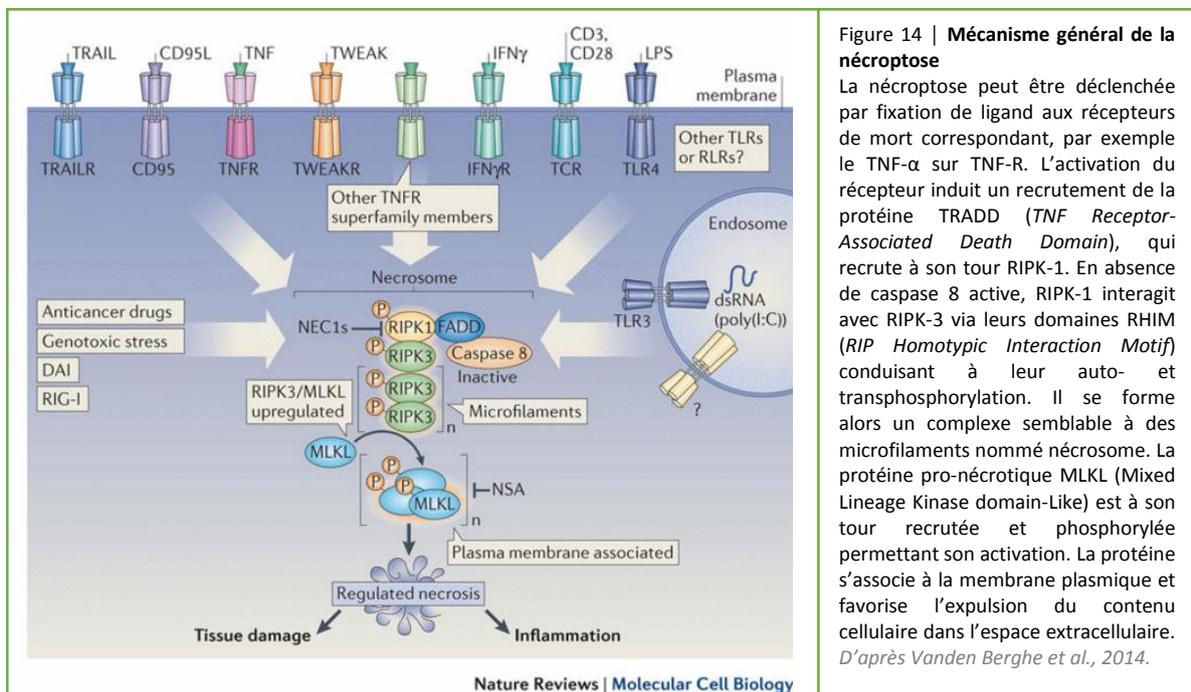


Figure 14 | **Mécanisme général de la nécroptose**

La nécroptose peut être déclenchée par fixation de ligand aux récepteurs de mort correspondant, par exemple le TNF- α sur TNF-R. L'activation du récepteur induit un recrutement de la protéine TRADD (*TNF Receptor-Associated Death Domain*), qui recrute à son tour RIPK-1. En absence de caspase 8 active, RIPK-1 interagit avec RIPK-3 via leurs domaines RHIM (*RIP Homotypic Interaction Motif*) conduisant à leur auto- et transphosphorylation. Il se forme alors un complexe semblable à des microfilaments nommé nécrosome. La protéine pro-nécrotique MLKL (*Mixed Lineage Kinase domain-Like*) est à son tour recrutée et phosphorylée permettant son activation. La protéine s'associe à la membrane plasmique et favorise l'expulsion du contenu cellulaire dans l'espace extracellulaire. D'après Vanden Berghe et al., 2014.

Outre ces phénomènes purement passifs, il a été identifié une forme programmée de nécrose nommée « nécroptose » dont les acteurs moléculaires clés sont les protéines RIPK (*Receptor Interacting Protein Kinase*) (**Figure 14**) (Vanden Berghe et al., 2014). Différents stimuli sont capables de déclencher la nécroptose comme c'est le cas d'interaction ligand – récepteur au

niveau des voies de signalisation des récepteurs de mort, TCR (*T Cell Receptor*), TLR (*Toll Like Receptor*). Les infections virales ou les dommages à l'ADN peuvent également induire le déclenchement de la nécroptose. La voie de signalisation exacte de cette mort cellulaire n'est pas complètement comprise et diffère selon le signal initiateur. Par exemple l'activation du TNF-R provoque un recrutement par la molécule adaptatrice TRADD des deux kinases RIPK1 et RIPK3. Leur interaction via leur domaine RHIM (*RIP Homology Interaction Motifs*) conduit à la formation du nécrosome. Dans le cas d'un engagement du TLR par son ligand, c'est la protéine TRIF qui recrute et active RIPK3. En réponse à une infection virale, c'est la protéine DA1 qui est requise ; alors qu'après des dommages à l'ADN, l'activation de RIPK3 s'effectue au sein d'un large complexe nommé ripoptosome. Une fois l'activation initiale franchie, le complexe RIPK1-RIPK3 se propage amenant à la formation de larges structures filamenteuses. Jusqu'à présent la description de la voie sous-jacente était relativement évasive. Le rôle des ROS et d'une déplétion rapide de l'ATP cellulaire furent proposés comme mécanismes permettant à terme la mort d'une cellule entrée en nécroptose. Deux protéines candidates : PGAM-5 et Drp-1 semblent intervenir dans ce processus. La phosphorylation de PGAM-5 par RIPK3 lui permet d'activer Drp-1, qui induit alors une fragmentation du réseau mitochondrial, la production de ROS et la nécroptose subséquente. Des travaux plus récents indiquent un mécanisme par lequel RIPK3 phosphoryle et favorise ainsi l'oligomérisation de la protéine MLKL (*Mixte Lineage Kinase Like*). Elle est alors transloquée à la membrane plasmique où elle provoque une perte de son intégrité en perturbant l'homéostasie ionique (Green et Lambi, 2015; Tait et al., 2014).

L'apoptose et la nécroptose semblent correspondre à deux destinées cellulaires distinctes en ce sens que les deux voies ne semblent pas pouvoir s'exécuter simultanément mais restent néanmoins interconnectées par des acteurs moléculaires communs les régulant. Les signaux initiateurs de l'apoptose et de la nécroptose se recoupent, un choix s'effectue en aval faisant bifurquer la réponse cellulaire vers l'une de ces deux voies. Ce choix est dicté par la caspase 8, car sous forme d'homodimère elle induit l'apoptose et sous forme d'hétérodimère avec la protéine FLIP elle inhibe la nécroptose. Par ailleurs sa forme active clive RIK1/3 ainsi que CYLD, protéine qui favorise la formation du nécrosome supprimant la nécroptose. L'engagement d'une réponse nécroptotique requiert une rupture du complexe caspase 8 – FLIP. Cette mort cellulaire se produit donc majoritairement dans un contexte d'inhibition des caspases. Au niveau tumoral, la nécroptose est fréquente du fait des stress environnementaux tels que l'hypoxie, auxquels sont soumises les cellules tumorales. La propriété immunogène de cette mort s'avère être davantage nuisible que

bénéfique car elle favorise le maintien de l'inflammation dans le microenvironnement tumoral recrutant diverses cellules immunes qui participent à la progression tumorale. De plus indépendamment de son effet pro-inflammatoire, la nécroptose (comme la nécrose) provoque la libération de facteurs pro-prolifératifs favorisant directement la progression tumorale (Hanahan et Weinberg, 2011; Tait et al., 2014).

C. La famille Bcl-2

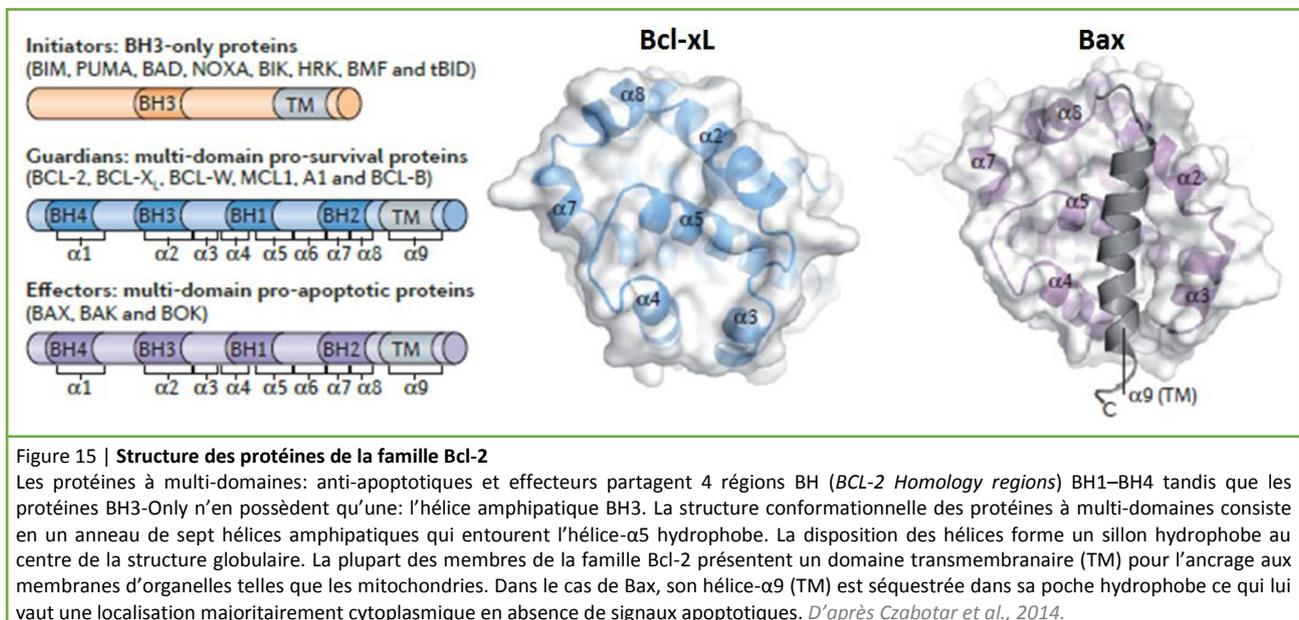
A partir de la description des différentes morts cellulaires que nous venons d'effectuer, plusieurs points critiques peuvent être soulignés. Premièrement, l'apoptose intrinsèque, dépendante des caspases ou non, requiert la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries, or ce processus dépend de l'activation des effecteurs Bax et Bak de la famille Bcl-2. Deuxièmement, l'exécution de l'apoptose extrinsèque peut en partie dépendre d'une action de la protéine pro-apoptotique Bid tronquée, appartenant elle aussi à la famille Bcl-2. Et troisièmement, l'autophagie intervient plus en tant que régulateur positif ou négatif de l'apoptose ce qui dans les deux cas fait intervenir différents membres de la famille Bcl-2.

Ainsi la famille Bcl-2 est un élément central pour le contrôle du déclenchement d'une réponse apoptotique associée ou non à l'autophagie. Or comme je l'ai mentionné précédemment l'une des grandes propriétés acquises par les cellules tumorales correspond à leur faculté à résister à la mort cellulaire. Cela fait fréquemment appel à une dérégulation du fonctionnement de la voie de signalisation Bcl-2. Son intervention à différents niveaux implique une variété de mécanismes moléculaires dont certains ont été succinctement mentionnés ci-dessus. Dans cette partie nous nous proposons de voir plus en détails les modalités d'action des différentes protéines de cette famille dont l'étude apparaît tout à fait pertinente au vu de son implication dans la tumorigenèse.

I. Classification des membres de la famille Bcl-2 sur des bases structurales et fonctionnelles

Les protéines de la famille Bcl-2 exercent soit une régulation négative de l'apoptose soit *à contrario* une régulation positive. Cette distinction fonctionnelle a permis de diviser les membres de la famille Bcl-2 en deux sous-ensembles comprenant soit les éléments anti-apoptotiques soit leurs contreparties pro-apoptotiques. Néanmoins, initialement la classification des membres de cette famille s'effectue sur des bases structurales (**Figure 15**). Les protéines de la famille Bcl-2 sont caractérisées par la présence de domaines BH (*Bcl-2 Homology*), or certaines possèdent 4 domaines BH tandis que d'autres n'en possèdent qu'un. En intégrant ces différents critères, trois groupes de protéines de la famille Bcl-2 se dégagent. Les membres anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-W, Bcl-2 A1/BFL-1, Bcl-B partagent quatre domaines BH comme les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines Bax, Bak et Bok tandis que les protéines BH3-Only telles que Bim, Bid, Puma, Noxa, Bad, Hrk ou Bik, ne possèdent que le domaine BH3 (d'où leur appellation).

Les membres à multi-domaines anti comme pro-apoptotiques possèdent 9 hélices- α et présentent une structure globulaire similaire (**Figure 15**). L'hélice- $\alpha 5$ très hydrophobe est au cœur de la structure et est entourée des autres hélices- α amphipatiques. Cette configuration forme une poche hydrophobe grâce à la distribution des domaines BH1 ($\alpha 4$, $\alpha 5$) et BH2 ($\alpha 7$, $\alpha 8$) d'un côté et BH3 ($\alpha 2$, $\alpha 3$) de l'autre. Au sein de cette poche se trouve un sillon hydrophobe délimité lui-même par les hélices- $\alpha 2$, 3, 4 et 5. Cela constitue l'interface par laquelle ces protéines à multi-domaines lient le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques ou leur propre hélice- $\alpha 9$ C-terminale. Sur la face opposée, les hélices- $\alpha 1$ et $\alpha 6$ sont positionnées de manière parallèle ce qui stabilise les régions BH1 à BH3 et donc la poche hydrophobe. Mcl-1 se distingue des autres protéines à multi-domaines car sa région N-terminale, en amont de la structure globulaire décrite ici, n'est pas structurée.

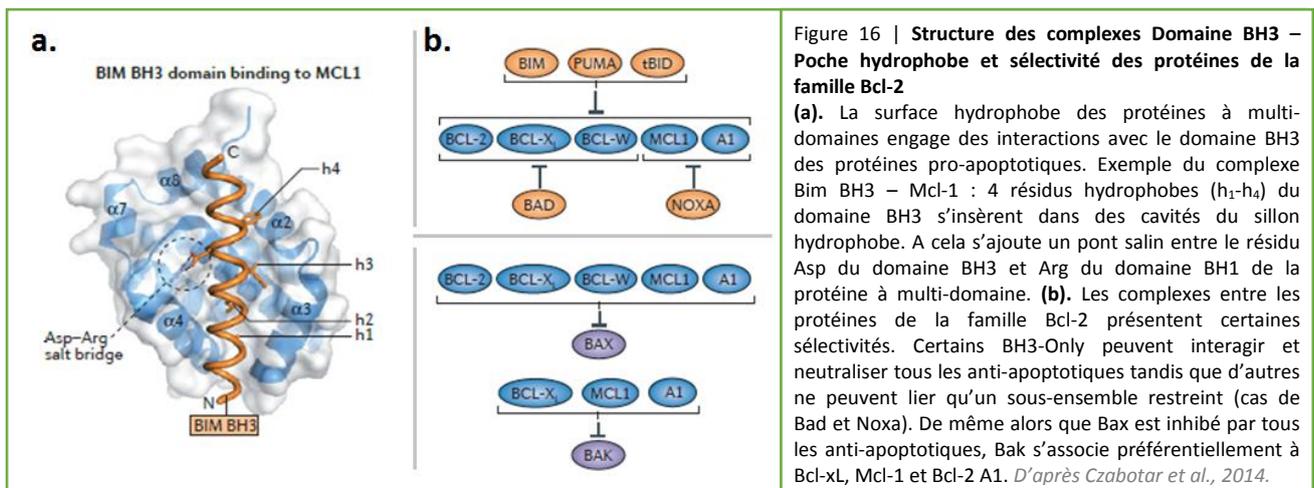


Ce type de structure n'est pas retrouvé chez les protéines BH3-Only, qui sont d'ailleurs pour la plupart intrinsèquement désorganisées, exception faite du BH3-Only Bid. En effet, la protéine présente une conformation qui ressemble à la structure globulaire des membres à multi-domaines. Les résidus clés du domaine BH3 sont ainsi enfouis dans la structure, rendus inactifs, d'où la nécessité du clivage de Bid pour procéder à leurs expositions. Pour les autres protéines BH3-Only, ce n'est que lors d'interaction avec des partenaires protéiques que leur domaine BH3 se conforme en une hélice amphipatique.

(Czabotar et al., 2014; Juin et al., 2013)

II. Structure moléculaire des complexes entre les membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques et sélectivité associée

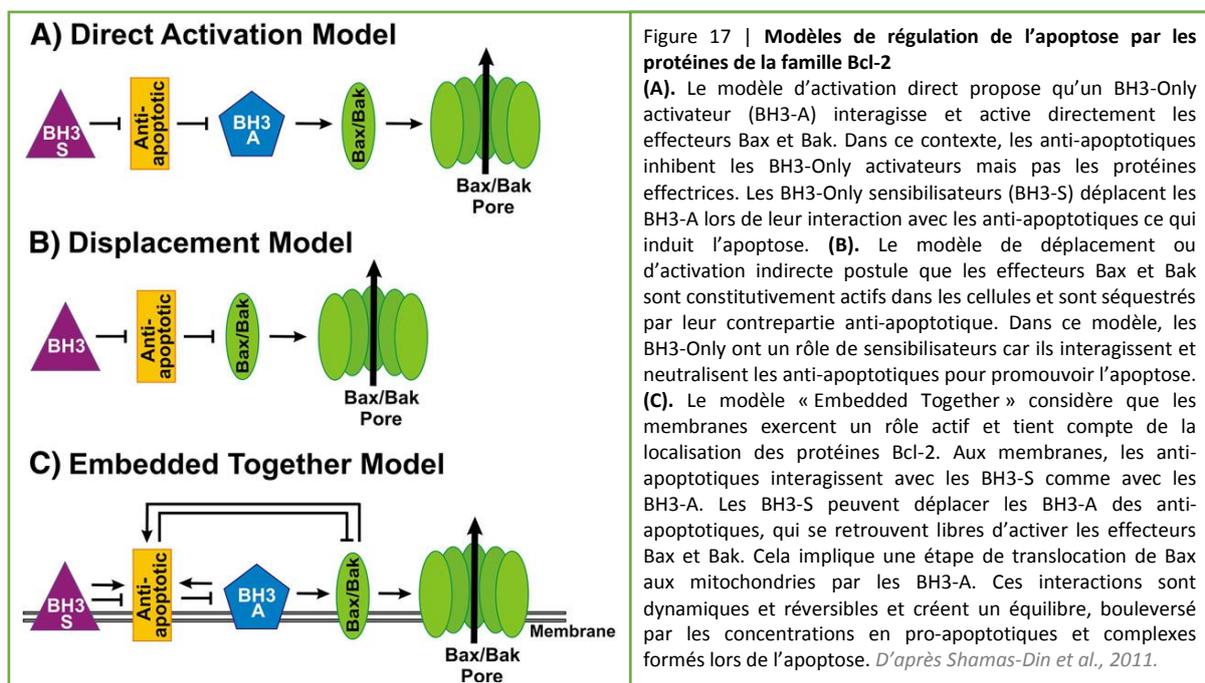
Le rôle de la famille Bcl-2 dans le contrôle de l'intégrité de la MOM et *a fortiori* du déclenchement de l'apoptose repose sur un réseau complexe d'interactions engagées entre les membres anti-apoptotiques et leur contrepartie pro-apoptotique. Les protéines anti-apoptotiques interagissent aussi bien avec les BH3-Only qu'avec les effecteurs. Sur un plan moléculaire ces complexes sont assez semblables (**Figure 16**). Prenons l'exemple d'une interaction entre anti-apoptotique et BH3-Only : l'hélice amphipatique du domaine BH3 de la protéine BH3-Only se loge dans la cavité hydrophobe au niveau du sillon d'un membre anti-apoptotique ce qui implique l'insertion de 4 résidus hydrophobes (h_1, h_2, h_3, h_4) du domaine BH3 dans le sillon hydrophobe ainsi que la formation d'un pont salin entre le résidu Asp conservé du domaine BH3 et un résidu Arg conservé dans le domaine BH1 de la protéine anti-apoptotique. D'autres liaisons moléculaires s'effectuent également au niveau de l'interface entière et contribuent à l'interaction.



Bien que présentant une structure semblable, la séquence protéique des membres Bcl-2 d'une même classe diffère en certains points ce qui conduit à une sélectivité entre les partenaires illustrée sur la **Figure 16**. Alors que les protéines BH3-Only : Bim, Puma et tBid semblent capables de lier tous les anti-apoptotiques, Noxa et Bad sont sélectifs d'un sous-ensemble (Chen et al., 2005). De même, tandis que toutes les protéines anti-apoptotiques peuvent s'associer à Bax, seuls Bcl-xL, Mcl-1 et Bcl-2 A1 sont en mesure de lier Bak (Willis et al., 2005). Pour autant, les protéines anti-apoptotiques présentent une importante plasticité ce qui leur permet d'interagir avec divers domaines BH3.

III. Les modèles d'interactions contrôlant l'activation des effecteurs Bax et Bak

L'activation des effecteurs Bax et Bak est un élément déterminant lors d'une réponse apoptotique afin d'induire la MOMP, or elle se trouve dépendante des interactions engagées entre les membres de la famille Bcl-2. Différents modèles d'interaction entre les partenaires ont été proposés en vue de positionner le rôle de chacune des classes de protéines dans ce processus d'activation de Bax et Bak (**Figure 17**). Il est à noter que les BH3-Only jouent un rôle prépondérant dans cet évènement car le déclenchement de la voie de signalisation apoptotique en réponse à un stress débute avec une élévation du niveau intracellulaire de ces protéines.



1. Modèle d'activation indirecte ou de neutralisation

Dans ce modèle, les effecteurs Bax et Bak sont considérés comme étant constitutivement activés et leur inhibition par interaction avec des membres anti-apoptotiques est requise pour la survie cellulaire. En présence d'un signal apoptotique, les BH3-Only rentrent en compétition avec Bax et Bak pour lier les anti-apoptotiques et provoquent leur déplacement des anti-apoptotiques. Les molécules de Bax et Bak actives ainsi libérées induisent la MOMP. Dans ce modèle, les anti-apoptotiques sont donc définis comme des inhibiteurs des effecteurs et les BH3-Only neutralisent leur action. Les travaux de Willis supportent ce modèle ; il montre notamment la présence de complexes Bak – Mcl-1 et Bak – Bcl-xL dans les cellules saines et leurs ruptures après un stress

cytotoxique par une action neutralisante respectivement des BH3-Only Noxa et Bad (Willis et al., 2005). De pareille manière, un rôle sensibilisateur de Bik a été observé lors d'un stress, associé à une rupture de ces mêmes complexes Bak – Mcl-1 ou Bcl-xL ce qui s'accompagne de l'apparition de Bak activé (Shimazu et al., 2007). Un modèle intéressant « Trap and release » a été proposé dans l'étude de (Gautier et al., 2011) où la seule rupture de complexes Bax – Bcl-xL, dans un modèle de levure, est suffisante pour induire la MOMP. Cela s'effectue sans qu'il y ait recourt à l'action d'autres protéines de la famille Bcl-2, dont les levures sont dépourvues. L'existence de complexes entre Bax activé et Bcl-xL est évoquée, avec la notion supplémentaire que Bcl-xL en liant la forme inactive de Bax induirait un changement conformationnel avec l'exposition du domaine BH3 de Bax et serait donc responsable du passage de Bax à une forme active. Plus récemment, Kaufmann met en évidence la présence d'oligomères de Bak dans différentes lignées de lymphomes et leucémies qui corrèle avec des niveaux élevés d'expression de Bak et ne dépend pas de la présence de BH3-Only. De plus, ces molécules constitutivement actives de Bak présentent une plus forte affinité pour les anti-apoptotiques que la forme inactive (Dai et al., 2015). Par ailleurs, l'activation de Bax et Bak a été détectée dans des contextes de déficience pour les BH3-Only Bim, Bid, Puma et ne semble dépendre que de la neutralisation des anti-apoptotiques auxquels étaient associés les effecteurs (Willis et al., 2007; Zhang et al., 2016).

2. Modèle d'activation directe

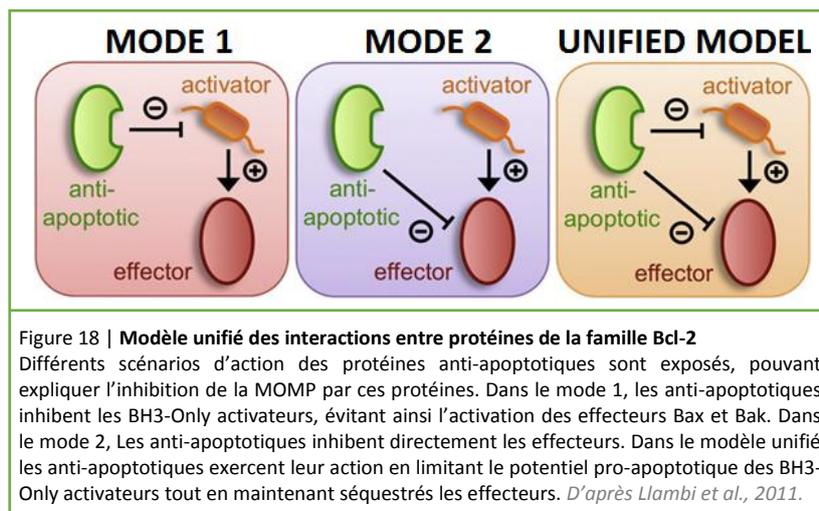
Dans les années 2000, différents travaux remettent en question le postulat précédent. Premièrement, il fut identifié par des approches de co-immunoprécipitation une interaction entre tBid et Bak indiquant que certains BH3-Only ne se limitent pas à des interactions avec les protéines anti-apoptotiques (Wei et al., 2000). Dans cette même étude, l'oligomérisation de Bak est analysée sur des mitochondries isolées de souris sauvages ou déficientes pour Bid, traitées avec un anticorps Anti-Fas pour induire la voie d'apoptose extrinsèque. Ce n'est qu'en présence de Bid que le traitement induit une perte des monomères de Bak et l'apparition d'oligomères, signe d'une activation de Bak. Ces travaux indiquent la nécessité de Bid pour observer une forme active de Bak suggérant que les effecteurs ne sont pas nécessairement constitutivement activés. Deuxièmement, afin de comprendre d'où provient ce modèle, il est nécessaire de faire mention des travaux de Letai qui furent les premiers à évoquer l'existence de deux sous-groupes de protéines BH3-Only (Letai et al., 2002). Des peptides BH3 ont été développés et utilisés comme outil afin d'étudier l'action des différents BH3-Only ; ils correspondent à l'hélice- α de leur domaine BH3. L'ajout de ces peptides sur

mitochondries isolées résulte en un relargage du cytochrome C avec les peptides BidBH3 et BimBH3, associé à l'apparition d'oligomères de Bax ou Bak, mais n'est pas retrouvé avec BadBH3, BikBH3 et NoxBH3. Par ailleurs, les auteurs détectent une compétition de Bad avec Bid pour lier Bcl-2. Celle-ci s'avère unidirectionnelle dans le sens où Bad déplace Bid mais Bid n'est pas capable de déloger Bad de son complexe avec Bcl-2 ; ceci est dû à une différence d'affinité des deux BH3-Only pour Bcl-2. Letai en conclut à l'existence de deux classes de protéines BH3-Only : ceux qui activent les effecteurs, définis en tant que BH3-Only activateurs et ceux qui lient les protéines anti-apoptotiques, délogeant et libérant d'autres BH3-Only activateurs, définis en tant que BH3-Only sensibilisateur. De ce modèle émergent a découlé une succession d'études visant à identifier les BH3-Only activateurs et sensibilisateurs. Les protéines Bim et Puma ont alors été identifiées comme BH3-Only activateurs, en plus de Bid déjà décrit en tant que tel (Cartron et al., 2004; Marani et al., 2002). L'étude de (Kim et al., 2006) est assez représentative du modèle d'activation directe. Elle évoque les protéines BH3-Only Bim, Bid et Puma comme des activateurs de Bax et Bak et leur action est limitée par les anti-apoptotiques qui interagissent avec et les inhibent. Les auteurs définissent un groupe de BH3-Only sensibilisateurs : Bad, Noxa, Bik, Bmf et Hrk dont le rôle est d'inhiber les protéines anti-apoptotiques en rompant ces complexes [BH3-Only activateurs – anti-apoptotiques]. Il en résulte une activation des effecteurs mais qui requiert la présence des BH3-Only car elle n'est plus visible dans des cellules qui en sont déficientes. En outre, dans cette étude aucune interaction n'est détectée entre les anti-apoptotiques et les effecteurs Bax et Bak. C'est en partie grâce aux différents travaux mentionnés ici que découle le modèle d'activation directe. Dans ce modèle Bax et Bak ne sont pas constitutivement actifs et leur activation se fait suite à des interactions avec les BH3-Only activateurs (Bim, Bid, Puma). Les anti-apoptotiques sont positionnés en tant qu'inhibiteur des BH3-Only activateurs et n'interagissent pas avec les effecteurs. Les BH3-Only sensibilisateurs permettent la libération des BH3-Only activateurs et l'activation subséquente des protéines effectrices.

3. Modèle unifié

Les diverses études des interactions entre les protéines de la famille Bcl-2 ont permis d'établir deux modèles distincts expliquant les modalités d'activation des effecteurs Bax et Bak. Cependant, ces modèles se contredisent sur certains points. En effet, tandis que l'un affirme l'existence d'effecteurs constitutivement actifs, l'autre indique la nécessité de protéines activatrices. Par ailleurs, le rôle des BH3-Only est tantôt restreint à une action sensibilisatrice via

des interactions avec les anti-apoptotiques ou tantôt étendu à une action directement activatrice des effecteurs par des interactions avec ces derniers. De plus, tandis que le modèle d'activation indirecte repose sur des interactions entre anti-apoptotiques et effecteurs ce qui empêche leur oligomérisation, le second modèle réfute l'existence de telles associations. L'étude réalisée par Llambi a proposé un 3^{ème} modèle : « modèle unifié » qui semble réconcilier les deux premiers modèles entre eux en considérant qu'aucun des deux n'est nécessairement exclusif (**Figure 18**) (Llambi et al., 2011).



Par des approches de co-immunoprécipitations, les auteurs déterminent 2 modes d'action des anti-apoptotiques : via la séquestration des BH3-Only activateurs, défini comme « le mode 1 » soit via la séquestration des effecteurs, défini comme « le mode 2 ». Les effecteurs apparaissent inactifs dans le mode 1, où les BH3-Only activateurs sont directement séquestrés et ne sont donc pas libres de les activer. En revanche dans le mode 2, Bak apparaît sous une forme active et Bax est inséré aux membranes mitochondriales mais n'est pas pleinement activé. Dans ce mode 2, les BH3-Only activateurs sont libres et peuvent donc activer des molécules effectrices mais ces dernières se retrouvent ensuite directement inhibées par les anti-apoptotiques. Enfin, quel que soit le mode d'inhibition choisi par les anti-apoptotiques, celui-ci est déréprimé par un BH3-sensibilisateur. Le modèle unifié prend donc en compte ces deux modes. Ainsi, les anti-apoptotiques interagissent aussi bien avec les effecteurs que les BH3-Only activateurs pour inhiber le déclenchement de la MOMP. Les effecteurs nécessitent une activation par les BH3-Only activateurs et celle-ci peut survenir grâce à l'action des BH3-Only sensibilisateurs. Du fait d'affinités très élevées pour les protéines anti-apoptotiques, ils vont s'associer à ces dernières bien qu'elles étaient initialement complexées aux effecteurs ou BH3-Only activateurs. Cela permet donc une libération aussi bien des

effecteurs que de leurs activateurs ce qui entraîne leur oligomérisation et la MOMP subséquente. Andrews a proposé un modèle nommé « Embedded together » qui ajoute l'association des protéines Bcl-2 aux membranes comme un élément supplémentaire à prendre en considération (Leber et al., 2007). En effet, une fois intégrées à la MOM certaines protéines de la famille Bcl-2 subissent des changements conformationnels qui peuvent moduler les interactions engagées avec leurs partenaires. Le BH3-Only Bid en est un parfait exemple car ce n'est que lorsqu'il se retrouve associé aux membranes qu'il est en mesure d'interagir avec et d'activer Bax (Lovell et al., 2008). Une étude réalisée en cellules entières utilise des approches de complémentation de fluorescence afin d'analyser les interactions entre les membres de la famille Bcl-2 (Vela et al., 2013). Les résultats obtenus sont en parfait accord avec le modèle unifié car les auteurs détectent aussi bien des interactions entre les anti-apoptotiques Bcl-xL ou Mcl-1 et les BH3-Only : Bim, Puma ou Noxa qu'avec les effecteurs Bax et Bak. Par ailleurs des associations directes sont observées entre les BH3-Only : Bim ou Puma avec les effecteurs Bax ou Bak. Replacé dans un contexte cellulaire ils décrivent une interaction entre Bim et Bax au cytosol avant que le complexe ne soit transloqué aux mitochondries, phénomène retardé par la surexpression de Bcl-xL ou Mcl-1.

IV. Activation des effecteurs Bax et Bak

L'activation de Bax et Bak est l'étape ultime conduisant à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Cela implique donc une localisation des effecteurs au niveau de la MOM. Tandis que Bak est constitutivement retrouvé aux mitochondries où son hélice- $\alpha 9$ est ancrée dans la MOM, Bax *a contrario* est majoritairement cytoplasmique car son hélice- $\alpha 9$ est enfouie dans la cavité hydrophobe de la protéine. Lors d'un signal apoptotique, les effecteurs vont subir des changements conformationnels permettant le passage d'une forme monomérique inactive à oligomérique active et apoptotique (Moldoveanu et al., 2014). Cette reconfiguration structurale peut être déclenchée par l'interaction avec des BH3-Only activateurs (Desagher et al., 1999). Le modèle d'activation de Bax comparé à Bak est mieux décrit et implique des étapes supplémentaires du fait de la différence de localisation des deux protéines. Nous le prendrons donc ici comme exemple, d'autant plus que le modèle d'activation de Bak est relativement semblable à celui de Bax.

1. Rôle central des BH3-Only activateurs dans l'activation et la dimérisation symétrique des effecteurs

L'interaction de Bax avec un BH3-Only activateur s'effectue au niveau de deux sites distincts. Le premier correspond à un site non canonique nommé « rear pocket » impliquant les hélices- $\alpha 1$ et $\alpha 6$ et le second se situe sur la face opposée et correspond à la poche hydrophobe de Bax, considérée comme le site canonique d'interaction (**Figure 19**).

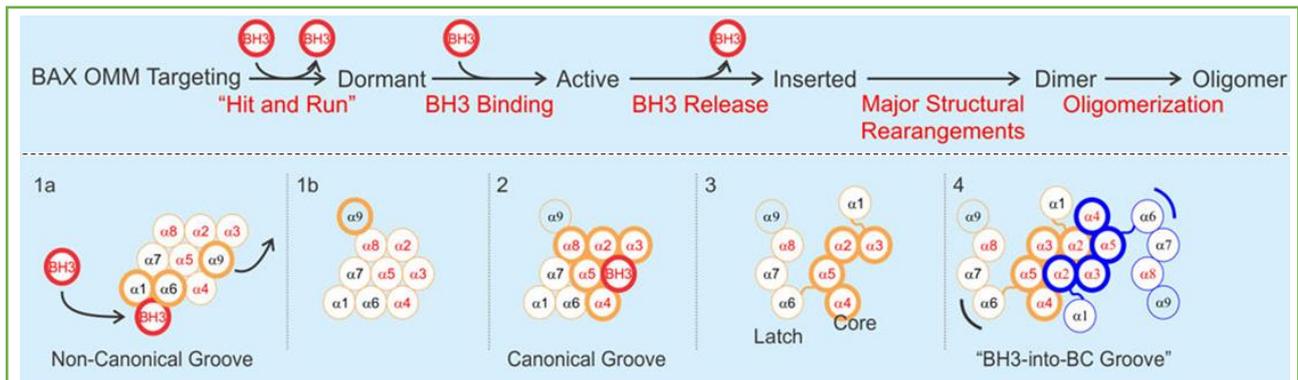


Figure 19 | **Modèle d'activation de la protéine effectrice Bax**

Lors de leur activation, les effecteurs passent successivement par des conformations distinctes avant de s'oligomériser et d'induire la MOMP dont l'exemple est représenté schématiquement pour Bax. **(1a)**. Avant le déclenchement du processus d'activation, la protéine Bax est cytosolique car son hélice- $\alpha 9$ est séquestrée dans sa poche hydrophobe, celle-ci étant délimitée par les hélices : $\alpha 2$ - $\alpha 5$ et $\alpha 8$ (indiquées en rouge). Lors de l'apoptose un BH3-Only (cercle rouge), engage son domaine BH3 dans le site non canonique de Bax comprenant les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 6$, ce qui relargue l'hélice- $\alpha 9$ de la poche hydrophobe. **(1b)**. L'hélice- $\alpha 9$ est à présent sur la face opposée facilitant le ciblage de Bax à la membrane externe mitochondriale. **(2)**. Un BH3-Only se loge ensuite dans le site canonique de Bax induisant des réarrangements conformationnels importants. **(3)**. La protéine Bax se retrouve sous sa conformation « Latch & Core » qui permet sa dimérisation. **(4)**. Structure de Bax activé, adoptée lors d'une dimérisation symétrique. Elle implique l'interaction d'un domaine BH3 d'une 1^{ère} molécule de Bax avec la poche hydrophobe d'une 2nde molécule de Bax, ainsi qu'une interface d'interaction supplémentaire entre les hélices- $\alpha 6$ des deux molécules. *D'après Moldoveanu et al., 2014.*

① De façon séquentielle, il y a tout d'abord interaction d'un BH3-Only avec Bax sous sa forme inactive cytosolique au niveau du site non canonique. Des travaux effectués au laboratoire ont contribué à l'identification de l'hélice- $\alpha 1$ comme site d'interaction du domaine BH3 de Bid et Puma (Cartron et al., 2004; Gallenne et al., 2009). Cette interaction provoque une 1^{ère} série de réarrangements avec notamment la libération de l'hélice- $\alpha 9$ de la poche hydrophobe de Bax qui permet son ancrage dans la MOM et l'exposition de résidus N-terminaux (Czabotar et al., 2014). Des anticorps spécifiques de l'épitope N-terminal de Bax : N20 et 6A7 ont été développés et sont utilisés comme marqueur de l'activation de Bax (Hsu and Youle, 1997; Makin et al., 2001). Une fois ancré aux membranes, Bax présente une poche hydrophobe libre et susceptible de lier un BH3-Only. Dans le cas de Bak, cette étape n'a pas lieu d'être car l'effecteur est déjà ancré aux membranes. Son interaction avec un BH3-Only activateur n'implique en effet que le site de liaison canonique (Brouwer et al., 2014). L'occupation du site non canonique de Bax par un BH3-Only permet d'extraire son domaine transmembranaire (hélice- $\alpha 9$) et d'accélérer la translocation de Bax

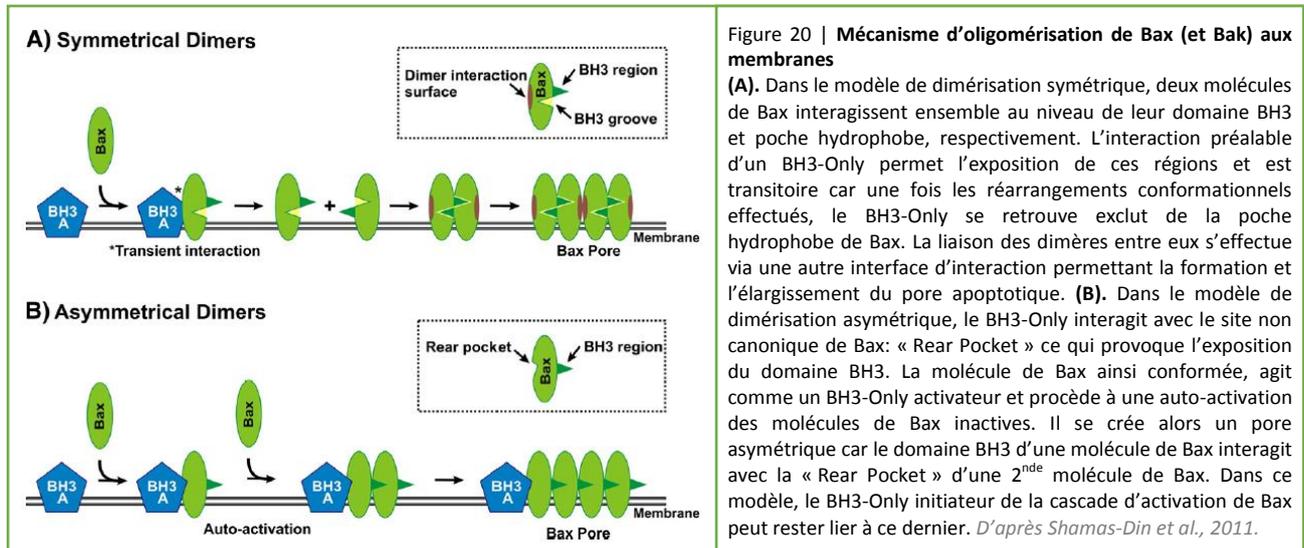
à la MOM. Cependant, des mutations au niveau de ce site n'abrogent pas l'induction de l'apoptose indiquant que cet événement est facultatif pour l'activation de Bax (Peng et al., 2013).

② La 2^{ème} étape correspond donc à la liaison d'un BH3-Only au niveau du site canonique de Bax. Le complexe ainsi formé ressemble fortement à ceux des BH3-Only liés par les anti-apoptotiques. L'insertion du domaine hydrophobe implique cette fois non pas 4 mais 5 régions hydrophobes : h_0 à h_4 ainsi qu'un pont salin au niveau de l'hélice- $\alpha 4$ de Bax sur le résidu R109. L'interaction a pour effet de déstabiliser Bax au niveau de son domaine BH3, ce qui provoque la sortie de ce dernier à l'extérieur de la structure globulaire. Bax adopte alors une conformation bien différente avec un dépliement global de la protéine et l'apparition de deux régions distinctes : un cœur globulaire « core » qui comprend les hélices- $\alpha 2$ à $\alpha 5$ (et possiblement $\alpha 1$) et un domaine loquet « latch » constitué des hélices- $\alpha 6$ à $\alpha 8$ (Czabotar et al., 2014). Une structure semblable « Latch & Core » a été mise en évidence avec l'effecteur Bak (Brouwer et al., 2014). Les interactions ainsi effectuées entre les BH3-Only et effecteurs sont de nature transitoire. En effet, une interaction stable entre les deux perturberait la formation des dimères. Les BH3-Only, grâce à un mode d'action de type « Kiss and Run » sont ainsi capables d'activer de multiples dimères d'effecteurs (Shamas-Din et al., 2011).

③ La dernière étape correspond à l'oligomérisation de Bax (**Figure 19-20A**). En réalité, le cœur globulaire n'est autre que la poche hydrophobe de Bax. Deux molécules de Bax présentant une structure « Latch & Core » vont s'associer ensemble pour générer un dimère symétrique. C'est-à-dire qu'une molécule de Bax va recevoir dans sa poche hydrophobe l'hélice- $\alpha 2$ (domaine BH3) d'une seconde molécule de Bax créant une interaction de type « domaine BH3 – Poche hydrophobe ». A partir de ces dimères s'effectue un processus d'oligomérisation. Il se crée entre deux dimères une interface de type $\alpha 6$ - $\alpha 6$ qui permet de lier les dimères entre eux (Bleicken et al., 2014; Czabotar et al., 2013; Dewson et al., 2009).

④ Une fois l'oligomère formé, il y a perforation de la membrane externe mitochondriale. Le mécanisme qui se cache derrière ce processus reste mal défini. Les homo-dimères présentent une surface plane formée des hélices- $\alpha 4$ et $\alpha 5$ qui possèdent de multiples acides aminés aromatiques. Czabotar a évoqué l'hypothèse que cette interface repose sur la MOM ce qui s'accompagne d'une insertion des chaînes secondaires de ces résidus aromatiques entre les lipides membranaires (Czabotar et al., 2013, 2014). Une surcharge est alors ressentie au niveau du feuillet lipidique

externe, ce qui se traduit par l'apparition de tensions membranaires et courbures. A terme, il y a génération de cassures stables dans la bicouche lipidique qui correspondent aux pores Bax ou Bak protéolipidiques (décrit dans la partie II-1-d) (Bleicken et al., 2013).



2. Rôle coopératif des BH3-Only avec les effecteurs pour induire la formation d'oligomères asymétriques

Un modèle alternatif d'activation de Bax se base sur la capacité d'auto-activation des pro-apoptotiques (Ruffolo et Shore, 2003; Tan et al., 2006). Dans ce modèle, un 1^{er} monomère inactif de Bax est lié par un BH3-Only successivement au niveau de ses deux sites : canonique ou non, générant une molécule de Bax active avec notamment exposition du domaine BH3 (**Figure 20B**). La molécule de Bax active devient par conséquent l'équivalent d'un BH3-Only. Il va pouvoir fixer le site non canonique d'une autre molécule de Bax qui à son tour va être activée et faire de même *etc.* C'est un processus d'auto-activation de Bax qui induit une propagation asymétrique de l'oligomère où peut d'ailleurs rester fixé le BH3-Only initiateur (Shamas-Din et al., 2011).

3. La MOMP survient-elle systématiquement en présence d'oligomères de Bax et Bak ?

La présence des effecteurs sous leur forme oligomérisée dans les cellules est synonyme du déclenchement de la MOMP. Cela est vrai la plupart du temps, néanmoins certaines études ont pointé du doigt l'existence de dimères ou oligomères, sans qu'ils soient nécessairement associés à la survenue d'une MOMP. Les travaux de Dive indiquèrent que l'exposition de la région N-terminale de Bax, sa translocation mitochondriale ainsi que la formation de dimères/complexes étaient autant de paramètres s'avérant insuffisants pour induire l'apoptose dans leur modèle cellulaire de

neuroblastome résistant au paclitaxel. De plus, l'apparition de dimères/complexes de Bax survient dans les cellules non traitées lors d'une perte d'attachement mais ne se traduit pas par une perte de viabilité (Makin et al., 2001). Cette étude fait écho à celle de Kaufmann où des oligomères de Bak sont détectés de façon constitutive dans différentes lignées tumorales (Dai et al., 2015). Très récemment Gavathiotis a identifié par des approches biochimiques et structurales des dimères inactifs de Bax (Garner et al., 2016). Les auteurs proposent un mécanisme supplémentaire de contrôle de l'activation de Bax dans les cellules saines. Les dimères sont asymétriques permettant une auto-inhibition des deux molécules de Bax liées car l'une se voit incapable d'effectuer un changement conformationnel en N-terminal tandis que l'autre n'est pas en mesure d'extraire son hélice- $\alpha 9$ de sa poche hydrophobe. Il semblerait qu'il y ait une transition dynamique de la forme monomérique de Bax à cette forme dimérique inactive. Lors d'une élévation de BH3-Only par un stress donné, ces derniers seront tout de même amenés à rencontrer des monomères de Bax dans les cellules.

4. Le rôle des BH3-Only activateurs est-il vraiment redondant dans l'activation de Bax et Bak ?

Letai fut l'un des premiers à identifier un rôle différentiel des BH3-Only, introduisant le concept de deux sous-classes de protéines BH3-Only : les sensibilisateurs uniquement capables de lier les anti-apoptotiques et les activateurs capables de lier l'ensemble des protéines à multi-domaines anti comme pro-apoptotiques (Letai et al., 2002). Il poursuivit ces travaux afin de déterminer si au sein même de la classe des BH3-Only activateurs, toutes les protéines exerçaient un rôle redondant dans l'activation de Bax et Bak. Grâce à l'utilisation de peptides BH3 de Bim ou Bid ou directement via l'utilisation des protéines recombinantes, il mit en évidence un rôle différentiel des deux BH3-Only, où Bid active préférentiellement Bak et Bim plutôt Bax (Sarosiek et al., 2013a). Cependant il semble y avoir controverse en la matière car l'étude de (Hockings et al., 2015) remet en question la pertinence d'une utilisation de peptides BH3 ou de protéines recombinantes tronquées. Les auteurs utilisent à la place des protéines Bid chimériques où le domaine BH3 de Bid est remplacé par celui des autres BH3-Only. Bid étant le seul BH3-Only à être structuré, les protéines chimériques sont stables. Une comparaison de leur action à celle des peptides BH3 est réalisée sur mitochondries isolées (mesure de la libération du cytochrome C) et les résultats divergent selon le modèle. Aucune activation préférentielle de Bax ou Bak n'est observée entre Bid et les chimères Bid^{BH3Bim} ou Bid^{BH3Puma}. En outre, l'ensemble des BH3-Only, exception faite de Bad et Noxa se comportent comme des activateurs. Pourtant, une étude très récente de (Lopez

et al., 2016), met en évidence une dépendance des BH3-Only Bid et Puma pour Bak en accord avec les travaux de Letai. Cette sélectivité est intrinsèque aux protéines BH3-Only car elle dépend du domaine BH3. L'échange du domaine BH3 de Bid ou Puma par celui de Bim (chimères Bid^{BH3Bim} et Puma^{BH3Bim}) fait disparaître leur sélectivité pour Bak.

V. Apoptose uniquement dépendante de Bak

Le rôle des effecteurs Bax et Bak est défini comme étant redondant car une fois activés tous deux exercent une action de perméabilisation de la MOM. Pourtant il existe certains exemples d'apoptose strictement restreinte à l'un des deux effecteurs. Nous nous intéresserons plutôt ici à des cas d'apoptose dépendante de Bak.

Une des premières études à avoir souligné un phénomène de dépendance à Bak implique une protéine de la famille Bcl-2 : Bcl-xS issu de l'épissage alternatif de Bcl-xL. A l'inverse de Bcl-xL, Bcl-xS, en se relocalisant aux mitochondries exerce une fonction pro-apoptotique. Cette action requiert l'effecteur Bak mais pas Bax. En effet, tandis que sa surexpression dans les MEFs Bax^{-/-} induit la mort des cellules, celle dans les MEFs Bak^{-/-} (au même titre que dans les MEFs Bax^{-/-}/Bak^{-/-}) reste sans conséquence notable (Lindenboim et al., 2005). Ces travaux ont été complétés par l'étude de (Plötz et al., 2012) qui a davantage caractérisé cette mort induite par Bcl-xS et dépendante de Bak. Il se trouve que Bcl-xS interagit avec VDAC-2 rompant les complexes Bak – VDAC-2 qui antagonisent avec les fonctions pro-apoptotiques de Bak. Le mécanisme de sélectivité de Bak, observé ici, semble indépendant des autres partenaires canoniques de Bak. Néanmoins ce n'est pas toujours le cas, car de nombreux exemples de la littérature présentent la sélectivité de Bak versus Bax comme dépendante de la modulation de certains membres de la famille Bcl-2.

Divers stimuli (agent pharmacologique, virus, toxine bactérienne) agissent en induisant une dégradation protéosomale de Mcl-1 qui s'accompagne d'une voie apoptotique dépendante de Bak (Chu et al., 2012; Du et al., 2010; Gratas et al., 2014; Miller et al., 2013; Urban et al., 2008). Par exemple, le traitement témozolomide induit une apoptose dépendante de Bak dans les lignées de glioblastome U251 et LN18, car une déplétion de Bak mais pas Bax par ARN interférence les rend résistantes. De plus, l'inhibition pharmacologique des anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-W (mais pas Mcl-1) n'améliore pas la réponse au traitement, *a contrario* de la déplétion de Mcl-1. Le mécanisme d'action de la molécule implique la dégradation de Mcl-1 (Gratas et al., 2014). L'étude de Miller met en évidence une dépendance à Bak dans la réponse de tumeurs humaines

mammaires (Lignées SK-BR3 et T-47D) au paclitaxel (Miller et al., 2013). Le traitement provoque une dégradation protéosomale de Mcl-1 induite par l'activité de CDK (Cyclin Dependant Kinase) activées lors de l'arrêt mitotique. Leur inhibition pharmacologique par la roscovitine bloque la dégradation de Mcl-1 et rend résistantes les cellules tumorales à la mort induite par le paclitaxel. Dans ce cas-ci, la dégradation de Mcl-1 par le paclitaxel provoque une perte des complexes Bak – Mcl-1 ce qui explique que la mort soit dépendante de Bak. Enfin, une étude de (Zhang et al., 2012) indique que la mort, dépendante de Bak, des cellules d'adénocarcinome pulmonaire (ASTC-a-1), induite par le traitement resveratrol induit également une dégradation de Mcl-1, mais semble nécessiter davantage la présence du BH3-Only Bim pour avoir lieu. En effet, sa déplétion par ARN interférence abroge l'activation de Bak et la mort cellulaire.

Par ailleurs, les stimuli qui induisent l'activation et le clivage de Bid conduisent également à une mort dépendante de Bak (Cartron et al., 2003; Guo et al., 2015). Il a été identifié un mécanisme de sélectivité de Bax ou Bak dépendant du stimulus apoptotique initial. La liaison du ligand Fas à son récepteur de mort induit l'activation de la caspase 8 qui génère une forme tronquée de Bid de 15kDa : p15-tBid. Ce dernier induit préférentiellement la mort des cellules par Bak. Le granzyme B induit un clivage différentiel de Bid qui produit le fragment p13-tBid. Ce dernier induit la mort des cellules majoritairement via Bax (Cartron et al., 2003). Par ailleurs, les lignées de cancer colorectal HCT116 et DU145 rendues déficientes pour Bax et p53 sont sensibles à la mort induite par la génistéine (Guo et al., 2015). D'un point de vue mécanistique, la molécule semble inactiver la voie Akt et induire ainsi l'activation de Bid et son clivage qui s'avère indispensable à l'activation de Bak induite sous traitement.

L'ensemble de ces travaux suggère que la dépendance de la mort cellulaire à l'un des effecteurs est définie en amont selon les stimuli apoptotiques reçus, leurs mécanismes d'actions et le contexte cellulaire. Il ne semble pas être question ici d'action non redondante des effecteurs mais plutôt du degré d'implication des membres de la famille Bcl-2 dans le mécanisme d'action orchestré par un signal pro-apoptotique donné. Pour rappel, l'inhibition de Bak dans les cellules est principalement restreinte à Mcl-1 et Bcl-xL et son activation semble être effectuée de façon préférentielle par Bid et Puma. Il n'est donc pas étonnant que des signaux apoptotiques régulant l'activité de ces deux protéines Mcl-1 et Bid amènent à une mort dépendante de l'activation de Bak. Ce choix d'un effecteur plutôt que d'un autre repose donc une fois de plus sur la notion de spécificité des interactions qu'engagent les protéines de la famille Bcl-2 entre elles.

VI. Régulation de l'activation des effecteurs Bax et Bak par le ciblage intracellulaire des protéines de la famille Bcl-2

Il est évident que le principal élément de régulation de l'activation de Bax et Bak repose sur le jeu d'interaction entre les trois classes de protéines de la famille Bcl-2. Cependant comme Andrews l'avait évoqué dans son modèle d'interaction « Embedded Together », les interactions des protéines de la famille Bcl-2 avec les membranes contribuent également au contrôle de l'activation des effecteurs, qu'il est donc nécessaire de prendre en compte.

Les membres de la famille Bcl-2 possèdent pour la plupart une séquence d'ancrage C-terminale qui constitue un domaine transmembranaire (*TMD : Transmembrane Domain*) d'insertion aux membranes. Ce type de séquence d'adressage ne se restreint pas uniquement à un ciblage mitochondrial ce qui explique que certains membres de la famille Bcl-2 puissent être localisés également au réticulum endoplasmique ou au niveau de l'enveloppe nucléaire. La séquence comprend 15 à 22 acides aminés ce qui permet aux protéines la possédant de traverser une fois la membrane de l'organelle cible. L'extrémité C-terminale de la séquence d'ancrage se retrouve dans le lumen de l'organelle tandis que l'extrémité N-terminale, comportant les domaines protéiques fonctionnels, est cytosolique. La spécificité de ciblage dépend pour beaucoup de l'hydrophobicité du TMD et des séquences juxtaposées de part et d'autre. Étant donné la position de la séquence d'ancrage en C-terminal, le ciblage des protéines de la famille Bcl-2 ne peut s'effectuer qu'après achèvement de leur traduction protéique. Selon le niveau d'hydrophobicité du TMD, il pourra y avoir nécessité de chaperonne pour les étapes de ciblage et insertion membranaire. (Lindsay et al., 2011; Schinzel et al., 2004)

1. Localisation des membres de la famille Bcl-2 en absence de stress

a. Ciblage des protéines anti-apoptotiques

La protéine anti-apoptotique Bcl-2 se localise aux membranes des mitochondries, RE ou de l'enveloppe nucléaire (**Figure 21**) (Lithgow et al., 1994). Bcl-xL, Bcl-w ou Bcl-B présente un ciblage davantage spécifique à la MOM (Schinzel et al., 2004). Tandis que Bcl-2 est systématiquement retrouvé lié aux membranes d'organelles intracellulaires, l'anti-apoptotique Bcl-xL présente également une forme soluble cytoplasmique (Hsu et al., 1997; Yao et al., 2015). Dans le cas de Bcl-w, son TMD est emprisonné dans sa poche hydrophobe conduisant donc à une localisation

majoritairement cytoplasmique de cet anti-apoptotique en absence de stress (Hinds et al., 2003; O'Reilly et al., 2001).

Concernant Mcl-1, sa localisation diffère en partie de celle des autres anti-apoptotiques. Mcl-1 est la seule protéine de la classe des anti-apoptotiques à posséder une extension de 170 acides aminés en N-terminal. Cette séquence comprend 2 domaines PEST, riches en Proline, E : Acide glutamique, Sérine et Thréonine ce qui lui vaut d'avoir une demi-vie extrêmement courte (Yang et al., 1995). De nombreux sites de phosphorylation sont présents dans cette séquence pouvant soit stabiliser Mcl-1 soit au contraire induire le recrutement des E3 Ubiquitine-ligase : MULE (*Mcl-1 Ubiquitin Ligase*) ou β -TRCP qui le cible à la dégradation protéosomale. En outre des sites de clivage pour les caspases sont également compris dans cette séquence. Il a été mis en évidence un rôle essentiel de la région N-terminale de Mcl-1 pour sa localisation cellulaire (Germain et Duronio, 2007; Perciavalle et al., 2012) . Elle intervient à la fois dans le ciblage de Mcl-1 à la MOM comme dans son ciblage à la matrice mitochondriale. La phosphorylation en sérine 162 est indispensable à la MOM, en son absence Mcl-1 se retrouve localisé au noyau (Thomas et al., 2012). Ainsi la localisation de Mcl-1 est en grande partie dépendante des signaux de phosphorylation / déphosphorylation déclenchés dans les cellules.

La différence de ciblage entre Bcl-2/Mcl1 (MOM/RE) et Bcl-xL (MOM) a été attribuée à une répartition différente de l'hydrophobicité dans le TMD. Globalement, en divisant en deux le TMD, l'hydrophobicité est très élevée dans la moitié C-ter du TMD dans le cas de Bcl-xL alors qu'elle l'est davantage dans la moitié N-ter du TMD pour Bcl-2/Mcl-1 (Schinzel et al., 2004). Ce n'est pas l'unique cause du ciblage différentiel entre ces protéines car les résidus présents dans les régions encadrant le TMD sont également impliqués. La présence de résidus basiques chargés positivement tels que l'arginine ou la lysine augmente la polarité autour du TMD de Bcl-xL et favorise le ciblage mitochondrial or Bcl-2 en est dépourvu (Kaufmann et al., 2003). Les structures en solution de Bcl-2 comme Bcl-xL ont été déterminées en absence du TMD suggérant que celui-ci les rendait insoluble de par son hydrophobicité. Il a alors été proposé la nécessité d'une intervention de protéines chaperonnes pour éviter l'agrégation de Bcl-2 et Bcl-xL et permettre leur ciblage aux compartiments auxquels ils sont destinés. Bcl-2 interagit avec TOM₂₀ ce qui favoriserait son insertion mitochondriale. Le ciblage de Bcl-xL, en revanche, est indépendant des protéines TOM. La protéine FKBP38 (*Mitochondrial FK506-Binding Protein 38*) interagit avec Bcl-2 et Bcl-xL et contribue à leur ciblage mitochondrial, elle a de ce fait été considérée comme un récepteur mitochondrial pour ces deux anti-apoptotiques (Germain et Shore, 2003).

b. Ciblage des protéines pro-apoptotiques effectrices

Tandis que Bak est présent dans les cellules saines de manière prépondérante et constitutive aux mitochondries, Bax est davantage localisé au cytoplasme (**Figure 21**) (Hsu et al., 1997), même si une fraction est également retrouvée à la MOM. Les deux effecteurs ont également été détectés aux membranes du RE (Scorrano et al., 2003; Zong et al., 2003).

Concernant Bax, les deux régions N-terminale comme C-terminale sont impliquées dans son ciblage mitochondrial. La région N-ter de Bax est capable d'interagir avec TOM₂₂ participant ainsi au ciblage mitochondrial de Bax, or pour rappel cette région n'est pas accessible dans la structure des monomères Bax inactifs. L'action de TOM₂₂ se limite à une simple contribution car la présence des protéines TOM est facultative et Bax est capable de s'insérer dans les membranes de liposomes, constituées de lipides mitochondriaux mais dénuées de toutes protéines (Kuwana et al., 2002; Sanjuán Szklarz et al., 2007). La protéine chaperonne 14-3-3 interagit avec Bax au cytosol. Sa liaison relie les extrémités N et C-terminales de Bax bloquant un éventuel changement conformationnel de Bax cytosolique, en empêchant l'exposition de la région N-ter et le relargage du TMD (Nomura et al., 2003). Le résidu proline en position 168 joue un rôle clé dans la localisation de Bax car en configuration trans, la séquence d'ancrage C-ter se retrouve placée dans la poche hydrophobe de la protéine rendant impossible son ciblage mitochondrial. L'interaction du TMD de Bax avec sa poche hydrophobe est principalement hydrophobe excepté la présence d'une liaison hydrogène entre le résidu Aspartate en position 98 (hélice- α 4) et Sérine 184 (hélice- α 9). La mutation sérine 184 en alanine induit un ciblage constitutif de Bax S184A à la MOM (Nechushtan et al., 1999; Suzuki et al., 2000). Néanmoins cela semble nécessiter la présence de protéines partenaires à la MOM. En effet, l'étude de (Ma et al., 2014), indique que dans des cellules déficientes pour VDAC-2 (*Voltage-Dependent Anion Channel-2*), ce mutant de Bax n'est plus localisé aux mitochondries. Les protéines VDAC, et plus particulièrement VDAC-2, ont été identifiées comme interactants de Bax, impliquant une liaison au niveau de sa région C-terminale. Le rôle de telles interactions a été investigué et il apparait que VDAC-2 est indispensable pour le ciblage mitochondrial de Bax dans les cellules saines (Ma et al., 2014; Shimizu et al., 1999; Yamagata et al., 2009).

A l'inverse de Bax, la protéine Bak est constitutivement présente aux mitochondries. Néanmoins cela semble ici aussi faire intervenir des partenaires protéiques à la MOM. En effet, comme Bax, Bak interagit avec VDAC-2 au niveau de sa région C-terminale. Les cellules déficientes en canal VDAC-2 ne possèdent plus de Bak aux mitochondries. Donc dans ce cas-ci, l'interaction est

également indispensable au ciblage de Bak à la MOM dans les cellules saines (Lazarou et al., 2010; Ma et al., 2014; Shimizu et al., 1999; Yamagata et al., 2009).

c. Ciblage des protéines pro-apoptotiques BH3-Only

Les protéines BH3-Only sont les initiateurs de l'activation de Bax et Bak et du déclenchement de la MOMP. De ce fait leur localisation dans les cellules saines est régulée, notamment leur présence aux mitochondries où elles exercent leur rôle pro-apoptotique. Selon les BH3-Only, leur ciblage mitochondrial peut dépendre de leur domaine C-terminal ou des interactions engagées avec des protéines Bcl-2 mitochondriales. Les domaines C-terminaux de Bik, Bim, Puma, Noxa, Bmf présentent les propriétés relatives à une séquence C-ter d'ancrage aux membranes (Wilfling et al., 2012). Dans les cellules saines, l'expression des BH3-Only limite leur présence aux mitochondries et les anti-apoptotiques neutralisent leur fonction pro-apoptotique à ce compartiment. La protéine Bid est synthétisée sous une forme inactive cytosolique. La protéine Bad est sujette à des phosphorylations par des kinases « pro-survie » au niveau de plusieurs résidus sérine favorisant son interaction avec la chaperonne 14-3-3 maintenant le BH3-Only au cytosol. Les kinases AKT/PKB (voie PI3K) et Raf-1 (voie MAPK) phosphorylent les sérines 112 et 135, la kinase PKA phosphoryle celle en position 155 (Datta et al., 2000). Bim et Bmf interagissent respectivement avec des constituants des complexes moteurs : dynéine microtubulaire avec DLC-1/LC-8 ou myosine-V associé au cytosquelette avec DLC-2. Cela induit une localisation de ces deux BH3-Only au cytosquelette des cellules saines (Schinzel et al., 2004). (Figure 21).

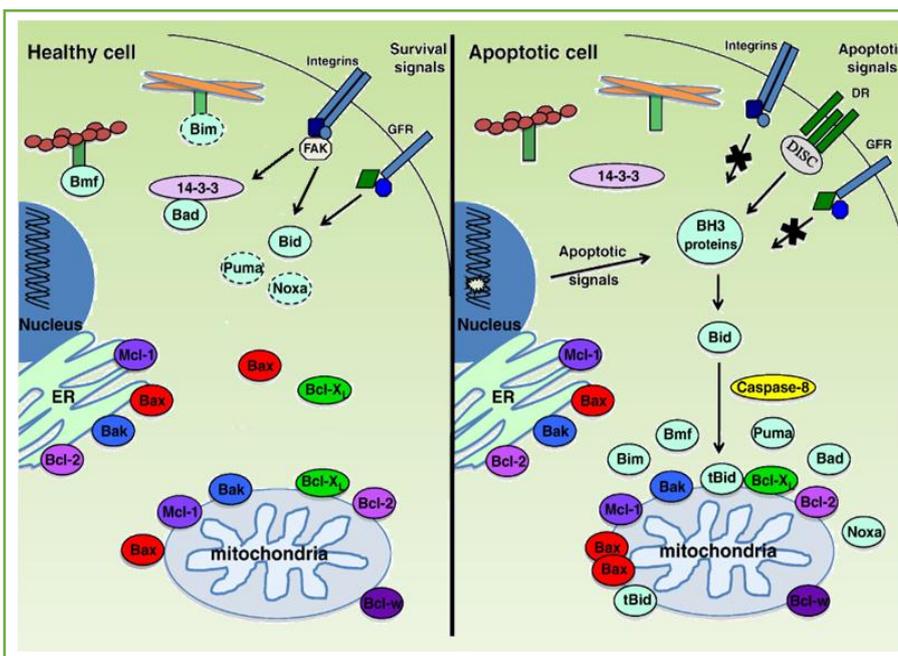


Figure 21 | Localisation des protéines de la famille Bcl-2

Dans les cellules saines, les protéines de la famille Bcl-2 sont retrouvées au niveau du cytoplasme et des membranes mitochondriales ou du réticulum endoplasmique (ER). Les membres anti-apoptotiques sont majoritairement localisés à la membrane externe mitochondriale (MOM), où ils interagissent et inhibent les pro-apoptotiques effecteurs Bax et Bak. Tandis que Bcl-2 est systématiquement retrouvé inséré aux membranes d'organels, les autres anti-apoptotiques, tels que Bcl-xL, présentent une forme soluble au cytoplasme. L'effecteur Bak est principalement localisé à la MOM, tandis que Bax est retrouvé de façon prédominante au cytosol. Parmi les BH3-Only, certains sont exprimés et maintenus inactifs au cytosol par association à des protéines du cytosquelette ou d'autres partenaires tels que 14-3-3. A contrario, d'autres BH3-Only sont très faiblement exprimés comme Bim, Puma, Noxa et peuvent être inhibés par interaction avec des protéines anti-apoptotiques aussi

bien au cytosol qu'à la MOM. Dans les cellules apoptotiques, il y a une forte induction des BH3-Only, qui permettent une relocalisation de Bax aux mitochondries, et qui sont eux-mêmes relocalisés à ce compartiment. Diverses modifications post-traductionnelles peuvent intervenir dans le ciblage des protéines BH3-Only aux mitochondries. D'après Lindsay et al., 2011.

2. Relocalisation des protéines de la famille Bcl-2 lors d'un stress apoptotique

Les premières évidences de changement d'une redistribution des protéines de la famille Bcl-2 lors d'un stress remonte à la fin des années 90. Une étude réalisée par Youle indiqua une relocalisation des protéines Bax et Bcl-xL cytosoliques aux mitochondries après irradiation ou traitement staurosporine de cellules hématopoïétiques (Hsu et al., 1997).

a. Changement de localisation des anti-apoptotiques

Parmi les anti-apoptotiques, Bcl-xL et Bcl-w apparaissent tous deux davantage recrutés aux mitochondries lors d'un stress cellulaire. Le ciblage mitochondrial de Bcl-xL semble dépendre d'interaction avec ses contreparties pro-apoptotiques (Aranovich et al., 2012). Il en est de même avec Bcl-w car c'est l'interaction avec des protéines BH3-only qui permet son ciblage à la MOM. En effet, leur association au niveau de la poche hydrophobe déloge le TMD de Bcl-w provoquant sa relocalisation mitochondriale (Denisov et al., 2003). Dans le cas de Mcl-1, il ne s'agit pas d'une relocalisation mais plutôt d'une augmentation de sa dégradation protéosomale qui l'amène à disparaître de la MOM. Il y a notamment une action des ubiquitines-ligases : MULE, β -TRCP, Fbw7 après phosphorylation de Mcl-1 ou un clivage par les caspases ou directement par le granzymeB (Inuzuka et al., 2011; Nakajima et al., 2016; Thomas et al., 2010).

b. La localisation mitochondriale des effecteurs lors d'un stress régit leur activation et oligomérisation : Rôle de la translocation mitochondriale de Bax et des interactions engagées au cytosol et à la MOM

La protéine effectrice Bax est transloquée aux mitochondries lors d'un signal pro-apoptotique. Cela implique nécessairement un changement conformationnel de Bax pour extraire aussi bien la région N-terminale que le domaine transmembranaire de sa structure globulaire. Ce changement conformationnel (décrit en partie III-4-a) est induit par la liaison de BH3-Only activateurs. D'autres protéines peuvent y participer. La région N-ter peut notamment être clivée par les protéases à cystéine : calpaïnes (de façon dépendante des ions Ca^{2+}) après un stress génotoxique ce qui génère une forme clivée de Bax (p18) très apoptotique (Gao et Dou, 2000; Toyota et al., 2003; Wood et al., 1998).

Le changement conformationnel et le ciblage mitochondrial de Bax durant un stress peut être modulé par des partenaires interagissant au niveau des régions N- ou C-terminales de Bax. La protéine chaperonne 14-3-3, qui maintient Bax au cytosol, est clivée par les caspases permettant aux réarrangements structuraux de Bax de se produire (Nomura et al., 2003). La protéine de

réparation des dommages à l'ADN Ku70 interagit avec Bax au cytosol et bloque son activation (Hada et Kwok, 2014; Hada et al., 2016). Il en est de même avec le polypeptide anti-apoptotique Humanine (Guo et al., 2003). En revanche, la protéine Bif-1 (Bax-Interacting Factor) promeut le changement conformationnel de Bax et son activation lorsqu'ils interagissent ensemble. Un stress tel qu'une privation en cytokine (interleukine-3) augmente leur association et accroît le niveau de mort des cellules hématopoïétiques pré-B (Cuddeback et al., 2001). Par ailleurs, tandis que VDAC-2 était indispensable à la présence d'une fraction de Bax aux mitochondries dans les cellules saines, il semble que son absence n'altère pas le phénomène de translocation mitochondrial de Bax induit par un stimulus apoptotique. Lorsqu'il est présent il y a même nécessité d'une rupture de ces complexes VDAC-2 – Bax pour permettre son oligomérisation (Ma et al., 2014). Cependant le rôle de VDAC-2 dans l'insertion de Bax à la MOM est controversé. En effet, une étude de (Yamagata et al., 2009) stipule que lors d'un stress, Bax est incapable de se relocaliser aux mitochondries et de s'y oligomériser en absence de VDAC-2.

L'activation de Bak n'est pas régulée comme dans le cas de Bax par un phénomène de translocation mitochondriale car l'effecteur y est déjà présent. Cependant, sa présence et son activation aux mitochondries peuvent être modulées par les interactions engagées directement à la MOM. Si la nécessité de VDAC-2 pour la localisation de Bak aux mitochondries en absence de stress semble indiscutable, en revanche son rôle dans l'activation de Bak en conditions apoptotiques est fortement sujet à débat. Deux études indiquent que VDAC-2 inhibe l'activation de Bak par son interaction. Lors d'un stimulus apoptotique, il y a rupture du complexe notamment grâce aux protéines BH3-Only. Les cellules dépourvues de VDAC-2 présentes dans ce cas une plus grande sensibilité à des stimuli apoptotiques (Cheng et al., 2003; Lazarou et al., 2010). Pourtant d'autres travaux indiquent une insensibilité des cellules déficientes pour VDAC-2 à l'action du BH3-Only tBid, expliquée par l'absence de Bak aux mitochondries dans ces conditions. La sensibilité est restaurée après surexpression de VDAC-2 (Roy et al., 2009). La protéine VDAC-2 contribue au maintien d'un pool de protéine Bak inactif à la MOM, il est possible que les stimuli apoptotiques n'aient pas tous la capacité de rompre les complexes VDAC-2 – Bak. Ainsi pour un stress donné la présence de VDAC-2 peut être bénéfique ou nuisible.

Outre ces différents interactants protéiques, les lipides mitochondriaux interviennent activement dans le processus d'activation, insertion et oligomérisation de Bax ou Bak (Mignard et al., 2014). Le domaine transmembranaire de Bax contient une séquence consensus de reconnaissance du cholestérol (au niveau de l'hélice- α 5) (Martínez-Abundis et al., 2011). Une faible

concentration de cholestérol, en liposome ou à la MOM, favorise l'insertion de Bax mais uniquement cette étape. Des fortes concentrations ne vont pas inhiber l'insertion membranaire de Bax mais en revanche vont bloquer son oligomérisation du fait d'une diminution de la fluidité membranaire (Christenson et al., 2008). *A contrario*, les cardiolipines apparaissent essentielles (en liposomes) à la liaison de Bax à la MOM et à son insertion et oligomérisation subséquente (Sani et al., 2009). Une interaction directe est également observée entre Bak et les cardiolipines provoquant un réarrangement C-ter de Bak semblable à celui observé durant l'apoptose. Il a été proposé un rôle initiateur des cardiolipines dans l'activation de Bak, le prédisposant pour l'activation canonique par les BH3-Only (Landeta et al., 2011). Parmi les prostaglandines, PGE-2 et PGA-2 induisent le changement conformationnel de Bax et participent ainsi à son activation et translocation mitochondriale (Lalier et al., 2011). Le sphingosine-1-phosphate (S1P), métabolite du céramide, interagit avec Bak et induit ainsi la MOMP. Son produit de dégradation, connu pour son rôle antagoniste de l'apoptose dépendante des céramides, a pourtant fait preuve d'un potentiel pro-apoptotique en interagissant avec Bax conduisant à son oligomérisation et à la MOMP (Chipuk et al., 2012).

c. Translocation mitochondriale des BH3-Only

Lors d'une stimulation de la voie extrinsèque d'apoptose, Bid (forme p22) est clivé par la caspase 8 ce qui génère deux fragments p7 et p15. La forme tronquée tBid (forme p15) transloque rapidement du cytosol aux mitochondries (Gross et al., 1999). Les kinases caséine I et II peuvent phosphoryler Bid sur 3 à 4 résidus dont la thréonine 58 et la sérine 64, or le site de clivage de la caspase 8 est localisé entre ces résidus : pour être exact au niveau de l'acide aspartique en position 59. La présence de ces modifications post-traductionnelles rend Bid résistant au clivage par la caspase 8 et abroge ainsi sa translocation mitochondriale (Desagher et al., 2001). En revanche, le ciblage mitochondrial de tBid semble dépendre d'une myristoylation sur le résidu glycine 60, exposé après clivage par la caspase 8 (Zha et al., 2000). Par ailleurs, des interactions ont été mises en évidence entre la cardiolipine (phospholipide spécifique des mitochondries) et tBid et implique son hélice- $\alpha 6$. La présence de ce lipide favorise le recrutement de tBid (Lutter et al., 2000; Petit et al., 2009). De même, la protéine Mtch2 a été mentionnée comme récepteur mitochondrial pour la forme tronquée de Bid contribuant à son recrutement mitochondrial et à son action pro-apoptotique (Zaltsman et al., 2010). La déplétion de la cardiolipine comme de Mtch2 n'inhibe pas le recrutement de tBid aux mitochondries *a contrario* de leur double déplétion indiquant leur rôle redondant dans la translocation mitochondriale de tBid (Raemy et al., 2016).

En absence de stress, Bad est maintenu au cytosol inactif par la chaperonne 14-3-3. Lors d'un stress tel qu'une privation en facteur de croissance, il peut y avoir déphosphorylation de Bad par la protéine phosphatase 2A (PP2A) provoquant sa dissociation de la protéine 14-3-3. La phosphatase PP2C exerce une action similaire favorisant les fonctions pro-apoptotiques de Bad (Chiang et al., 2001; Klumpp et al., 2003). Par ailleurs, la protéine chaperonne est un substrat de la caspase 3. Ainsi après une 1^{ère} vague de MOMP, il peut y avoir clivage de 14-3-3, ce qui diminue son affinité de liaison à Bad. La libération subséquente de Bad lui permet de participer à la réponse apoptotique et probablement d'amplifier le signal (Won et al., 2003). Un autre mécanisme de déphosphorylation de Bad implique la calcineurine, phosphatase dont l'activité est induite par le Ca^{2+} . Une perturbation de l'homéostasie calcique constitue en soit un signal apoptotique qui peut notamment survenir après un stress du RE (Orrenius et al., 2003; Rizzuto et al., 2003; Wang et al., 1999). En outre, Bad possède deux domaines de liaison aux lipides au sein de son TMD. Cela lui confère une faculté à lier les phospholipides chargés négativement tels que les phosphatidylsérines, acide phosphatidique et cardiolipine, qui semble indispensable à ses fonctions pro-apoptotiques. Les phosphorylations de Bad n'affectent pas sa liaison aux lipides mitochondriaux mais favorisent son interaction avec 14-3-3 et par conséquent son extraction de la MOM par cette dernière. Il a donc été proposé que Bad navigue entre le cytosol et les membranes intracellulaires et ce phénomène est influencé par son statut de phosphorylation et est régulé par la chaperonne 14-3-3. Il est à noter que dans sa phase de translocation aux mitochondries, Bad favorise par la même occasion celle de Bcl-xL (Hekman et al., 2006).

L'activité pro-apoptotique de Bim et Bmf est en partie régulée par des interactions avec des complexes associés aux microtubules. Lors d'un stress, ces BH3-Only sont libérés de leur séquestration par le cytosquelette et transloqués aux mitochondries où ils exercent leurs fonctions pro-apoptotiques en s'associant aux anti-apoptotiques (Puthalakath et Strasser, 2002; Puthalakath et al., 1999, 2001). Les mécanismes impliqués sont jusqu'à présent mal compris. Une intervention de la protéine Gadd45a dans ce processus a été évoquée, dans le cas de Bim. Cette protéine induite lors de dommages à l'ADN, interagit avec le facteur d'élongation EF-1 α qui présente également un rôle important pour préserver la stabilité des microtubules. Leur association inhibe EF-1 α , déstabilisant les microtubules et libérant ainsi Bim (Tong et al., 2005).

3. Phénomène de rétro-translocation

La localisation des effecteurs, et plus spécifiquement la distribution de Bax entre le compartiment cytosolique et mitochondrial, apparaît comme un élément déterminant dans le processus de déclenchement de la MOMP et est donc finement régulée. Deux niveaux de régulation ont été jusqu'ici décrits. Le premier étant intrinsèque à la protéine Bax, du fait de sa conformation qui masque les régions N- et C-terminale requises pour la localisation mitochondriale. Le second implique différents partenaires protéiques ou lipidiques présents au cytosol ou aux mitochondries. *In fine* ces deux niveaux de régulation contrôlent le phénomène de translocation de Bax du cytosol aux mitochondries. Le changement de localisation de Bax apparaissait donc comme unidirectionnel et définitif. Pourtant ce dogme a été remis en question dans les années 2000 par une étude menée par le chercheur Gilmore. Son but vise alors à davantage caractériser le lien entre les voies de signalisation d'adhésion cellulaire et la machinerie apoptotique. Pour cela il se place dans un contexte d'anoikis survenant lors de la perte d'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. Une réponse apoptotique est déclenchée suite à l'arrêt de la voie de signalisation pro-survie, transduite par les récepteurs extracellulaires lors de leur liaison à la MEC. Après 1h de perte d'adhésion, Bax est retrouvé transloqué aux mitochondries avec une exposition de son domaine BH3, indiquant que les réarrangements conformationnels ont eu lieu. Cependant, la ré-adhésion des cellules reverse entièrement ce phénomène. Alors que les cellules détachées entrent en apoptose, celles ré-attachées, ayant donc subi une perte d'adhésion transitoire à la MEC, présentent une viabilité similaire aux cellules qui sont restées en contact permanent avec. De plus dans ces conditions Bax est redistribué au cytosol et retourne sous sa forme inactive (Gilmore et al., 2000). Ces résultats indiquent pour la première fois que Bax peut naviguer de façon bidirectionnelle du cytosol aux mitochondries. De plus, comme évoqué dans la partie III-4-c, le changement conformationnel de Bax, son transfert aux mitochondries et même son oligomérisation ne conduisent pas toujours à la survenue d'une MOMP. Ces événements ne constituent donc pas en soit un point de non retour dans le devenir cellulaire.

Ce n'est que plus tardivement qu'émergera le concept de rétro-translocation de Bax suite aux travaux d'Edlich. Il y décrit, en accord avec l'étude précédente, une navette continue de Bax entre le cytosol et les mitochondries dans les cellules saines. Il développe un système lui permettant d'étudier le taux de rétro-translocation de Bax et les éléments pouvant le réguler. Pour cela, il met à profit la technique de FLIP (*Fluorescence Loss In photobleaching*) impliquant l'expression de Bax fusionné à la GFP. La fluorescence de Bax au cytoplasme est progressivement

éteinte par des pulses de laser répétés, cycles au cours desquels devient de plus en plus apparente la fluorescence émise par Bax aux mitochondries. Les variations de cette fluorescence mitochondriale permettent de déterminer le taux d'association ou dissociation de Bax avec les mitochondries. Les résultats de l'étude indiquent que les anti-apoptotiques Bcl-xL, Bcl-2 ou Mcl-1, induisent la rétro-translocation de Bax mitochondrial vers le cytosol, stabilisant l'effecteur sous sa conformation inactive. Ce phénomène est strictement dépendant de l'interaction directe entre Bax et les anti-apoptotiques. Un mutant de Bcl-xL déficient pour l'interaction avec Bax (Bcl-xL G138A) comme l'inhibition pharmacologique de Bcl-xL et Bcl-2 abroge leur capacité à rétro-transloquer Bax. Le mutant Bax D68R, constitutivement présent aux mitochondries présente un taux de rétro-translocation basal bien plus faible que celui de Bax, or il est peu sensible à la rétro-translocation induite par les anti-apoptotiques. Par ailleurs, l'interaction de Bax avec Bcl-xL et la rétro-translocation subséquente implique un réarrangement N-terminal de Bax pour avoir lieu. En effet, ces événements ne sont plus observés avec une forme modifiée de Bax présentant des ponts intramoléculaires bloquant les réarrangements structuraux. En outre, ce phénomène de rétro-translocation est réciproque car Bax augmente également la rétro-translocation de Bcl-xL. Si la rétro-translocation de Bax constitue un mécanisme d'action anti-apoptotique, la diminution de celle-ci semble être *a contrario* un mécanisme d'action pro-apoptotique car elle est observée après surexpression du BH3-Only Bim (Edlich et al., 2011).

Ces données indiquent un mode de régulation supplémentaire des anti-apoptotiques en diminuant le pool de Bax présents aux mitochondries susceptible d'être activé lors d'un stress. De façon concordante, un stress tel que la perte des signaux de survie médiée par l'adhésion cellulaire ralentit le taux de rétro-translocation de Bax. Cela permet son accumulation aux mitochondries, ce qui le prédispose à répondre à l'action de BH3-Only. Les voies de signalisation AKT et FAK, dont l'activité contribue à l'adhésion des cellules à la MEC, modulent le taux de dissociation de Bax des mitochondries. En effet, leurs surexpressions augmentent la rétro-translocation de Bax de façon semblable à ce qui est observé lors de la ré-adhésion de cellules à la MEC. L'inhibition de ces voies miment la perte d'adhésion à la MEC et est associée à une accumulation de Bax aux mitochondries (Schellenberg et al., 2013). La régulation de la rétro-translocation de Bax apparaît donc comme un élément central dans le contrôle de l'activation de Bax.

Edlich pionnier dans ce domaine, poursuit ses investigations et détermine que la capacité de Bcl-xL à rétro-transloquer Bax implique sa région C-terminale d'ancrage membranaire. En effet, le mutant de Bcl-xL délété de ce domaine (Bcl-xL Δ C) n'est pas en mesure d'induire la dissociation de

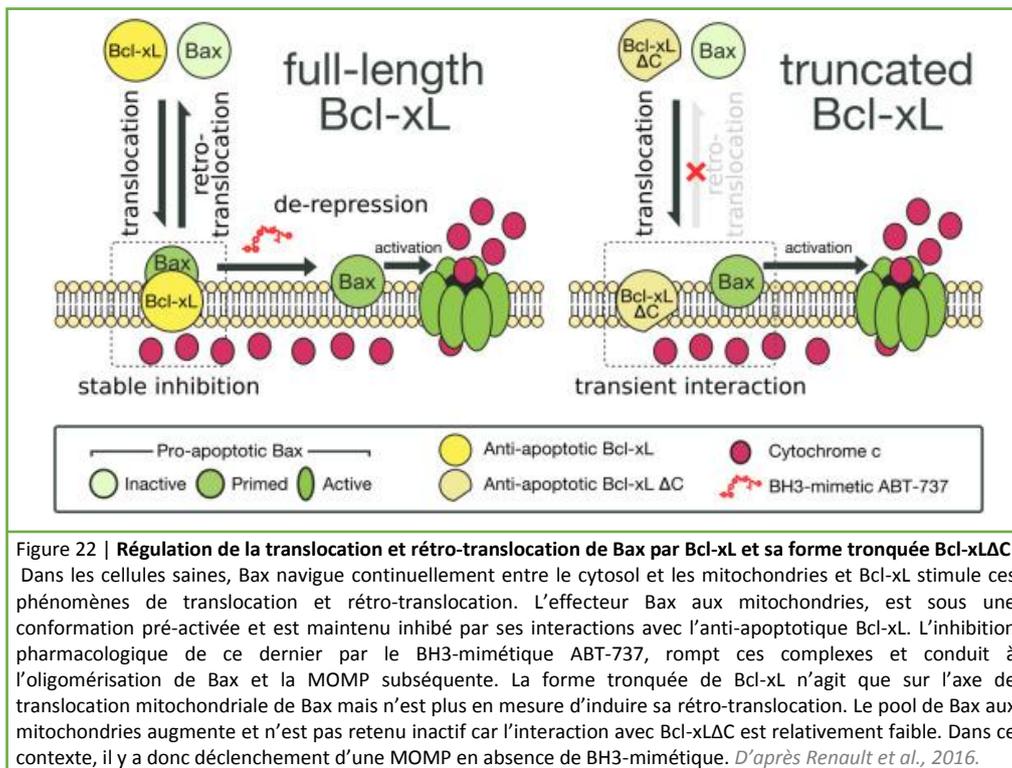
Bax des mitochondries. Ce mutant de Bcl-xL réside principalement au cytoplasme, il a donc été proposé qu'un niveau insuffisant de cette construction aux mitochondries soit responsable de l'absence d'effet sur la localisation de Bax. Un second mutant de Bcl-xL a été généré pour explorer cette possibilité : Bcl-xL-BaxH9. Il possède l'hélice- α 9 de Bax permettant le retour d'une localisation mitochondriale. Non seulement, ce mutant n'est pas capable de dissocier Bax des mitochondries mais il provoque même l'effet inverse avec une diminution du taux de rétro-translocation indiquant que Bax est davantage associé aux mitochondries. Pourtant Bcl-xL-BaxH9 conserve sa capacité à naviguer entre les mitochondries et le cytosol et présente d'ailleurs un taux de rétro-translocation plus élevé que Bcl-xL. Donc l'absence d'effet de Bcl-xL Δ C n'est pas due à sa faible localisation mitochondriale. Une série de délétions dans la séquence C-ter indique qu'il n'y a pas de résidus clés mais plutôt que le potentiel de rétro-translocation de Bax par Bcl-xL dépend de l'intégrité de son hélice- α 9. La proportion de Bax retrouvée à la MOM corrèle avec la capacité de rétro-translocation de Bcl-xL : faible proportion de Bax mitochondrial avec Bcl-xL et l'inverse avec Bcl-xL Δ C. Ainsi en absence d'une rétro-translocation efficace Bax s'accumule aux mitochondries (Todt et al., 2013).

Par ailleurs, un mécanisme semblable de rétro-translocation est également observé pour Bak. Il est détecté suite à la surexpression de Bcl-xL et Mcl-1 mais pas celle de Bcl-2. Les mutations Bcl-xL G138A ou Bak D83G ainsi que l'inhibition pharmacologique de Bcl-xL par un BH3-mimétique inhibent l'interaction Bak – Bcl-xL. Dans ces conditions, la rétro-translocation de Bak n'est pas observée, indiquant la nécessité d'une interaction directe de type domaine BH3 – poche hydrophobe pour que Bcl-xL puisse promouvoir la dissociation de Bak des mitochondries. Les deux effecteurs Bax comme Bak sont sujets à un phénomène de rétro-translocation pourtant l'un d'eux est principalement localisé au cytoplasme des cellules saines tandis que l'autre est majoritairement mitochondrial. Il se trouve que Bax présente un taux de rétro-translocation bien plus important que Bak ce qui peut en partie expliquer leur différence de localisation. Ce taux de rétro-translocation différentiel est intrinsèque aux effecteurs et est due à la différence d'hydrophobicité de leur séquence d'ancrage C-terminale (Todt et al., 2015).

Ainsi les deux effecteurs Bax comme Bak effectuent une navette continue entre le cytoplasme et les mitochondries des cellules, en absence de stimulus apoptotique. Ce processus est modulé par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. En effet, les différents travaux indiquent une augmentation du taux de rétro-translocation de Bax et Bak par Bcl-xL et Mcl-1 (ainsi que Bcl-2 pour Bax). Un ralentissement du taux de rétro-translocation peut se produire en réponse à un stress et ainsi augmenter la taille du pool d'effecteurs localisés aux mitochondries, prêts à être

activés. Il a récemment été montré un rôle critique du canal ionique VDAC-2 dans le phénomène de rétro-translocation de Bax. En effet, plus aucune rétro-translocation de Bax n'est détectée dans des cellules déplétées en VDAC-2, bien que Bax soit retrouvé aux mitochondries. Le canal VDAC a pour fonction de faciliter le transport de nucléotides, phosphocréatine, Ca^{2+} et autres ions à travers la MOM. Il se trouve que les nucléotides tels que l'ATP, ADP, AMP augmentent la rétro-translocation de Bax tandis que l'inhibition pharmacologique des VDACs la diminue, indiquant que le transport d'ion par VDAC-2 est impliqué dans la rétro-translocation de Bax. Ainsi le phénomène de rétro-translocation de Bax peut être régulé par diverses protéines appartenant ou non à la famille Bcl-2. (Lauterwasser et al., 2016).

Il s'avère que le contrôle de la localisation de Bax est encore plus complexe qu'il n'y paraît et ne se résume pas à la séquestration de Bax au cytosol par des partenaires protéiques tels que la chaperonne 14-3-3 ni à sa rétro-translocation par les membres anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. Il semble en effet que les protéines anti-apoptotiques exercent un rôle relativement paradoxal sur la localisation de Bax.



Il a été observé une augmentation du pool mitochondrial de Bax lors d'une surexpression de Bcl-2 dans des cellules non apoptotiques à des niveaux semblables à ceux encourus après un stimulus apoptotique (Teijido et Dejean, 2010). En accord avec ces travaux, il a été observé une

augmentation de Bax aux mitochondries en levure après surexpression de Bcl-xL ou Bcl-xL ΔC , et dans ce cas de manière accentuée (**Figure 22**). Comme dans l'étude d'Edlich, les auteurs détectent une rétro-translocation de Bax augmentée par Bcl-xL mais inchangée avec Bcl-xL ΔC . Il est donc proposé que Bcl-xL stimule à la fois la rétro-translocation de Bax mais davantage sa relocalisation aux mitochondries. Bcl-xL ΔC , ne pouvant agir que sur l'axe de translocation de Bax induit donc une forte augmentation de ce dernier aux mitochondries, supérieure à celle médiée par Bcl-xL. En outre, tandis que l'interaction Bax – Bcl-xL apparaît stable et détectable par co-immunoprécipitation, ce n'est pas le cas de celle entre Bax et Bcl-xL ΔC qui semble davantage transitoire. La capacité à rétro-transloquer Bax semble dépendre d'interactions stables effectuées aux mitochondries contrairement au processus de relocalisation du cytosol vers les mitochondries. Ce rôle contradictoire de Bcl-xL sur la localisation de Bax n'est pas sans conséquence car l'augmentation du pool de Bax aux mitochondries prépare les cellules à répondre efficacement à des signaux apoptotiques (Renault et al., 2013, 2015, 2016).

VII. Régulation de l'activation de Bax et Bak par des voies suppressives de tumeur

1. Voie tumeur suppressive p53

a. Première évidence d'un rôle pro-apoptotique non transcriptionnel

Le facteur de transcription p53 est un puissant inducteur d'apoptose en réponse à divers stress cellulaires. Initialement ces fonctions pro-apoptotiques ont été décrites comme reposant sur la transcription de gènes cibles pro-apoptotiques : APAF-1, des récepteurs de mort CD95, DR-5 et plusieurs membres de la famille Bcl-2 tels que Bax, Noxa, Puma, Bid. Cependant, des études ont mis en évidence un rôle apoptotique de p53 en absence de ses fonctions transcriptionnelles. En effet, la surexpression de p53 en présence d'irradiations induit la mort des cellules même lors d'une inhibition de la synthèse d'ARN par l'inhibiteur actinomycine-D ou de la synthèse protéique par le traitement cycloheximide (Caelles et al., 1994). Des observations similaires furent obtenues après surexpression de mutants de p53 déficients pour la transcription (troncation ou mutation ponctuelle). Malgré l'absence de faculté transcriptionnelle, ces mutants induisent la mort des cellules tumorales (Chipuk et al., 2003; Haupt et al., 1995). Il fut alors admis que la voie d'apoptose initiée par p53 dépend à la fois d'un mécanisme impliquant ses fonctions transcriptionnelles et à la fois d'un mécanisme qui en est indépendant.

b. Découverte d'un rôle pro-apoptotique de p53 directement aux mitochondries

Plus tardivement, des approches de fractionnement cellulaire ont permis de mettre en évidence la présence du facteur de transcription p53 aux mitochondries dans des cellules soumises à un signal apoptotique, tel que le traitement camptothécine ou desferroxamine (inducteur de stress hypoxique). En absence de stress, p53 n'est pas localisé aux mitochondries, en revanche après induction de la voie apoptotique, il y a une accumulation rapide aux mitochondries qui survient avant la MOMP et la libération du cytochrome C. Afin d'étudier l'action de p53 directement aux mitochondries, un ciblage de la protéine par fusion avec une séquence d'adressage provenant d'une protéine mitochondriale (ornithine transcarbamylase) fut réalisé. La seule surexpression de p53 ciblé aux mitochondries suffit à induire la mort des cellules. L'introduction d'une mutation inactivatrice des fonctions transcriptionnelles de p53 ne change aucunement cet effet (Marchenko et al., 2000). Ces données mirent en lumière pour la toute première fois l'existence de fonctions pro-apoptotiques de p53 directement aux mitochondries.

c. Lien entre la famille Bcl-2 et p53 localisé aux mitochondries ou au cytosol

Beaucoup d'efforts ont par la suite été fournis pour décrypter le mécanisme d'action de p53 directement aux mitochondries en l'absence de son activité de facteur de transcription (**Figure 23**) (Fuster et al., 2007). Un lien direct entre p53 et la famille Bcl-2 fut alors établi. En effet Moll mit en évidence des interactions entre p53 et Bcl-xL ou Bcl-2 par des approches de co-immunoprécipitations dans des cellules surexprimant p53 ciblé aux mitochondries. Ces interactions furent aussi détectées entre les protéines endogènes sur fraction mitochondriale de cellules traitées à la camptothécine. Une évidence d'interaction directe entre les protéines recombinantes p53 et Bcl-xL fut apportée par GST-Pull down (Mihara et al., 2003). L'interaction implique le domaine de liaison à l'ADN (DBD) de p53. Différentes mutations dans le DBD de p53, fréquemment retrouvées dans les tumeurs humaines (R175H, L194F, R273H, R280K), conduisent à une perte d'interaction de p53 avec Bcl-xL ou Bcl-2, malgré une localisation constitutive aux mitochondries en absence de stress (Mihara et al., 2003; Tomita et al., 2006). Une succession d'études identifia une action dite « BH3-like » de p53 semblable à celle de BH3-Only sensibilisateur avec la rupture de complexe Bak – Mcl-1, Bim – Bcl-2/Bcl-xL/Mcl-1 ainsi que Bax ou Bid – Bcl-xL (Chipuk et al., 2004; Han et al., 2010; Leu et al., 2004). L'action « BH3-like » de p53 semble également mimer celle de BH3-Only activateurs car p53 interagit avec Bak favorisant son activation et oligomérisation, même si l'affinité de liaison est moindre comparé à son association aux anti-apoptotiques (Leu et al., 2004; Pietsch et al., 2008). Par ailleurs, bien qu'il n'y ait aucune preuve d'interaction directe avec Bax, p53

recombinant induit l'activation, insertion et oligomérisation de Bax recombinant sur mitochondries isolées ou liposomes (Chipuk et al., 2004; Sot et al., 2007). Plus récemment, l'interaction entre p53 et Bax a été mise en évidence par des approches de NMR. Elle requiert une cis-trans isomérisation du résidu Proline 47 de p53 par l'isomérase Pin-1 (Follis et al., 2015). L'action non transcriptionnelle de p53 n'est pas uniquement dictée par son rôle aux mitochondries. En effet, il a été démontré une action de p53 cytosolique sur l'activation de Bax également cytosolique. Les auteurs présentent un modèle de séquestration de p53 au cytosol par Bcl-xL. La rupture du complexe est initiée par le BH3-Only Puma, néo-transcrit au noyau par p53 nucléaire. La forme cytosolique de p53 ainsi libérée permet d'activer Bax (Chipuk et al., 2005). Sur le plan structural, Puma induit un changement conformationnel partiel de Bcl-xL au niveau des hélices- $\alpha 2$ / $-\alpha 3$, responsable de la rupture d'interaction entre p53 cytosolique et Bcl-xL (Follis et al., 2013). Ainsi p53 induit l'apoptose à la fois par une voie transcriptionnelle mais également par une voie non transcriptionnelle cytosolique et mitochondriale en interférant directement au niveau du réseau d'interaction des membres de la famille Bcl-2. Cela a pour conséquences d'accroître la sensibilité des cellules à des traitements pharmacologiques visant à inhiber les anti-apoptotiques (Le Pen et al., 2016; **Annexe 1**).

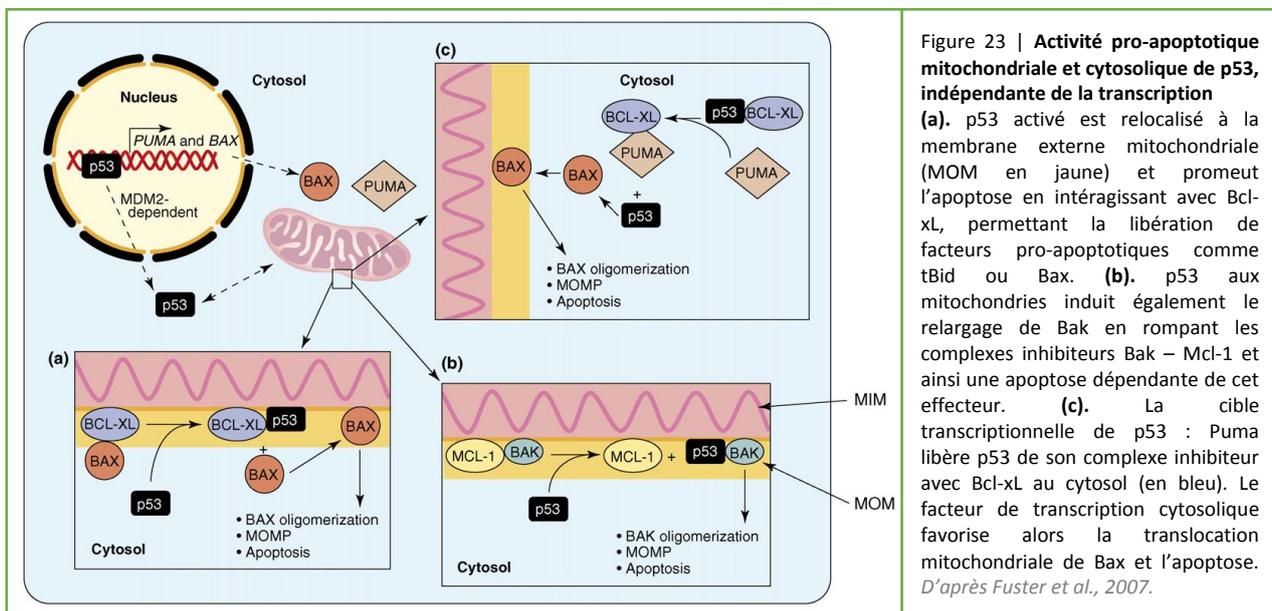


Figure 23 | **Activité pro-apoptotique mitochondriale et cytosolique de p53, indépendante de la transcription**
(a). p53 activé est relocalisé à la membrane externe mitochondriale (MOM en jaune) et promeut l'apoptose en interagissant avec Bcl-xL, permettant la libération de facteurs pro-apoptotiques comme tBid ou Bax. **(b).** p53 aux mitochondries induit également le relargage de Bak en rompant les complexes inhibiteurs Bak – Mcl-1 et ainsi une apoptose dépendante de cet effecteur. **(c).** La cible transcriptionnelle de p53 : Puma libère p53 de son complexe inhibiteur avec Bcl-xL au cytosol (en bleu). Le facteur de transcription cytosolique favorise alors la translocation mitochondriale de Bax et l'apoptose. *D'après Fuster et al., 2007.*

d. Bases moléculaires de l'interaction p53 – Bcl-xL

L'interaction entre p53 et Bcl-xL implique des résidus basiques du domaine de liaison à l'ADN de p53 en contact avec la surface acide de la structure de Bcl-xL située sur la face opposée à la poche hydrophobe. De par les caractères basiques (chargés positivement) et acides (chargés négativement) des acides aminés impliqués dans l'interaction, ce sont majoritairement des liaisons

électrostatiques qui se créent. Au niveau de Bcl-xL, les résidus se répartissent à travers la structure faisant intervenir l'extrémité C-terminale avec l'hélice- α 1 mais également les boucles entre les hélices- α 3/- α 4 et les hélices- α 5/- α 6 (Hagn et al., 2010; Petros et al., 2004). L'interaction ne s'effectuant pas au niveau de la poche hydrophobe de Bcl-xL, ce dernier peut séquestrer p53 au cytosol tout en conservant ses fonctions anti-apoptotiques via des interactions avec les protéines pro-apoptotiques. Des analyses structurales plus approfondies ont permis d'identifier des résidus de Bcl-xL critiques dans son association à p53 : K20, H113, I114 et E158 dont les mutations altèrent la formation du complexe p53 – Bcl-xL (Follis et al., 2014).

e. Mécanisme proposé de translocation mitochondriale de p53

Le facteur de transcription p53 ne possède aucune séquence d'adressage aux mitochondries. La question s'est donc posée de déterminer par quel mécanisme cette protéine majoritairement nucléaire parvenait à se relocaliser aux mitochondries. Les phosphorylations et acétylations ne semblent pas être impliquées. En revanche, il a été observé que le statut d'ubiquitination de p53 pouvait réguler sa localisation mitochondriale. MDM-2 est le régulateur majeur de p53. C'est une E3-ligase responsable de sa poly-ubiquitination et dégradation protéosomale en absence de stress. Or dans leur étude Marchenko et Moll indiquent que MDM-2 est également responsable de mono-ubiquitination de p53 ce qui favorise fortement sa translocation aux mitochondries. Par ailleurs, les auteurs démontrent que le pool de p53 actif aux mitochondries en réponse à un stress n'est pas ubiquitiné. Une interaction entre la protéine HAUSP : dé-ubiquitinase et p53 est observée lors d'un stress suggérant une étape de dé-ubiquitination de p53 après sa translocation aux mitochondries. D'ailleurs il est à noter que Bcl-xL s'associe à la forme non-ubiquitinée de p53 (Marchenko et Moll, 2007; Marchenko et al., 2007).

2. Voie tumeur suppressive pRb

Comme dans le cas de p53, la voie pRb/E2Fs est impliquée dans une régulation transcriptionnelle des membres de la famille Bcl-2, mais cela fait plus particulièrement intervenir le facteur de transcription E2F1 pour induire l'expression de certains pro-apoptotiques. Ce point sera abordé ultérieurement de façon plus précise dans la partie suivante. Il a été caractérisé une intervention directe de la protéine pRb dans le contrôle de l'activation de l'effecteur Bax. L'étude menée par Lees explore l'implication de la protéine pRb dans la voie d'apoptose extrinsèque induite par un traitement TNF- α /cycloheximide. Le cycloheximide bloque la synthèse *de novo* de protéines afin d'inhiber l'induction de la voie NF κ B qui contrecarrerait la réponse apoptotique initiée. Dans ce

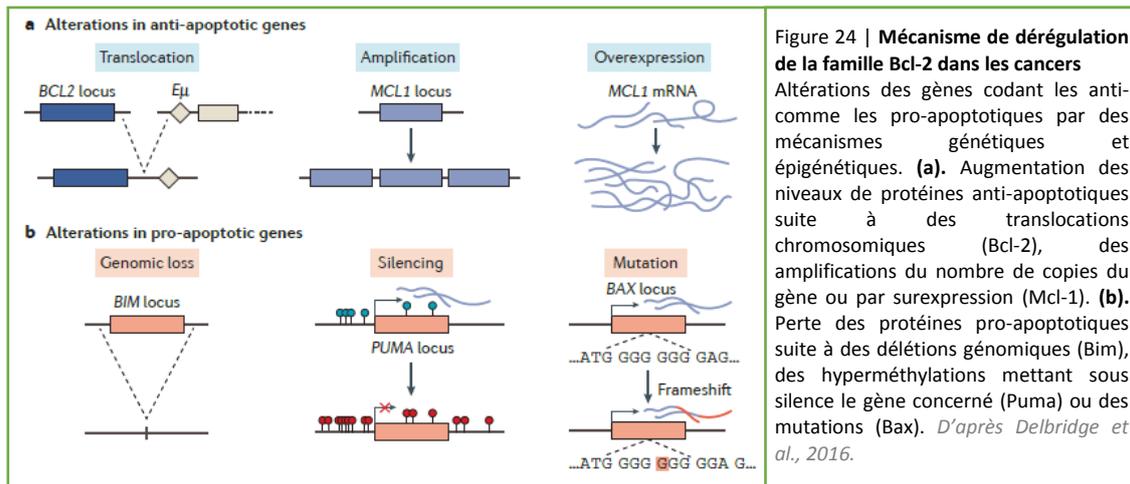
contexte d'absence de protéines néo-synthétisées, pRb potentialise la réponse apoptotique au traitement et ce d'une manière exclusivement dépendante de Bax. Les auteurs proposent un rôle direct de pRb dans l'activation de Bax et identifie une localisation mitochondriale de la protéine par fractionnement cellulaire. Contrairement à p53, pRb est constitutivement présent aux mitochondries et un stress tel que le TNF- α ou la camptothécine ne modifie pas la taille de ce pool mitochondrial. Il se trouve que la protéine recombinante pRb, au même titre que tBid est capable d'activer Bax et d'induire le relargage du cytochrome C à partir de mitochondries isolées. L'incubation *in vitro* de la forme monomérique de Bax avec la protéine recombinante pRb permet la détection de complexes pRb – Bax activé. La surexpression directe de la protéine pRb ciblée aux mitochondries par la même stratégie que celle employée pour p53 (fusion avec la séquence d'adressage mitochondriale de l'ornithine transcarbamylase) potentialise la mort induite par le traitement TNF- α /cycloheximide. Ce ciblage mitochondrial de pRB bloque toute action sur la transcription de gène cible mais sensibilise pourtant les cellules à une variété de stimuli apoptotiques (Attardi et Sage, 2013; Hilgendorf et al., 2013). Par ailleurs, il a été mis en évidence la présence de formes phosphorylées de pRB aux mitochondries en absence de stress, au niveau de 4 résidus dans sa région C-terminale. Les auteurs de cette étude apportent plusieurs évidences indiquant que la phosphorylation du résidu Sérine 807 est requise pour que l'interaction de pRB avec Bax n'ait lieu. En effet, tandis que l'interaction est augmentée par un acide aminé phosphomimétique en position 807 de pRB, elle est abrogée par l'utilisation d'un acide aminé phosphodéficient ou d'un traitement phosphatase (Antonucci et al., 2014).

VIII. Régulation pharmacologique de la famille Bcl-2 comme stratégie anti-tumorale

Dans une vaste majorité des cancers, la voie d'apoptose intrinsèque présente des dysfonctions, ce qui s'accompagne d'une promotion de la tumorigénèse. En effet, l'inhibition de l'apoptose permet d'une part de maintenir la viabilité des cellules tumorales suffisamment longtemps pour permettre l'acquisition de mutations oncogéniques et d'autre part évite toute réponse apoptotique pouvant être déclenchée directement par des oncogènes tels que c-MYC. En outre, cela a pour conséquence de favoriser les résistances à diverses thérapies anti-tumorales contribuant à la progression de la pathologie vers des stades plus agressifs.

1. Dérégulation de la famille Bcl-2 dans les cancers

Etant donné le rôle prépondérant des protéines Bcl-2 dans cette voie de signalisation, il n'est pas surprenant que leur activité soit souvent modifiée dans les tumeurs, la plupart du temps suite à des variations de leur niveau d'expression. De façon générale, les cellules tumorales perdent l'expression des protéines pro-apoptotiques ou augmentent celle des anti-apoptotiques (**Figure 24**).



Les gènes codant les protéines pro-apoptotiques sont souvent délétés dans les cancers comme c'est le cas du gène codant le BH3-Only Bim : délété dans ~20% des cas de lymphomes du manteau ou du gène codant Puma : retrouvé déplété dans 3131 cancers différents. La protéine à multi-domaine Bok pro-apoptotique voit également son gène délété dans une variété de cancers. Outre des délétions géniques, il y a également des mutations et mises sous silence. Le gène codant Noxa est à la fois muté ou principalement mis sous silence dans les lymphomes B à grandes cellules. L'expression du BH3-Only Bik est réprimée suite à des méthylations de l'ADN dans les carcinomes rénaux. Une mise sous silence due à des modifications épigénétiques est également observée pour les gènes codant Bim et Puma dans un certain nombre de cancers tels que des carcinomes rénaux et des lymphomes de Burkitt. Le gène codant Bax présente des mutations induisant un changement de cadre de lecture dans les cancers du colon ainsi que des mutations dites « perte de fonction » dans certains cancers hématopoïétiques.

A contrario, les gènes codant les protéines anti-apoptotiques sont fréquemment surexprimés. L'exemple le plus connu, qui a permis l'identification du tout premier membre de cette famille, correspond à la translocation chromosomale t(14 :18) qui place le gène codant Bcl-2 sous contrôle du promoteur de la chaîne lourde des immunoglobulines dans les lymphocytes B. Cela conduit à une forte surexpression de Bcl-2 retrouvé dans ~90% des lymphomes folliculaires.

Une amplification génique de Bcl-2 est également retrouvée dans les lymphomes B à grandes cellules et les carcinomes pulmonaires à petites cellules. Les protéines Bcl-xL et Mcl-1 sont surexprimées dans de nombreux cancers suite à des altérations géniques du nombre de copies. Des mécanismes indirects de perte de répression traductionnelle par des micro-RNAs (miR), délétés ou mis sous silence, sont également responsables de la surexpression des anti-apoptotiques. C'est le cas de Bcl-2, surexprimé dans une majorité des leucémies lymphoïdes chroniques, du fait d'une perte de répression par miR-15a et miR-16.1. Il en est de même dans une variété de cancers avec let-7 pour Bcl-xL ou les miR-29, miR-125 et miR-193 pour Mcl-1.

Il est à noter que les niveaux élevés de Bcl-xL sont tenus responsables des phénomènes de chimiorésistances observés dans les cancers du sein et de la prostate, les neuroblastomes, les cancers colorectaux et les carcinomes hépatocellulaires ou gastriques.

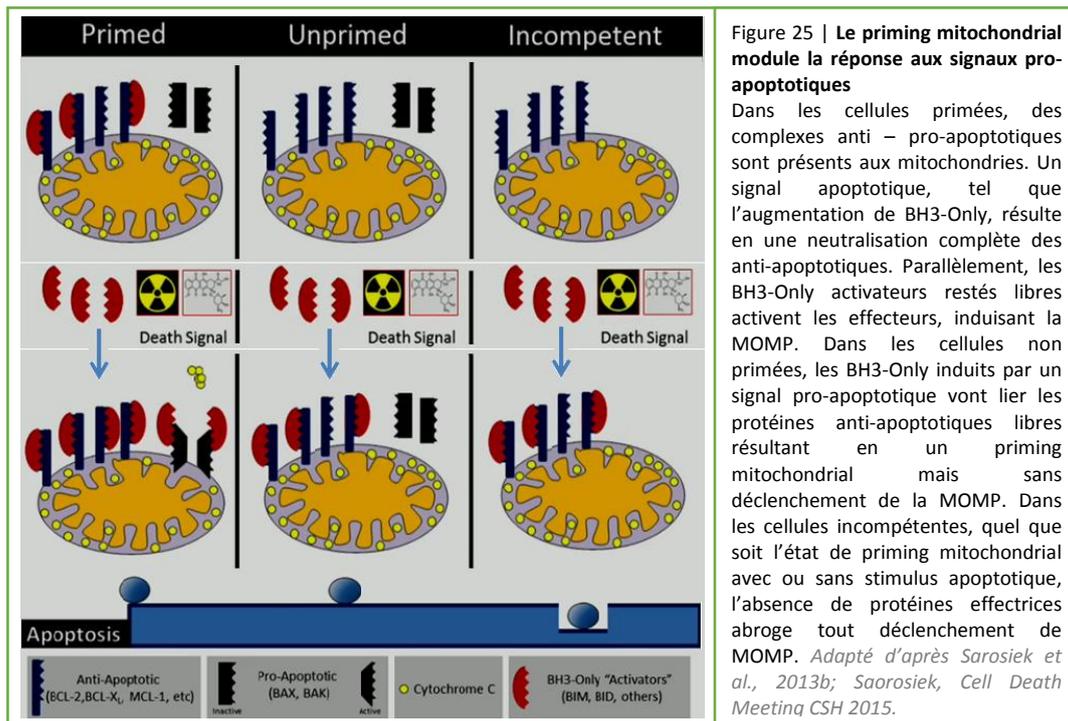
(Czabotar et al., 2014; Delbridge et al., 2016)

2. Définition du priming mitochondrial et du profilage BH3

Le déclenchement de la MOMP et par conséquent la survenue de l'apoptose dépend en grande partie du réseau d'interaction engagée entre les membres de la famille Bcl-2. Comme il vient d'être exposé, les niveaux d'expression des différentes classes de protéines de la famille Bcl-2 varient selon les tumeurs, ce qui modifie ce réseau d'interaction et *in fine* le seuil de déclenchement de la MOMP. La notion de « priming mitochondrial » fut alors émise par Sarosiek et Letai (Sarosiek et al., 2013b). Elle détermine si la cellule est prédisposée ou non à mourir en réponse à un stress donné (**Figure 25**).

Une cellule « primée » exprime les trois classes de protéines de la famille Bcl-2 et les membres anti-apoptotiques sont en nombre suffisant pour inhiber leur contre-partie pro-apoptotique. En réponse à un stress la cellule va exprimer davantage de protéines BH3-Only. L'équilibre entre protéine anti et pro-apoptotique est perturbé et la balance penche en faveur des signaux pro-apoptotiques. Cela signifie que les protéines BH3-Only sont en excès par rapport aux membres anti-apoptotiques et les BH3-Only activateurs seront libres d'activer les effecteurs et de déclencher la MOMP. Dans le cas d'une cellule non primée, l'absence d'expression des protéines BH3-Only se traduit par la présence de protéines anti-apoptotiques non complexées aux mitochondries. Ainsi lors d'un stress, les BH3-Only nouvellement synthétisés seront neutralisés par les membres anti-apoptotiques et ne seront par conséquent pas en mesure d'activer les effecteurs.

Donc pour un même stress donné, la réponse d'une cellule primée sera tout à fait différente de celle d'une cellule non primée. Cependant, suite à ce stress, une cellule initialement non primée le deviendra. Ainsi un stimulus apoptotique plus intense ou prolongé devrait permettre d'induire sa mort. Une autre catégorie de cellule a été décrite et correspond aux cellules dites « incompetentes ». Il s'agit dans ce cas de cellules qui ont perdu l'expression des protéines effectrices. Quel que soit l'intensité ou la durée du stimulus apoptotique, le niveau d'expression des BH3-Only activateurs, en absence des effecteurs, la MOMP ne pourra pas avoir lieu.



Une technique de « BH3-Profiling » ou « profilage BH3 » a été développée en vue de déterminer pour des tumeurs données, leur statut de priming mitochondrial. Elle consiste à incuber les cellules tumorales en présence de peptides BH3 mimant les protéines BH3-Only et à mesurer la perte de potentiel mitochondrial par fluorescence. En fonction du type de peptides et de la quantité qu'il a fallu ajouter pour induire la MOMP, il est possible de déterminer si les cellules tumorales présentent des dépendances plus élevées à un anti-apoptotique par rapport à un autre et si ces anti-apoptotiques sont déjà complexés ou non à des pro-apoptotiques (Del Gaizo Moore et Letai, 2013). Cette technique a été mise à profit pour déterminer la sensibilité de tumeur de patients à diverses chimiothérapies (Montero et al., 2015).

Au vu des multiples altérations génétiques qui tendent à augmenter la quantité de protéines anti-apoptotiques et à diminuer celle des pro-apoptotiques, il semblerait tout à fait concevable que la majorité des tumeurs ne soit pas primée. Pourtant de manière paradoxale, c'est l'inverse qui se produit bien souvent. En effet, les cellules cancéreuses peuvent s'avérer être plus sensibles que des cellules saines à des stimuli apoptotiques. Cela s'explique du fait de la diversité des stress oncogéniques qu'elles subissent, augmentant le niveau de protéines BH3-Only. Par ailleurs, des modifications de l'environnement extracellulaire telles que l'hypoxie ou la faible disponibilité en nutriment sont également synonymes de signaux de mort, contribuant à cette augmentation. Le niveau constant élevé de BH3-Only induit alors une dépendance des cellules tumorales aux anti-apoptotiques. En se basant sur l'addiction des tumeurs à un anti-apoptotiques donné, des stratégies thérapeutiques ont été élaborées pour les cibler spécifiquement (Lopez et Tait, 2015).

3. Ciblage thérapeutique des protéines anti-apoptotiques

En s'inspirant de l'utilisation de peptide BH3 pour inhiber les anti-apoptotiques, différentes molécules nommées « BH3-mimétiques » ont été développées pour contrecarrer l'action néfaste des protéines anti-apoptotiques dans les tumeurs. Celles-ci ont été désignées sur la base des interactions engagées entre la poche hydrophobe des anti-apoptotiques et le domaine BH3 de leur contrepartie pro-apoptotique. En effet les molécules BH3-mimétique miment le domaine BH3 des protéines BH3-Only et se logent ainsi dans la poche hydrophobe des anti-apoptotiques de sorte que ces derniers se voient incapables de neutraliser les protéines pro-apoptotiques. Cela peut avoir plusieurs conséquences selon le statut de priming mitochondrial des cellules tumorales traitées. En effet, dans des cellules primées, les BH3-mimétiques en agent simple vont rompre les complexes anti – pro-apoptotiques initialement présents aux mitochondries, libérant des BH3-Only activateurs susceptibles d'induire l'apoptose. Dans le cas de tumeurs non primées, les BH3-mimétiques vont principalement lier des anti-apoptotiques libres ce qui aura pour effet d'augmenter le priming mitochondrial mais le traitement sera peu efficace en agent simple pour induire la mort des cellules tumorales. En revanche, l'utilisation de BH3-mimétiques sera utile dans ce cas pour sensibiliser les cellules à une thérapie anti-tumorale adjointe au traitement (Sarosiak et Letai, 2016).

Plusieurs molécules ont ainsi été développées et se distinguent par leur spécificité de liaison pour certaines des protéines anti-apoptotiques, cependant beaucoup s'avèrent peu affines ou induisent une mort cellulaire non mitochondriale ne résultant pas du ciblage des anti-apoptotiques

mais d'effets non ciblés (Juin et al., 2013). C'est pourquoi ne sera présenté ici que les molécules présentant une forte affinité et spécificité pour les protéines anti-apoptotiques (**Figure 26**).

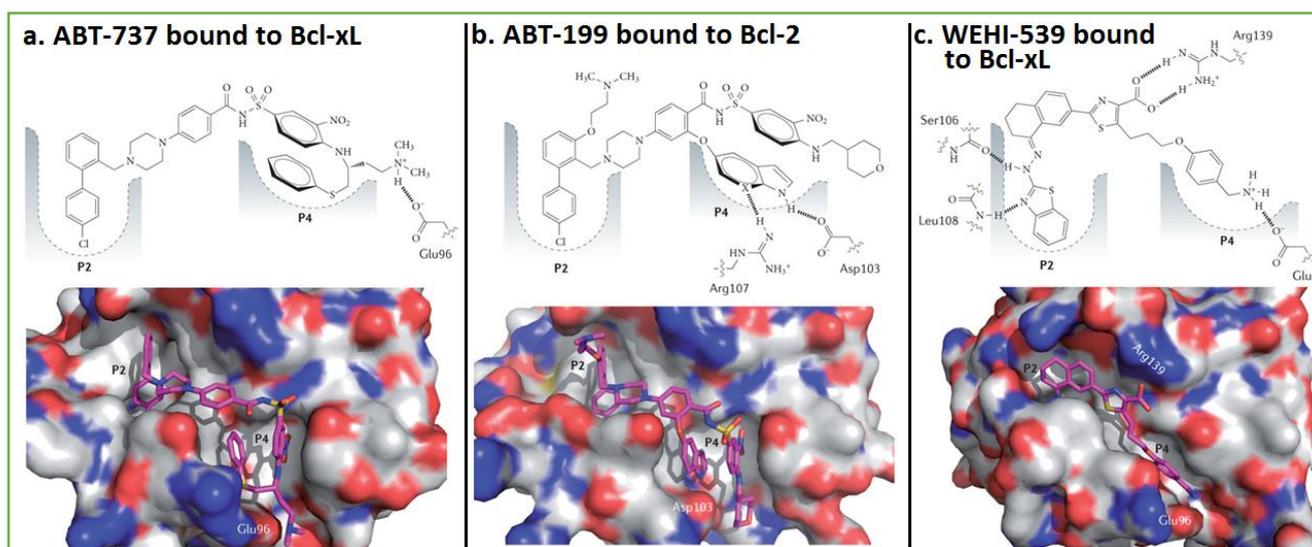


Figure 26 | Interaction des BH3-mimétiques avec la poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques cibles

(a). L'ABT-737 interagit avec Bcl-xL (comme représenté), Bcl-2 et Bcl-w. La molécule occupe les poches hydrophobes P₂ et P₄ et crée une liaison électrostatique avec la Glu96 de Bcl-xL. (b). L'ABT-199 interagit avec Bcl-2. Il occupe les poches P₂ et P₄ et crée un pont hydrogène entre sa moitié aza-indole et l'Asp103 de Bcl-2 qui lui confère une sélectivité pour Bcl-2 par rapport à Bcl-xL. Le nitrogène du BH3-mimétique contacte l'Arg107 de Bcl-2 ce qui augmente l'affinité de l'interaction. (c). Le WEHI-539 s'associe à Bcl-xL. Il occupe également les poches P₂ et P₄ et crée des liaisons électrostatiques avec la Glu96 et l'Arg139 de Bcl-xL. Deux ponts hydrogènes confèrent la sélectivité pour Bcl-xL comparé à Bcl-2 ou Bcl-w : l'un entre l'hydrazone du BH3-mimétique et la Leu108 et l'autre entre l'hydrazone de la molécule et la Ser106 de Bcl-xL. Représentation des protéines anti-apoptotiques en surface (gris pour carbone, rouge pour les oxygènes, bleu pour les nitrogènes, jaune pour les atomes de soufre). Représentation en bâtons des BH3-mimétiques (magenta pour carbone, idem aux anti-apoptotiques pour les autres atomes). D'après Czabotar et al., 2014.

La première molécule BH3-mimétique : ABT-737, à avoir été désignée, provient du laboratoire Abbott (Oltersdorf et al., 2005). Ce composé a été décliné sous une forme orale et correspond à la molécule ABT-263, connue sous le terme de Navitoclax en clinique (Tse et al., 2008). Ce BH3-mimétique présente une sélectivité de liaison à Bcl-xL, Bcl-2 et Bcl-w mais n'est pas capable de lier Mcl-1 ou Bcl-2 A1. La structure cristallographique du complexe ABT-737 – Bcl-xL indique que la molécule se loge au niveau des poches hydrophobes P₂ et P₄ et engage une liaison électrostatique avec l'acide glutamique en position 96 de Bcl-xL. Une forte similarité est retrouvée avec la liaison Bad – Bcl-xL (Lee et al., 2007). Les tumeurs présentant des niveaux élevés de Bcl-2 et Bcl-xL peuvent être sensibles au traitement ; le Navitoclax a notamment fait preuve d'efficacité en agent simple dans les leucémies lymphoïdes chroniques. *A contrario*, les tumeurs avec des forts niveaux d'expression de Mcl-1 ou Bcl-2 A1 se révéleront résistantes (Juin et al., 2013; Shamas-Din et al., 2011). En revanche, ce traitement présente l'inconvénient de ne pouvoir être utilisé qu'en dose relativement limitée. En effet, le ciblage et l'inhibition de Bcl-xL a pour conséquence nuisible d'induire une thrombocytopenie du fait de la survie des plaquettes, fortement dépendante de Bcl-xL. C'est pourquoi il a été désigné un BH3-mimétique uniquement sélectif de Bcl-2 : l'ABT-199, sous le

nom clinique de Venetoclax (Souers et al., 2013). En clinique, toujours sur des patients atteints de leucémies lymphoïdes chroniques, la molécule a fait preuve d'autant d'efficacité que le Navitoclax sans induire de baisse des niveaux de plaquettes. La structure de la molécule est telle qu'il se forme un pont hydrogène entre le groupe aza-indole de l'ABT-199 et le résidu acide aspartique en position 103 de Bcl-2, l'un des rares acides aminés non retrouvé dans la poche hydrophobe P₄ de Bcl-xL ce qui lui confère sa spécificité pour Bcl-2. Il a récemment été designé un inhibiteur sélectif de Bcl-xL : le Wehi-539 où deux ponts hydrogènes dans la poche hydrophobe P₂ entre le benzothiazole (Wehi-539) et la leucine 108 (Bcl-xL), et l'hydrazone (Wehi-539) et la sérine 106(Bcl-xL) confèrent la spécificité de liaison (Lessene et al., 2013). Ce traitement est principalement utilisé comme outil d'étude des fonctions de Bcl-xL notamment dans les cancers. La protéine anti-apoptotique Mcl-1 est la principale cause de résistance à l'ABT-737 et -263 de ce fait des inhibiteurs spécifiques ont été développés, l'un d'eux étant la molécule A-1210477 (Bruncko et al., 2015). L'utilisation en agent simple ou en co-traitement avec le Venetoclax ou Navitoclax a fait preuve d'efficacité sur une variété de lignées cellulaires tumorales et constitue une stratégie thérapeutique prometteuse (Phillips et al., 2015). Un système cellulaire dit de « mito-priming » a récemment été développé pour générer des addictions cellulaires à des anti-apoptotiques donnés. La spécificité des BH3-mimétiques présentés ci-dessus et celle de l'inhibiteur A-1210477 ont été confirmées dans ce système indiquant son utilité pour le criblage d'inhibiteurs spécifiques des anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Lopez et al., 2016).

Bien que ces thérapies sélectives soient encourageantes, certains travaux indiquent que tous les complexes anti – pro-apoptotiques ne sont pas sensibles de façon équivalente aux BH3-mimétiques. Des travaux d'Andrews mentionnent une persistance des interactions entre Bim et Bcl-2 ou Bcl-xL sous traitement ABT-737, à l'inverse des complexes Bad ou Bid – Bcl-xL ou Bcl-2, mesurée par approches FLIM-FRET sur cellules entières. Les études contrôlant la spécificité des BH3-mimétiques pour les anti-apoptotiques et validant la preuve de concept qu'ils rompent les complexes pro – anti-apoptotiques ont principalement été réalisées dans des contextes acellulaires. En accord avec le modèle « embedded together » qui soutient un rôle essentiel des membranes dans les complexes de la famille Bcl-2, Andrews évoque l'hypothèse que l'ABT-737 ne serait pas en mesure de rompre les complexes Bim – Bcl-xL pré-existants aux membranes (Aranovich et al., 2012). Le travail de thèse de Jessie Pécot auquel j'ai contribué indiquent que tandis que les complexes Bax/Bak ou Bid – Bcl-xL sont sensibles au Wehi-539, les complexes Puma ou Bim – Bcl-xL ne le sont pas. Ces résultats reposent sur des mesures d'interaction par BRET (*Bioluminescence*

Resonance Energy Transfert) en cellule entière. Le contexte membranaire s'est également révélé critique dans notre étude car tandis que le complexe entre Puma et Bcl-xL aux mitochondries est résistant au Wehi-539, le complexe Puma – Bcl-xL Δ C cytosolique y est sensible (Pécot et al., *in press* ; **Annexe 2**). Il apparaît donc une fois de plus que la localisation des protéines de la famille Bcl-2, et par conséquent leur mobilité intracellulaire, soient des propriétés extrêmement importantes dans le contrôle de leur fonction.

D. La voie pRb/E2F1

La voie pRb/E2Fs est au cœur du processus de tumorigénèse puisqu'elle se voit dérégulée dans une grande majorité des tumeurs humaines. En effet, la mutation du gène RB est associée à la survenue de rétinoblastomes comme d'ostéosarcomes (Friend et al., 1986). La réintroduction du gène dans des cellules issues de ces deux types de cancers inhibe les propriétés tumorales de ces cellules. En effet, cela modifie leur morphologie, rétablit un taux de croissance normal, et inhibe leur capacité à former des colonies en agarose ou des tumeurs *in vivo* (Huang et al., 1988). De ces observations, la protéine pRB a été définie comme suppresseur de tumeur.

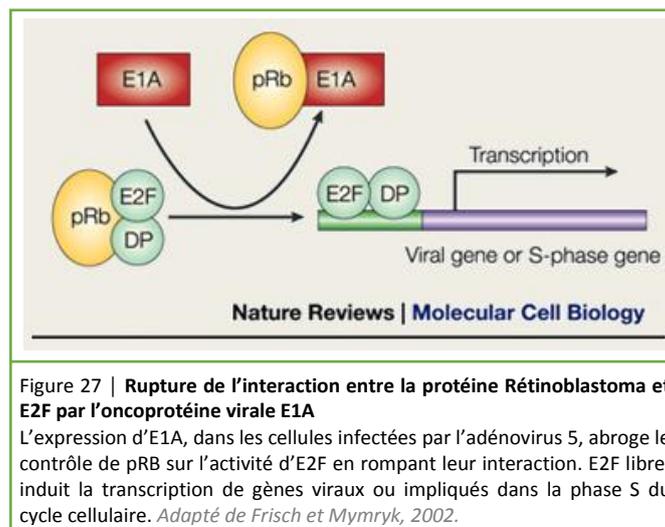
Afin de comprendre quels bénéfices les cellules tumorales peuvent obtenir en perturbant le fonctionnement de la voie pRB/E2F, il est nécessaire d'explicitier le fonctionnement de cette voie de signalisation, présenter les différents membres qui la composent, ainsi que les fonctions biologiques auxquelles elle se retrouve liée.

I. Les facteurs de transcription E2Fs : toute une famille

1. Découverte de pRB/E2F : une histoire vieille de 30 ans

L'identification de la première protéine E2F remonte à 1986, au cours d'une étude sur les adénovirus de type 5. Les travaux de Kovesdi avaient pour but de comprendre les mécanismes induisant la transcription des gènes viraux précoces codant notamment les protéines virales E1A (*Early Region 1A*) et E4. A cette époque, la protéine virale E1A est désignée comme oncogène du fait de son association au processus de transformation tumoral. Dans son étude, Kovesdi identifie un constituant cellulaire capable de lier le promoteur E2 des gènes viraux précoces et d'induire sa transactivation. Il lui attribue le nom de « E2F : E2 Factor » (Kovesdi et al., 1986; Yee et al., 1987). La liaison d'E2F au promoteur E2 est peu stable mais suffisante pour induire sa transcription. Celle-ci se retrouve néanmoins nettement améliorée lors de l'association de la protéine virale E4 à E2F (Reichel et al., 1989). Mais des constituants cellulaires se complexent avec E2F formant des hétérodimères, inhibant cette interaction avec E4. C'est à ce niveau qu'intervient la protéine virale E1A, qui dissocie ces hétérodimères, permettant à E2F libre d'interagir avec E4 (Bagchi et al., 1990). Cela constitue une boucle d'amplification de la transcription du promoteur E2 et donc de synthèse de la protéine virale E1A. Le facteur de transcription cellulaire E2F se retrouve exploité par l'adénovirus, contribuant de ce fait à l'action oncogénique d'E1A. Beaucoup d'intérêts ont été

accordés au rôle d'E1A dans les cellules pouvant expliquer ses effets oncogéniques. Il se trouve qu'en 1988, Whyte identifie la protéine pRb comme interagissant d'E1A (Whyte et al., 1988). Or pRb fut également le premier partenaire d'E2F à être mis en évidence peu de temps après. Il s'avère que le complexe E2F – pRB est dissocié par la protéine E1A et que la protéine pRb inhibe les fonctions transcriptionnelles d'E2F (Bagchi et al., 1991; Chellappan et al., 1991). En intégrant l'ensemble de ces découvertes, E2F constitue le lien unissant la protéine suppressive de tumeur pRB et l'oncoprotéine virale E1A (**Figure 27**) (Frisch et Mymryk, 2002).



De ces études sur les adénovirus découlent les premières évidences des fonctions biologiques auxquelles sont rattachées les protéines pRB et E2F. La séquence du site de liaison d'E2F au promoteur E2 a été caractérisée et retrouvée au niveau de promoteurs de gènes cellulaires. Des homologies de séquence ont été mises en évidence au niveau du promoteur du gène MYC qui fut le premier gène cellulaire cible régulé par E2F à être découvert, suivi dans la même année par le gène DHFR (Blake et Azizkhan, 1989; Hiebert et al., 1989; Thalmeier et al., 1989). Du fait de sa capacité à transactiver les promoteurs de ces gènes cibles, E2F se voit attribuer la fonction d'activateur transcriptionnel. Les gènes MYC et DHFR sont associés à la progression du cycle cellulaire. Un modèle est donc proposé où E2F contrôlerait l'expression de gènes du cycle cellulaire et où pRB exercerait une régulation négative afin d'éviter une prolifération incontrôlée.

2. La famille E2F/pRB prend de l'ampleur

En réalité ce n'est pas un E2F mais 9 facteurs de transcription E2Fs qui ont été à ce jour découverts, transcrits à partir de 8 gènes distincts : E2F1 à E2F8 (**Figure 28**). Il existe deux protéines E2F3a et E2F3b, codées par le même gène mais leur transcription implique des promoteurs distincts (promoteur alternatif pour E2F3b) (Adams et al., 2000; Leone et al., 2000). L'ARNm d'E2F7 peut subir un épissage alternatif générant deux isoformes : E2F7a et E2F7b (Di Stefano et al., 2003). L'ensemble de ces protéines E2Fs possède au moins un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et tous présentent la capacité de lier les séquences consensus des sites E2F (Chen et al., 2009). Néanmoins les facteurs E2Fs se distinguent au niveau des gènes cibles qu'ils régulent. La transcription de certains sous-ensembles de gènes peut aussi bien être régie par plusieurs E2Fs qu'être spécifique de l'un d'eux. La spécificité des E2Fs repose sur les séquences d'ADN au niveau des promoteurs et dépend de leur interactome.

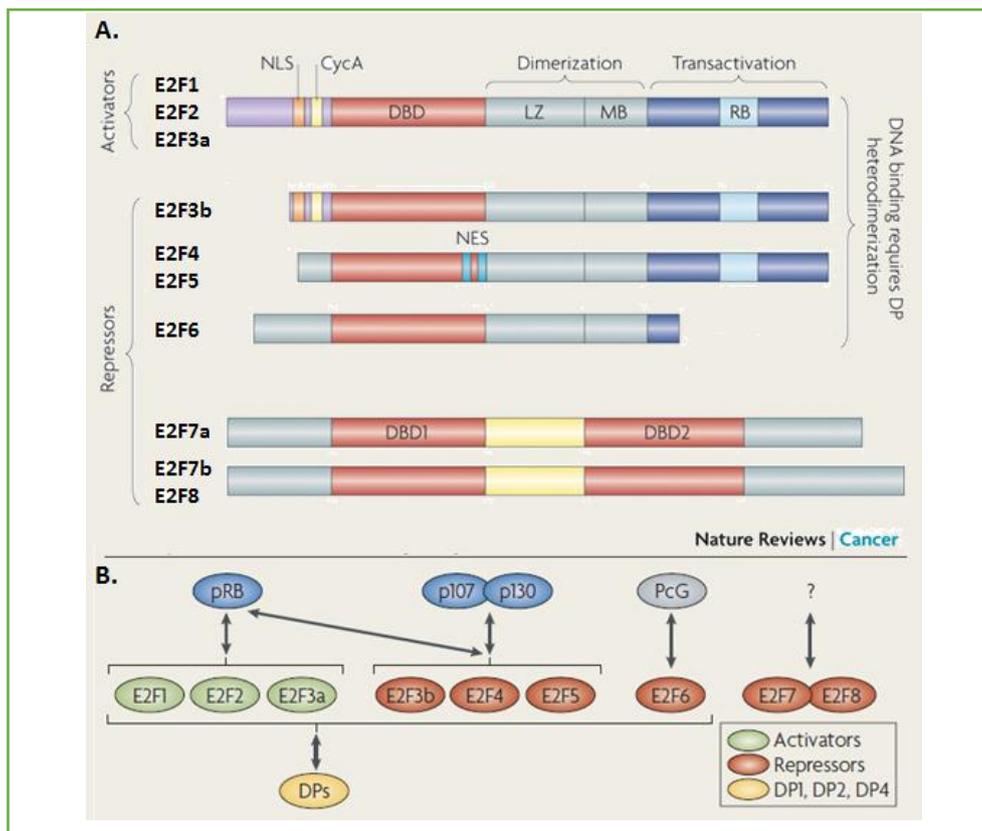


Figure 28 | Structure des E2Fs et interaction avec les protéines des familles pRB et DP

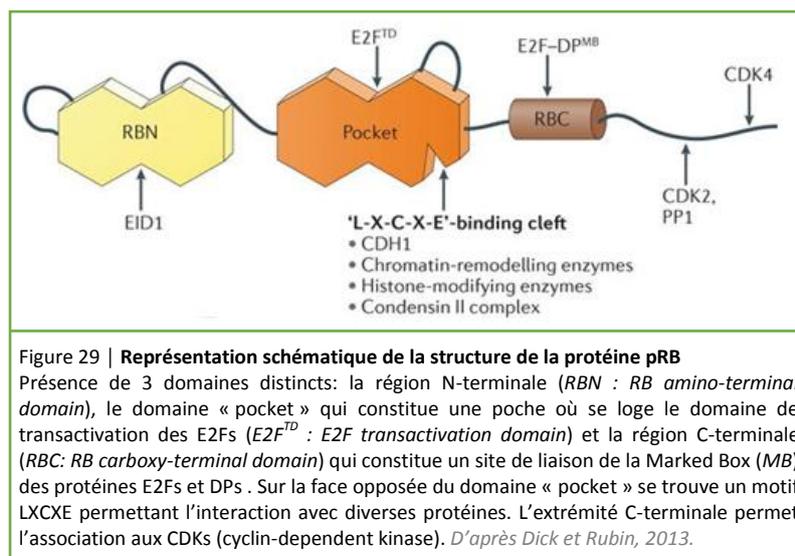
(A). La famille des E2Fs comprend 9 membres codés par 8 gènes distincts. Traditionnellement la famille est divisée en deux sous-classes: les activateurs (E2F1-E2F3a) et les répresseurs (E2F3b-E2F8) de la transcription de gènes cibles. Les membres E2F1-E2F6 possèdent un domaine de dimérisation comprenant une région « leucine zipper » et une Marked Box. Les membres E2F1-E2F5 présentent un site de liaison aux protéines de la famille pRB au niveau du domaine de transactivation, absent des E2F6-E2F8. Les E2F7 et -8 ont la particularité de posséder 2 domaines de liaison à l'ADN. Les protéines E2F3a et -3b sont issues d'une transcription dépendante d'un promoteur alternatif tandis que les isoformes E2F7a et -7b sont générées suite à un épissage alternatif. *Adapté d'après Chen et al, 2009.* **(B).** Sélectivité des protéines à poche selon les E2Fs: pRB s'associe à tous les E2F1 à -5 tandis que p130 et p107 sont sélectifs des E2F3b à -5. La protéine E2F6 forme des complexes avec les composants du groupe Polycomb (PcG). Les membres E2F1-E2F6 lient l'ADN sous forme hétérodimérique, associés à un partenaire de la famille DP par leur domaine de dimérisation alors que les membres E2F7-E2F8 forment des homo ou hétérodimères pour lier l'ADN. *D'après van den Heuvel et Dyson 2008.*

3. Structure protéique des facteurs de transcription E2Fs

Sur le plan structural, les facteurs E2F1 à 6 possèdent un domaine de dimérisation adjacent au DBD qui leur permettent de s'hétérodimériser avec les membres de la famille DP (*Differentiation-regulated transcription factor-1 Polypeptide*) qui comprend 3 protéines : DP1, DP2/3, DP4. L'homologue murin de DP2 est nommé DP3 en référence à son analogie à la protéine DP3 chez le xénope. C'est pourquoi le second membre de la famille DP est souvent nommé sous ses deux appellations DP2/DP3. Les facteurs E2Fs et les protéines DP partagent des domaines DBD et DM très conservés. Les hétérodimères formés d'une sous-unité E2F et d'une sous-unité DP présentent une très forte affinité de liaison pour l'ADN. Les protéines DP ne possèdent aucun domaine permettant de transactiver le promoteur de gènes cibles, leur action principale consiste donc à augmenter l'affinité de liaison à l'ADN des E2Fs. Ces derniers lient préférentiellement l'ADN lorsqu'ils sont complexés à leur partenaire DP générant ainsi des facteurs de transcription pleinement actifs. Les facteurs E2F7 et E2F8 sont les derniers membres de la famille à avoir été identifiés (Christensen et al., 2005; Di Stefano et al., 2003). Ce sont les seuls facteurs E2F dépourvus du domaine de dimérisation. En revanche, ils possèdent une répétition en tandem du DBD. Les études structurales ont mis en évidence l'existence d'homodimères E2F8, E2F7 et potentiellement d'hétérodimères entre ces deux E2Fs. Une analogie structurale est retrouvée entre les dimères [DBD d'E2F4 – DBD de DP2] et [DBD1 d'E2F8 – DBD2 d'E2F8] qui explique comment E2F7 et E2F8 lient l'ADN avec une forte affinité en absence d'hétérodimérisation avec les protéines DP (Morgunova et al., 2015).

La structure des E2Fs diffère également par la présence ou non de deux domaines dans la région C-terminale que sont la « Marked Box (MB) » (partie intégrante du domaine de dimérisation) et le domaine de transactivation. En effet, seuls les cinq premiers membres de la famille E2Fs possèdent ces domaines. Le domaine de transactivation comprend un site de liaison aux protéines de la famille pRB. Cela signifie que les fonctions transcriptionnelles des facteurs E2F1 à 5 sont sujettes à une régulation par les protéines de la famille pRB, *a contrario* des autres E2Fs (van den Heuvel et Dyson, 2008). Par ailleurs, les protéines DP sont également en possession d'une Marked Box et d'un site de liaison aux protéines relatives à pRB. La famille pRB est plus communément nommée la famille des « Pocket Proteins » ou « Protéines à poche ». Elle tient son appellation de la structure atypique des membres qui la composent comprenant une région N-terminale suivie d'un domaine « pocket » et d'une région C-terminale. La famille des protéines à poche comprend la protéine pRB et deux autres membres p107 et p130. Les différences structurales entre ces

protéines introduisent une spécificité de liaison pour certains facteurs E2Fs. En effet, les membres E2F1 à 3 s'associent presque de manière exclusive à pRB, tandis qu'E2F4 lie avec une forte affinité autant p107 que p130 et dans certains cas pRB. Le facteur E2F5, quant à lui, n'interagit qu'avec p130 (Liban et al., 2016). D'un point de vue moléculaire ces interactions impliquent plusieurs sites entre les protéines à poche et les facteurs E2Fs (**Figure 29**). Un 1^{er} site d'interaction correspond à la liaison du domaine « pocket » des protéines à poche avec certains résidus du domaine de transactivation des E2Fs. Un second site d'interaction est observé entre la région C-terminale des protéines à poche et la Marked Box des E2Fs ainsi que celle de leur partenaire DP (Rubin et al., 2005). Outre son implication dans la liaison aux protéines à poche, le domaine Marked Box intervient dans des interactions protéiques avec divers partenaires régissant notamment la spécificité des E2Fs pour des sous-ensembles donnés de gènes cibles (Hallstrom et Nevins, 2003). Pour prendre un exemple, la protéine virale E4 assure une spécificité d'E2F pour le promoteur E2 via une interaction avec la Marked Box (JOST et al., 1996).



La région C-terminale n'est pas la seule distinction qui est retrouvée entre les E2Fs. En effet, des différences sont également observées au niveau N-terminal et en amont du domaine de dimérisation. Seuls les trois premiers E2Fs possèdent dans leur région N-terminale un domaine de liaison à la cycline A suivi d'une séquence d'import au noyau NLS (*Nuclear Localization Signal*). Il est à noter que dans le cas de la protéine E2F3b, sa région N-terminale est réduite comparée à celle de E2F3a et ne comprend plus le domaine de liaison à la cycline A. Des variabilités en amont du domaine DM sont détectées entre les E2Fs. En effet, seuls E2F4 et E2F5 possèdent une séquence NES (*Nuclear Export Signal*) d'export du noyau vers le cytoplasme. Il a été proposé que leur

localisation nucléaire résulte de leur association à la protéine DP2 qui possède une séquence NLS ou aux protéines de la famille pRB (Allen et al., 1997). Néanmoins dans le cas d'E2F5, des études mécanistiques semblent contredire ce modèle et mentionnent l'existence d'un transport actif, uniquement dépendant des séquences protéiques permettant la navette entre noyau et cytoplasme, modulé au cours du cycle cellulaire (Apostolova et al., 2002).

4. Classification des membres E2Fs : activateurs ou répresseurs transcriptionnels

A l'origine, trois types de complexes E2Fs ont été proposés conduisant *in fine* à une régulation positive ou négative de la transcription de gènes cibles (**Figure 30**). Il y a les complexes E2F-DP associés au promoteur en l'absence de protéines à poche. Dans ce cas le domaine de transactivation des E2Fs est opérationnel et induit la transcription du gène cible par recrutement de co-activateurs transcriptionnels. Ces mêmes complexes peuvent être liés aux protéines de la famille pRB, auquel cas le domaine de transactivation se retrouve masqué et le complexe est inactif. Il s'agit alors d'une répression passive. Le dernier type de complexe implique également la présence de protéines à poches mais s'accompagne ici du recrutement d'éléments répresseurs de la transcription au niveau du promoteur du gène cible concerné. Cela correspond un mécanisme de répression active.

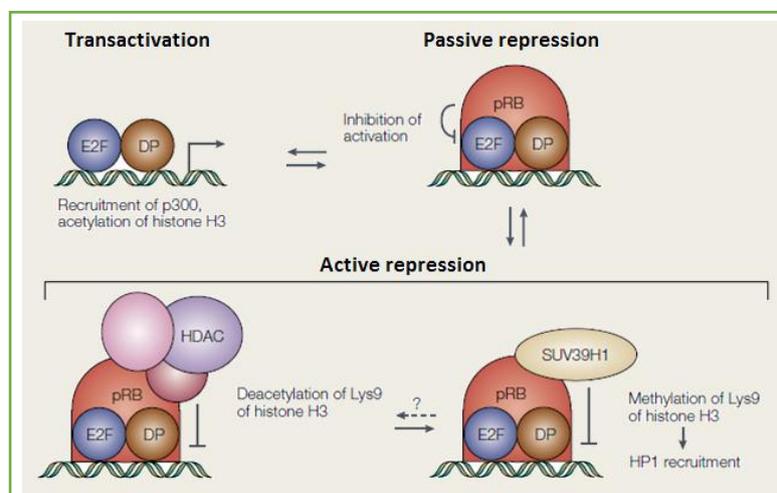


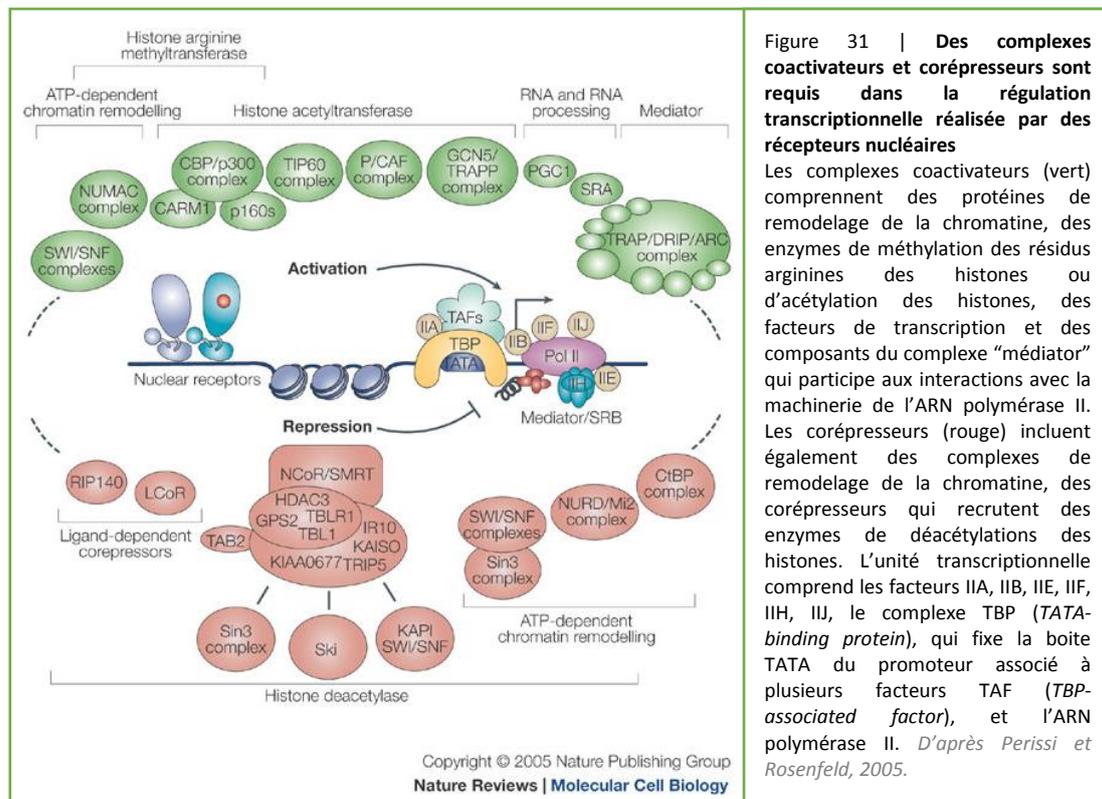
Figure 30 | **Mécanisme général du contrôle de l'activité transcriptionnelle des E2Fs**
 En absence d'interaction avec les protéines à poche, les complexes E2Fs-DP induisent la transcription de gènes cibles. La simple liaison de la protéine pRB inhibe la transactivation des promoteurs cibles par un mécanisme de répression passive. Le recrutement supplémentaire de protéines de modification des histones ou de remodelage de la chromatine constitue un mécanisme de répression active. D'après Trimarchi et Lees, 2002.

Dans un premier temps, c'est donc deux sous-groupes de facteurs E2Fs qui ont été décrits comprenant les activateurs transcriptionnels : E2F1, E2F2 et E2F3a, rendus inactifs lors de leur

association aux protéines à poches, et les répresseurs transcriptionnels : E2F3b, E2F4 et E2F5 qui inhibent activement la transcription via leur association aux protéines à poches. Néanmoins, il a été mis en évidence une conversion possible des E2Fs activateurs en répresseur actifs du fait de leur association aux protéines à poche. A cela s'est greffé un dernier groupe de facteurs E2Fs : E2F6, E2F7 et E2F8, répresseurs transcriptionnels actifs mais dont l'action est indépendante des protéines des familles DP et pRB (DeGregori et Johnson, 2006; Trimarchi et Lees, 2002).

a. Mécanisme d'activation de la transcription par les E2Fs

L'initiation de la transcription est régulée positivement ou négativement par de très nombreux facteurs cellulaires comme indiqué **Figure 31** (Perissi et Rosenfeld, 2005).



Le mécanisme d'activation de la transcription par les E2Fs implique des interactions entre les E2Fs et des constituants du complexe de pré-initiation de la transcription tels que les protéines TBP (*Tata box Binding Protein*) et TFIIB, qui présentent toutes deux de fortes homologies structurales avec le domaine pocket de pRB (Hagemeier et al., 1993; Martin et al., 1995a). Des complexes ont également été observés entre les E2Fs et les protéines TFIID, TFIIA et TFIH (Pearson et Greenblatt, 1997; Ross et al., 1999). Par ailleurs, les facteurs E2Fs participent également au recrutement d'enzymes d'acétylation des histones : HATs (*Histone Acetyltransferases*) telles que CBP/p300, TRAPP/GCN5, ainsi que Tip60 (Lang et al., 2001; Taubert et al., 2004; Trouche et al.,

1996). Ces enzymes, en acétylant les histones, induisent un remodelage de la chromatine adéquat pour permettre l'initiation de la transcription. L'interaction plus récemment identifiée du cofacteur nucléaire ACTR avec E2F1 contribue à la stimulation de la transcription de gènes cibles (Louie et al., 2004).

b. Mécanisme de répression passive de la transcription dépendante des E2Fs

Plusieurs des études mentionnées ci-dessus indiquent une ressemblance structurale entre les co-facteurs recrutés par les E2Fs et le domaine « pocket » des protéines à poche. Une compétition a effectivement été observée dans certains cas entre ces protéines pour la liaison au domaine de transactivation des E2Fs. Ainsi, le mécanisme de répression passive, par pRB et les protéines à poche, repose simplement sur leur interaction avec les complexes E2F-DP qui supprime toute disponibilité du domaine de transactivation pour des associations avec divers co-activateurs transcriptionnels (Kouzarides, 1993).

c. Mécanisme de répression active de la transcription dépendante des E2Fs par les protéines pRB

Tandis que les E2Fs recrutent des enzymes HATs pour augmenter l'acétylation des histones, pRB et ses protéines relatives p107 et p130 sont impliquées dans le recrutement d'enzymes HDACs (*Histone DeAcetylase*) qui exercent l'action inverse en enlevant les acétylations des histones (**Figure 30**). De façon générale, une faible acétylation des histones au niveau d'un promoteur donné est peu propice à sa transactivation. Plusieurs études ont mis en évidence une interaction entre pRB ou p107, p130 avec la protéine HDAC-1, associée à une répression transcriptionnelle (Brehm et al., 1998; Ferreira et al., 1998; Luo et al., 1998; Magnaghi-Jaulin et al., 1998). Les protéines à poche possèdent dans leur domaine « pocket », sur la face opposée au site d'interaction aux E2Fs, un motif bien spécifique « LXCXE », où la lysine, cystéine et l'acide glutamique sont séparés par un acide aminé X variable (Dick et Rubin, 2013). Cette séquence apparaît essentielle à la liaison de pRB aux protéines HDAC-1 et -2, qui possèdent toutes deux un motif semblable (**Figure 29**). En revanche, HDAC-3 qui interagit également avec pRB, ne possède pas ce motif, leur interaction s'effectue différemment (Dahiya et al., 2000). Il a notamment été proposé un recrutement des HDACs par une protéine intermédiaire RBP1, interagissant avec les protéines à poche grâce à son motif LXCXE (Lai et al., 1999). Par ailleurs, un complexe multi-protéique a été observé faisant intervenir E2F1, pRB, HDAC-1 ainsi que DNMT-1. Cette dernière protéine n'est autre qu'une enzyme de méthylation de l'ADN (*DNMT : DNA Methyl Transferase*) qui coopère avec pRB pour réprimer la transcription de promoteurs présentant des sites de liaison aux E2Fs (Robertson et al., 2000). A cela

s'ajoute un rôle des hélicases dépendantes de l'ADN. Ce sont des enzymes capables de restructurer les nucléosomes, et de moduler de la sorte, l'accessibilité du promoteur pour des protéines nucléaires telles que des facteurs de transcription, favorisant le plus souvent la transcription. Des interactions ont été mises en évidence entre des protéines du complexe de remodelage de la chromatine hSWI/hSNF (BRG-1/Brm) et pRB (Dunaief et al., 1994; Singh et al., 1995). Le motif LXCXE a été initialement mentionné comme intervenant dans l'interaction de BRG-1 et pRB, cependant des travaux plus récents indiquent qu'il est en réalité facultatif. Quoi qu'il en soit, dans ce contexte, hSWI/hSNF agit comme répresseur transcriptionnel en favorisant l'activité de déacétylation de HDAC-1 (Dahiya et al., 2000; Zhang et al., 2000). Enfin, des évidences indiquent que pRB s'associe à une enzyme de méthylation des histones H3 : Suv39h1 ainsi qu'à la protéine HP-1 (*Heterochromatine Protein-1*) via son motif LXCXE. Il se trouve que la méthylation des lysines de ces histones crée un site d'interaction pour le chromo-domaine de la protéine HP-1, or son association avec, contribue à la mise sous silence du promoteur concerné (**Figure 30**). Celle-ci peut s'avérer permanente dans le cas d'une propagation des méthylations sur des histones adjacentes au site initial (Nielsen et al., 2001; Talluri et Dick, 2012; Vandel et al., 2001). Les protéines pRB en interagissant avec les complexes E2F-DPs peuvent réprimer activement la transcription, en recrutant diverses protéines impliquées dans la régulation de la structure de la chromatine. En modifiant celle-ci au niveau des promoteurs, sous une forme peu propice à l'initiation de la transcription, ces protéines HDAC, DNMT, et méthylases des histones participent à une répression transcriptionnelle de gènes cibles des E2Fs.

d. Mécanisme de répression active de la transcription directement par les E2Fs indépendamment des protéines pRB et DPs

Les facteurs E2F6, E2F7 et E2F8 agissent en tant que répresseurs transcriptionnels. L'absence de domaines de liaison aux protéines pRB et/ou DPs implique un mécanisme de répression transcriptionnel distinct de celui présenté ci-dessus. Des études indiquent qu'E2F6 exercerait son activité de répresseur transcriptionnel en s'associant à des protéines du complexe polycomb (*PcG*) dont entre autre RYBP, Ring1, MEL-18, mph1 et Bmi1 (Courel et al., 2008; Trimarchi et al., 2001). Un autre complexe entre E2F6 et la protéine EPC-1 (*Enhancer of Polycomb Homolog 1*) du groupe polycomb a été identifié plus récemment, permettant l'association à EZH2 d'une façon dépendante du cycle cellulaire. Le complexe exerce une répression transcriptionnelle sur des gènes rapporteurs (Attwooll et al., 2005). De plus, E2F6 semble agir de façon analogue à pRB car ce facteur est capable d'interagir directement avec BRG-1 permettant un remodelage de la

chromatine en faveur d'une répression transcriptionnelle, notamment au niveau du gène codant E2F1 (Leung et Nevins, 2012). Par ailleurs, un recrutement de la protéine DNMT3b par E2F6 a été observé, responsable d'une mise sous silence de gènes cibles (Velasco et al., 2010). Bien qu'étant les derniers membres découverts de la famille, E2F7 et E2F8 ont été initialement caractérisés en tant que répresseurs transcriptionnels (Christensen et al., 2005; Di Stefano et al., 2003). Dans le cas d'E2F7, l'un des mécanismes décrits correspond au recrutement de CtBP2 : corépresseur transcriptionnel par E2F7 notamment au niveau du gène codant E2F1 (Liu et al., 2013; Zhao et al., 2014). Concernant E2F8, hormis l'identification de cibles, dont l'expression est régulée négativement, les mécanismes moléculaires impliqués restent à explorer.

e. Deux groupes d'E2Fs : activateurs et répresseurs, une classification discutable

Initialement, deux catégories d'E2Fs sont décrites, séparant les activateurs E2F1, -2 et -3a du reste de la famille considéré comme des répresseurs. S'il est vrai que dans une vaste majorité des études, les fonctions des E2Fs se restreignent à ces sous-groupes, il y a cependant certaines exceptions à la règle. En effet, une étude de Müller indique que sur 1240 gènes cibles dont l'expression est régulée par les E2Fs activateurs, 58% sont induits tandis que 42% sont réprimés (Müller et al., 2001). Le facteur E2F1 est notamment responsable d'une répression transcriptionnelle des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 : Mcl-1 et Bcl-2 (Croxtton et al., 2002; Eischen et al., 2001). De même, la surexpression d'E2F4 induit une répression de 128 gènes cibles contre 167 induits (Lee et al., 2011). Une fonction d'activateur transcriptionnel au niveau des gènes du cycle cellulaire a été décrite pour E2F5 dans un contexte cellulaire spécifique d'infection par le virus du papillomavirus HPV-18 (Teissier et al., 2010). Il a été également reporté un rôle d'activateur transcriptionnel pour E2F7 et E2F8 au niveau du promoteur du gène codant VEGF-A, grâce à un complexe avec la protéine HIF-1 (Weijts et al., 2012). Au vu de ces différentes études, il est évident que la simple classification des membres E2Fs en activateurs ou répresseurs s'avère imparfaite et souligne la complexité des rôles que présente la famille des facteurs de transcription E2Fs.

5. L'intégralité des membres de la famille E2Fs intervient dans le cycle cellulaire

Pour rappel dès les années 1989, les E2Fs avaient été associés à la transcription de gènes cibles impliqués dans la progression du cycle cellulaire (DHFR et MYC). Il fut rapidement confirmé un rôle des différents membres de la famille E2Fs au cours du cycle cellulaire (**Figure 32**). En effet, la surexpression des E2Fs activateurs (E2F1-E2F3) dans des fibroblastes quiescents stimule la

reprise du cycle cellulaire, ce que ne sont pas capables d'induire les E2Fs répresseurs (E2F4 et E2F5) (Johnson et al., 1993; Lukas et al., 1996). A l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires expliquant le rôle des E2Fs au cours du cycle cellulaire sont relativement bien décrits. Ces protéines agissent de façon concomitante avec la voie des cyclines – CDK – CDKi, qui sont les acteurs majeurs de la régulation du cycle cellulaire.

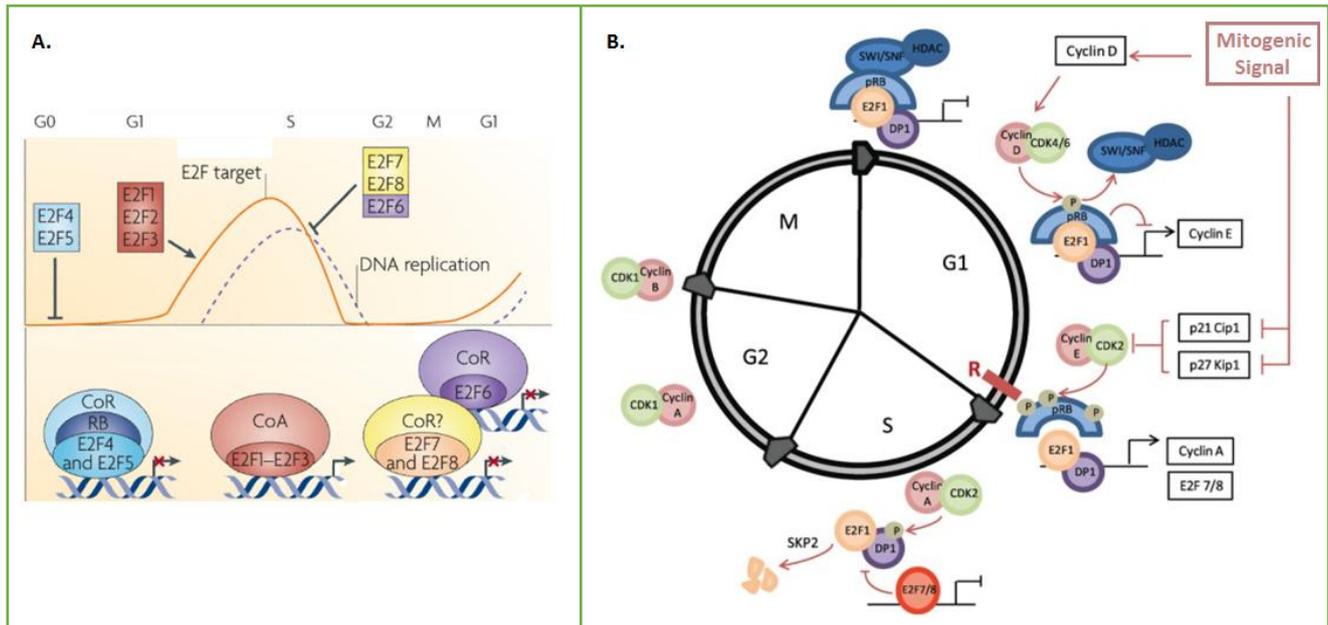


Figure 32 | Expression et activité des E2Fs au cours du cycle cellulaire

(A). Dans les cellules quiescentes (G₀), E2F4 et -5, exprimés de façon ubiquitaire, sont associés aux protéines à poche avec des corépresseurs et répriment les gènes cibles des E2Fs. Un stimulus mitogénique induit la reprise du cycle cellulaire avec une inactivation des E2F4 et -5 et à l'inverse une pleine activité des E2F1-E2F3, complexés à des coactivateurs. Pendant la progression de la phase G₁ vers la phase S, les gènes cibles des E2Fs sont transcrits. Leur expression ainsi que l'activité des E2Fs activateurs sont atténuées à l'approche de la phase S par l'action répressive des E2F7 et -8, homo ou hétérodimérisés et celle d'E2F6 associé à des corépresseurs. Adapté d'après Chen et al., 2009. (B). Au début de phase G₁, E2F1 est maintenu inactif par son complexe avec pRB, qui d'une part bloque son domaine de transactivation (répression passive) et d'autre part recrute les enzymes HDACs et le complexe hSWI/hSNF (répression active). Après stimulation mitogénique, l'expression de la cycline D est induite. La protéine forme un complexe actif avec les CDK4 et -6 qui phosphoryle pRB, rompant les interactions avec HDACs et le complexe hSWI/hSNF. S'en suit la transcription du gène cible codant la cycline E et son accumulation en fin de phase G₁. Son complexe avec CDK2 conduit à une hyperphosphorylation de pRB qui se dissocie d'E2F1. Plusieurs autres gènes cibles se retrouvent induits dont la cycline A ou des gènes pour la réplication de l'ADN. En fin de phase S, E2F1 est inactivé: son partenaire DP1 est phosphorylé et leur complexe est rompu, E2F1 est ciblé à la dégradation par Skp2 et son expression est réprimée par les E2F7 et -8. Adapté d'après Roworth et al., 2015.

a. Les E2Fs répresseurs sont en action durant la phase G₀

Dans un état de quiescence, l'expression des E2Fs activateurs est réprimée par les complexes E2F4 – p130 fixés au promoteur de leur gène, associés notamment à des enzymes HDACs (Gaubatz et al., 2000; Rayman et al., 2002; Takahashi et al., 2000). Un rôle des complexes E2F5 – p130 a été suggéré mais reste à confirmer. Durant cette phase G₀ du cycle cellulaire, il y a néanmoins une faible expression des E2Fs car des complexes E2F1, -2 ou -3 séquestrés par les protéines à poches sont présents au noyau. D'autre part durant cette phase, deux familles d'inhibiteurs des CDKs (Cyclin Dependant Kinase) régulent négativement leur activité. La famille p21 comprenant les protéines p21, p27 et p57 exercent leur action en fixant les deux sous-unités des

complexes cyclines – CDKs inhibant de la sorte l'activité kinase et la liaison aux substrats. La famille des CDKi INK4 comprend 4 membres INK4A à D qui inhibent spécifiquement les CDK4 et -6, empêchant leur liaison aux cyclines (Duronio et Xiong, 2013). Ainsi durant la phase G_0 , non seulement l'expression des E2Fs activateurs et des cyclines D est au plus bas, mais en plus les complexes E2Fs-DP ou CDK – Cyclines résiduels sont maintenus inactifs par leurs régulateurs respectifs.

b. Les E2Fs activateurs : rôle central dans la transition des phases G_1/S

En présence d'un stimulus mitogénique, différentes voies de signalisation peuvent être déclenchées telles que les voies des MAPKs, des récepteurs intégrines ou NF κ B, Wnt/Notch *etc.* De façon générale, leur action converge vers une induction de l'expression de cyclines D, spécifiques à la phase G_1 (Duronio et Xiong, 2013). Les complexes CDK4/CDK6 – Cycline D deviennent actifs et vont pouvoir exercer leur activité kinase en phosphorylant différents substrats dont les protéines à poches. En l'occurrence, p130 se retrouve séquentiellement phosphorylé puis ubiquitiné, favorisant sa dégradation protéosomale (Bhattacharya et al., 2003; Tedesco et al., 2002). Cela a pour conséquence de diminuer les complexes p130 – E2F4 et d'induire une relocalisation du facteur E2F4 du noyau vers le cytoplasme, limitant ainsi son activité de répression transcriptionnelle (Verona et al., 1997). En outre, cette phosphorylation initiale des protéines à poches permet une activation partielle des complexes E2Fs activateurs/DPs, qui induisent alors l'expression de la cycline E. Il a été proposé que bien que les protéines à poche restent associées aux E2Fs, leur phosphorylation relargue les protéines HDACs et/ou hSWI/hSNF. La répression s'avère alors insuffisante et permet la transactivation du promoteur de la cycline E. Cependant, ce mécanisme n'est pas applicable à tous les gènes cibles des E2Fs ; la cycline E est considérée comme un gène précoce tandis que d'autres cibles, encore maintenues sous répression transcriptionnelle, sont exprimées plus tardivement (Poppy Roworth et al., 2015). Par ailleurs, les E2Fs activateurs effectuent une boucle d'auto-activation en induisant l'expression de leur propre gène conduisant à leur accumulation durant la phase G_1 , permettant d'amplifier le signal. S'en suit une activation de CDK2, d'une part grâce à la synthèse de Cycline E par les E2Fs et d'autre part grâce à la neutralisation des CDKi de la famille p21 par les complexes CDK4/6 – Cycline D, dont l'activité kinase n'est pas inhibée suite à cette association. En fin de phase G_1 , les complexes CDK2 – Cycline E vont induire une hyperphosphorylation de pRB, inactivant complètement la protéine et provoquant sa dissociation des complexes E2Fs/DPs. Cela va permettre une pleine activité transcriptionnelle des E2Fs activateurs au niveau de nombreux gènes cibles impliqués dans la transition G_1/S , la phase S et la

réplication de l'ADN. Parmi ces cibles sont retrouvés des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire dont la Cycline A, des constituants du complexe de pré-réplication de l'ADN : ORC, MCMs et Cdc6, des enzymes agissant directement sur le processus de réplication de l'ADN : la ribonucleotide réductase, la thymidine kinase et thymidylate synthase ou l'ADN polymérase- α (Ren et al., 2002).

Durant la transition diverses protéines sont susceptibles de lier E2F1 et de promouvoir l'activation de la transcription de ces gènes cibles. C'est notamment le cas du facteur d'épissage alternatif SRSF2, qui se retrouve sous une forme phosphorylée en présence de stimulus mitogénique, alors en mesure d'interagir avec E2F1. Leur association permet une régulation positive des fonctions transcriptionnelles d'E2F1 et semble requise pour la transactivation du gène codant la cycline E (Edmond et al., 2013). De façon semblable, il a été mis en évidence un rôle de la protéine anti-apoptotique cIAP-1 dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle d'E2F1 au niveau de cibles du cycle cellulaire. En effet, lorsque la protéine cIAP-1 est localisée au noyau, elle apparaît recrutée au promoteur de gènes codant les cyclines d'une manière dépendante de la progression du cycle cellulaire. Sa présence en début de phase S sur le promoteur de la cycline E et en fin de phase S sur celui de la cycline A contribue au recrutement d'E2F1 sur ces sites et à la transactivation de ces derniers (Cartier et al., 2011). Une autre protéine anti-apoptotique Api-5 augmente la liaison d'E2F1 à ces promoteurs cibles et régule positivement son activité transcriptionnelle. Mais dans ce cas le mécanisme impliqué reste à élucider car aucune interaction n'a été détectée entre les deux protéines (Garcia-Jove Navarro et al., 2013).

c. Atténuation de l'activité des E2Fs activateurs en fin de phase S

Une fois la transition G_1/S effectuée, plusieurs niveaux de régulations interviennent pour atténuer l'action des E2Fs activateurs. En milieu/fin de phase S, les complexes CDK2 – Cycline A vont se lier aux hétérodimères E2Fs/DPs au niveau de la région N-terminale des E2Fs et provoquer la phosphorylation des deux partenaires. Dans le cas d'E2F1, la phosphorylation s'effectue sur la sérine 375 ce qui diminue considérablement sa capacité à lier l'ADN et celle de DP1 dissocie leur complexe ainsi que leur association à l'ADN (Guida et Zhu, 1999; Krek et al., 1994; Xu et al., 1994). De façon concomitante, les niveaux des cyclines D et E chutent du fait d'une perte d'activation transcriptionnelle par les E2Fs et d'une dégradation protéosomale augmentée. Cela résulte en une levée de l'inhibition des protéines à poche et donc une restauration de leur fonction répressive sur les E2Fs activateurs. Par ailleurs, parmi les cibles induites tardivement par les E2Fs, se trouve une ubiquitine ligase : Skp2 qui contribue à leur dégradation protéosomale (Marti et al., 1999; Zhang et

Wang, 2006), ainsi que les facteurs E2F6, E2F7 et E2F8 qui répriment la transcription des gènes cibles des E2Fs dont font partie les gènes codant E2F1, -2 et -3 eux-mêmes (Giangrande et al., 2004; Logan et al., 2005).

d. Un rôle certain mais encore mal défini des E2Fs au cours de la phase M

Il est évident que les E2Fs exercent une action principalement dans le contrôle des transitions entre les phases $G_0 - G_1$ et $G_1 - S$, comme indiqué ci-dessus. Néanmoins, plusieurs évidences mentionnent une intervention des E2Fs dans d'autres phases du cycle cellulaire telles que la phase G_2/M . En effet, les E2Fs induisent l'expression de cibles impliquées dans la progression en mitose : cycline B1, -B2, Cdc2/-20/-25a, KifC1 et Bub1 mais aussi des cibles nécessaires à la condensation des chromosomes : smc2 et -4 ; des cibles intervenant dans la duplication des centrosomes : RanBMP ; des cibles du point de contrôle mitotique comme Bub3 et Mad2 ou encore des cibles impliquées dans le processus de ségrégation des chromosomes : protéines des centromères et la securine (Ishida et al., 2001; Müller et al., 2001; Ren et al., 2002). Les mécanismes moléculaires mis en jeu sont mal compris mais peuvent faire intervenir à nouveau des complexes E2Fs/DPs activateurs ou une levée de répression transcriptionnelle médiée par les E2Fs répresseurs grâce à diverses protéines induites au cours du cycle cellulaire.

(Mundle et Saberwal, 2003; Poppy Roworth et al., 2015; Stevaux et Dyson, 2002; Wong et al., 2011)

II. E2F1 : Une protéine aux fonctions si paradoxales

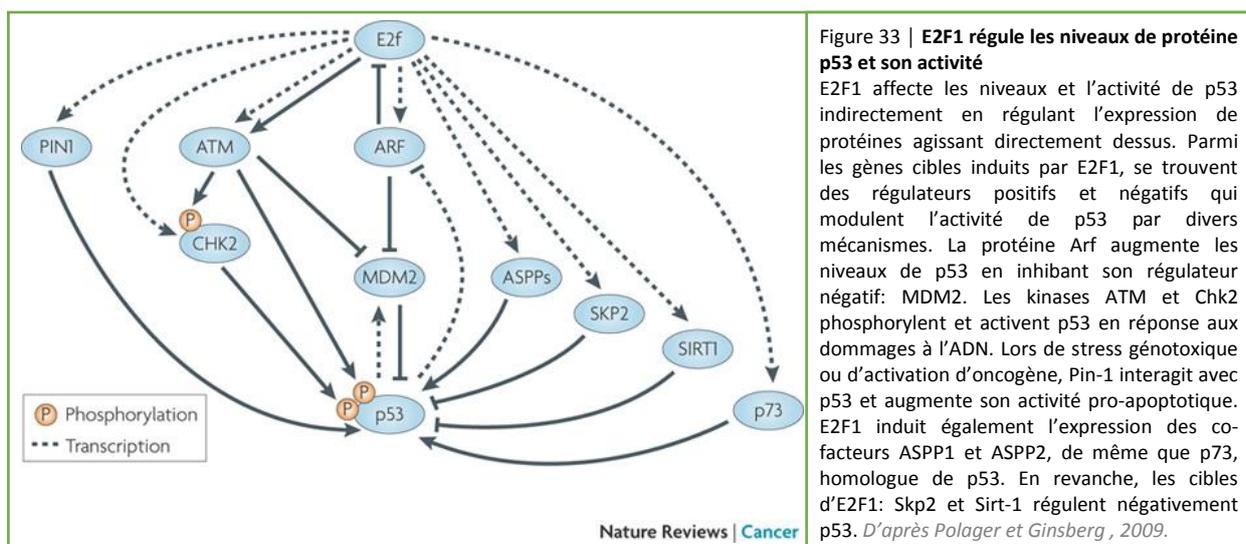
1. Découverte d'un rôle pro-apoptotique d'E2F1

Les approches *in vivo* avec différents modèles murins mutants ont également participé à la mise en évidence du rôle des E2Fs dans la progression du cycle cellulaire. De ces études, en ressort notamment une redondance dans l'action qu'exercent les E2Fs activateurs car la déplétion des 3 gènes E2F1, -2 et -3 est requise pour abroger la prolifération de fibroblastes embryonnaires issus de ces souris (Wu et al., 2001). C'est également grâce à des modèles *in vivo* qu'a été mis en évidence un rôle d'E2F1 dans l'apoptose. En effet, des souris déficientes pour E2F1 présentent une hypercellularité au niveau du thymus due à un défaut d'apoptose des lymphocytes T au cours du processus de sélection négative (Field et al., 1996). Par ailleurs, la déficience de pRB *in vivo* altère la viabilité des souris car ces dernières meurent au stade embryonnaire dû à des défauts d'érythropoïèse, de contrôle du cycle cellulaire et d'apoptose. Il se trouve qu'une déplétion

concomitante d'E2F1 supprime l'excès d'apoptose dans certains tissus indiquant que dans ce contexte E2F1 présente une activité pro-apoptotique accrue en l'absence de pRB (Tsai et al., 1998). Une contribution identique d'E2F3 dans l'excès d'apoptose ou de prolifération a été observée dans ce modèle d'embryons pRB^{-/-} (Ziebold et al., 2001). La surexpression d'E2F3 dans des souris transgéniques induit bien l'apoptose, ce qui s'accompagne d'une accumulation d'E2F1. Cependant, les fonctions pro-apoptotiques d'E2F3 sont indirectes car sa surexpression *in vivo* dans un fond génétique E2F1^{-/-} ne permet plus de les observer (Lazzerini Denchi et Helin, 2005). La pertinence du rôle apoptotique d'E2F1 *in vivo* est flagrante dans les souris E2F1^{-/-} qui développent spontanément à terme différents types de tumeurs (Field et al., 1996; Yamasaki et al., 1996). Cela indique un rôle crucial d'E2F1 dans l'apoptose et en tant que suppresseur de tumeur.

2. Voie d'apoptose initiée par E2F1 et dépendante de p53

Depuis la découverte des fonctions apoptotiques d'E2F1, un nombre considérable d'études a exploré les mécanismes mis en jeu. C'est principalement grâce à la transcription de gènes cibles impliqués dans l'apoptose, qu'E2F1 exerce ce rôle. Dans les travaux sur modèles animaux présentés ci-dessus, il avait été mis en évidence une activation de p53 lors des processus de mort régulée par E2F1. Il est à présent bien décrit qu'E2F1 est capable d'induire à la fois une voie d'apoptose dépendante de p53 (**Figure 33**), tout comme une qui ne l'est pas. Pour rappel, p53 est un facteur de transcription qui contrôle l'arrêt du cycle cellulaire et le déclenchement de l'apoptose en cas de force majeure, comme la présence de lésions à l'ADN irrécupérables.



a. Stabilisation de p53 par E2F1

Parmi les cibles régulées par E2F1, se trouvent diverses protéines intervenant dans le contrôle de la stabilité de p53. p14^{ARF} est l'une de ces cibles, dont la transactivation du promoteur par E2F1 s'effectue au niveau d'un site de liaison non consensus de sorte que les E2Fs activateurs n'induisent pas son expression lors de la progression du cycle cellulaire. Une fois induite, cette protéine rompt les complexes entre p53 et MDM2 : régulateur majeur de p53 qui inhibe son activité transcriptionnelle et le cible à la dégradation protéosomale. Par son action, p14^{ARF} contribue à stabiliser p53 (Bates et al., 1998; Komori et al., 2005). Cependant, les liens qui relient les protéines E2F1 – p53 – p14^{ARF} s'avèrent plus complexes qu'il n'y paraît. En effet, deux boucles de rétrocontrôle négatif sont orchestrées. Dans la première, p14^{ARF} stabilise p53 qui en contrepartie diminue son expression transcriptionnelle (Robertson et Jones, 1998). Dans la seconde, E2F1 induit l'expression de p14^{ARF}, or ce dernier s'associe avec, inhibant son activité transcriptionnelle et le ciblant à la dégradation. Ainsi dans un contexte p53^{-/-}, p14^{ARF} inhibe l'apoptose induite par E2F1 (Eymin et al., 2001a; Mason et al., 2002). Des évidences indiquent que l'apoptose induite par E2F1 subsiste en absence de p14^{ARF} soulignant l'intervention de mécanismes adjacents. Il est notamment observé une accumulation de p53 associée à des phosphorylations sur divers résidus (Russell et al., 2002). En accord avec ces données, il a été montré une régulation transcriptionnelle des kinases ATM et Chk2 par E2F1, intervenant dans la phosphorylation et stabilisation de p53 (Berkovich et Ginsberg, 2003; Rogoff et al., 2004).

b. Stimulation de l'activité transcriptionnelle de p53 par E2F1

La protéine E2F1 induit également l'expression de régulateurs ou co-facteurs de p53. La prolyl-isomérase Pin1 est une cible directe d'E2F1 (Ryo et al., 2002). Or cette enzyme interagit spécifiquement avec p53 sous sa forme phosphorylée en réponse à des dommages à l'ADN. Leur association provoque un changement conformationnel de p53 (Zacchi et al., 2002; Zheng et al., 2002). De plus, la cis-trans isomérisation du résidu Proline 47 de p53 par Pin1 favorise l'interaction de p53 avec Bax et l'activation subséquente de l'effecteur (Follis et al., 2015). Cela conduit d'une part à l'augmentation des complexes p53 – p300, résultant en une élévation de l'acétylation de p53 favorable à ses fonctions transcriptionnelles, et d'autre part à une dissociation des complexes p53 – iASPP : inhibiteur de p53, ce qui requiert une phosphorylation de p53 sur la sérine 46 (Mantovani et al., 2007). Par ailleurs, E2F1 induit également l'expression de la protéine TP53INP1 qui phosphoryle p53 sur ce même résidu (Hershko et al., 2005). Par conséquent, il peut également y avoir dans ce cas-ci une rupture du complexe p53 – iASPP. Parallèlement, la protéine TP53INP1 stimule l'activité

transcriptionnelle de p53 au niveau du promoteur de cibles pro-apoptotiques comme Bax ou PIG (*P53-Induced Gene*) en gène rapporteur (Tomasini et al., 2003). De plus, la transcription de certaines cibles de p53 semble extrêmement sensible à son statut de phosphorylation, c'est notamment le cas du gène codant P53AIP1, qui nécessite la phosphorylation de p53 sur cette même sérine 56 (Oda et al., 2000). Son expression peut donc probablement survenir suite à l'action de TP53INP1. Hormis la levée de l'inhibition de p53 par iASPP, E2F1 induit l'expression des 2 autres membres de la famille ASPP : ASPP1 et ASPP2 (Fogal et al., 2005; Hershko et al., 2005). Or ces deux protéines agissent en tant que co-facteurs de p53 pour promouvoir sa liaison au promoteur de cibles pro-apoptotiques et leur transactivation (Samuels-Lev et al., 2001). Outre ces mécanismes de régulation indirects de la stabilité et/ou activité de p53 par E2F1, il a été proposé une régulation directe impliquant une interaction entre les deux facteurs de transcription. En effet, en réponse aux dommages à l'ADN, E2F1 s'associe avec p53 en usant de son site de liaison initialement destiné à la cycline A. Ce complexe se traduit par une rétention nucléaire de p53 au noyau, augmentant son potentiel pro-apoptotique (Hsieh et al., 2002).

c. Coopération d'E2F1 et p53 pour induire efficacement l'apoptose

Le facteur de transcription E2F1 orchestre donc l'apoptose en partie en promouvant l'activité de p53, néanmoins cela ne constitue pas l'unique mécanisme d'action pro-apoptotique d'E2F1. En effet, E2F1 est capable d'induire un grand nombre de cibles pro-apoptotiques, à l'instar de ce que fait p53. A deux, ils induisent l'expression de cibles spécifiques ou bien communes amplifiant le signal pro-apoptotique. Par exemple, tandis qu'E2F1 induit l'expression des caspases, p53 influe sur l'expression de Bax. Cette induction de cibles spécifiques à chacun d'eux, mais de façon concomitante, crée un processus de coopération entre ces deux protéines. Parmi les cibles communes régulées par ces deux protéines, se trouvent les BH3-Only Puma et Noxa, APAF-1 ou encore SIVA (Polager et Ginsberg, 2009).

d. Boucle de rétrocontrôle négatif d'E2F1 sur l'activité de p53

En revanche, le lien qui unit p53 et E2F1 est relativement complexe et reste encore à définir car E2F1 est également responsable de l'expression de régulateurs négatifs de p53 tels que l'ubiquitine ligase Skp2 et la déacétylase Sirt1 (Wang et al., 2006; Zhang et Wang, 2006). La protéine Skp2 s'associe à p300 inhibant de la sorte l'acétylation de p53, requise pour ses fonctions transcriptionnelles (Kitagawa et al., 2008). La protéine Sirt1, quant à elle, interagit directement avec p53 et le déacétyle. Il en résulte un effet pareil à Skp2, à savoir une réduction de l'activité

transcriptionnelle de p53 et une inhibition de la réponse apoptotique déclenchée par p53 en réponse à différents stress (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001). Cependant, E2F1 régule également l'expression d'un petit ARNm non codant : miR449a/b qui inhibe la synthèse protéique de déacétylase telle que Sirt1, restaurant l'acétylation et les fonctions transcriptionnelles de p53 (Lizé et al., 2010, 2011). L'activation de p53 par E2F1 a été grandement investiguée tandis que son rôle potentiellement répresseur reste à explorer ; notamment concernant le contexte dans lequel sont induites les cibles ci-dessus. Par exemple, l'induction de Skp2 par E2F1 est très bien décrite au cours du cycle cellulaire mais qu'en est-il lors d'un stress ?

3. Voie d'apoptose initiée par E2F1 et indépendante de p53

En réponse à un stress, E2F1 transactive une quantité impressionnante de cibles dont une partie contribue à l'activation de p53, tandis qu'une autre agit sur d'autres étapes de l'apoptose (**Figure 34**). En absence de p53, E2F1 conserve sa capacité à induire l'apoptose, soulignant l'importance de cet autre sous-ensemble de cibles pro-apoptotiques pour ses fonctions.

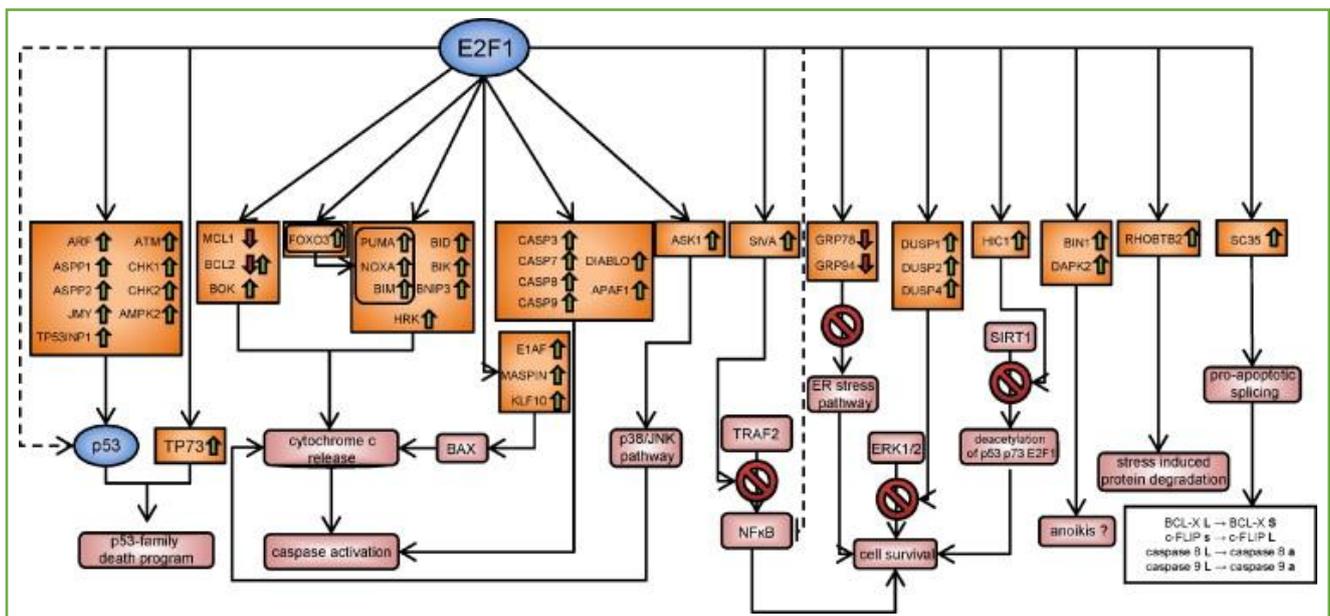


Figure 34 | Représentation des différentes voies apoptotiques dépendante d'E2F1
 E2F1 stimule la voie de signalisation apoptotique relative à la famille p53 en influençant la stabilité de p53 ou en activant la transcription du gène TP73. De plus, E2F1 induit l'expression d'une multitude de protéines effectrices qui déclenchent la libération du cytochrome C et l'activation des caspases. Le programme transcriptionnel pro-apoptotique d'E2F1 se superpose en partie avec celui de FOXO3. En parallèle, E2F1 abroge les voies de signalisation pro-survie, en inhibant NFκB, des chaperonnes du stress du RE, la signalisation ERK et en contrecarrant l'inhibition des acétylations de p53, p73 ainsi que les siennes. E2F1 provoque également un épissage alternatif en faveur de variants pro-apoptotiques. Les cibles d'E2F1 sont en orange, les flèches indiquent les inductions de gènes cibles (vert) ou leur répression (rouge). Les lignes pointillées font références à des interactions protéine-protéine. D'après Engelmann et Pützer, 2010.

a. E2F1 régule l'expression de composants critiques de la voie d'apoptose mitochondriale

La protéine E2F1 est directement reliée à la famille Bcl-2 tant elle module l'expression de plusieurs de ses membres. Il a été observé une induction transcriptionnelle des BH3-Only : Bim, Puma, Noxa et Hrk (Hershko et Ginsberg, 2004) ; Bid (Stanelle et al., 2002) ; Bik (Real et al., 2006). Par ailleurs, E2F1 réprime l'expression des membres anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2 (Croxtton et al., 2002; Eischen et al., 2001). L'expression de la protéine pro-apoptotique Bok est également induite par E2F1 mais dans un contexte un peu particulier de stimulation mitogénique, où Bok constituerait un point de contrôle pour sensibiliser les cellules en division à d'éventuels stress apoptotiques (Rodriguez et al., 2006). Par son action transcriptionnelle, E2F1 perturbe l'équilibre entre les protéines anti et pro-apoptotiques, résultant en une accumulation de ces dernières aux mitochondries. E2F1 est donc l'un de ces éléments déclencheurs de l'activation des effecteurs Bax et Bak. De plus, il contribue à amplifier le signal pro-apoptotique en induisant directement l'expression de cibles intervenant en aval de la perméabilisation des mitochondries par Bax et Bak, telles que les caspases 3, -7, -8 et -9, APAF-1 ou Smac/DIABLO (Cao et al., 2004; Moroni et al., 2001; Nahle et al., 2002; Xie et al., 2006). E2F1 exerce donc indirectement une action en amont et en aval de la MOMP permettant une pleine activation de la cascade des caspases pour une réponse apoptotique efficace.

Le facteur E2F1 induit également l'expression de protéines, qui tout comme lui régulent directement l'expression d'acteurs de la voie d'apoptose mitochondriale. Parmi elles, se trouvent l'une des cibles les mieux caractérisées d'E2F1 : le facteur de transcription p73 (Irwin et al., 2000; Stiewe et Pützer, 2000). La protéine p73 appartient à la même famille que p53 et partage de très nombreuses cibles avec (Jost et al., 1997; Zhu et al., 1998). Ainsi en l'absence de p53, E2F1 est néanmoins capable d'induire une grande partie de ses gènes cibles pro-apoptotiques via p73. Par ailleurs, les facteurs de transcription FOXO-1 et -3a, cibles transcriptionnelles directes d'E2F1 (Nowak et al., 2007), interviennent dans la transactivation des gènes codant Bim, Puma et Noxa (Dijkers et al., 2000; Obexer et al., 2007; You et al., 2006). Sur le même principe, E2F1 induit l'expression du facteur de transcription E1AF, qui présente une activité pro-apoptotique due à sa capacité à lier et induire le promoteur du gène codant Bax. Or l'effecteur Bax n'est pas une cible d'E2F1, expliquant que la protéine E1AF soit requise pour une réponse apoptotique efficace, induite par E2F1 en réponse à des génotoxiques (Liu et al., 2008a; Wei et al., 2008). D'autres cibles pro-apoptotiques d'E2F1 ont été identifiées telles que la Maspine et le facteur de transcription KLF-10, qui apparaissent tous deux requis au cours de l'apoptose induite par E2F1 en réponse à des

chimiothérapies. En revanche, leur mécanisme d'action reste encore à élucider (Ben Shachar et al., 2010; Engelmann et al., 2010).

b. E2F1 induit l'apoptose par des voies détournées

L'un des mécanismes mis en œuvre par E2F1 pour promouvoir l'apoptose consiste à inhiber les signaux anti-apoptotiques et notamment ceux provenant des voies « pro-survie ». L'une des cibles d'E2F1 : SIVA, commune à p53, est responsable de l'ubiquitination et du ciblage de TRAF-2 à la dégradation protéosomale (Fortin et al., 2004; Gudi et al., 2009). La protéine TRAF-2 intervient dans la voie de signalisation du TNF-R afin d'initier l'activation de la voie pro-survie NFκB. Or il a été observé une diminution de l'expression de TRAF-2, dépendante d'E2F1, en réponse à l'activation des récepteurs de mort. Cela permet d'induire pleinement la voie d'apoptose extrinsèque sans que la voie NFκB n'exerce d'effets antagonistes dessus (Phillips et al., 1999). Par ailleurs, E2F1 est capable d'inhiber directement NFκB en se liant à sa sous-unité p65, ce qui résulte en une incapacité du facteur de transcription à lier l'ADN (Tanaka et al., 2002). Sur le même principe, E2F1 induit l'expression de cibles qui inhibent la voie pro-survie des MAPKs, à savoir celle des phosphatases DUSP (*Dual Specificity Phosphatase*). Ces enzymes déphosphorylent la protéine kinase ERK, bloquant ainsi toute transduction de signaux par la voie MAPK (Wang et al., 2007b, 2007c).

La liste des cibles transcriptionnelles d'E2F1 impliquées dans la mort cellulaire ne cesse de s'agrandir, faisant parfois intervenir des mécanismes distincts de ceux présentés ci-dessus. Par exemple, la protéine Bin-1, identifiée comme cible transcriptionnelle d'E2F1, intervient dans la mort cellulaire induite par un stress génotoxique et par E2F1, sans que cela n'implique l'activation des caspases. Les auteurs proposent donc un rôle d'E2F1 via Bin-1 dans la mort cellulaire indépendante des caspases (Cassimere et al., 2009). Le facteur d'épissage alternatif SC-35 fait aussi partie de ces cibles transcriptionnelles d'E2F1 nouvellement identifiées. Son expression est induite par E2F1, suite à l'apparition de dommages à l'ADN, et est requise pour une réponse apoptotique efficace. Le mécanisme moléculaire mis en jeu est inhabituel car E2F1 met à profit l'activité d'épissage de SC-35 pour convertir différents ARNm cibles en faveur d'une forme pro-apoptotique. Il en résulte une diminution de la forme courte de c-FLIP, qui contrecarre l'activation de la caspase 8 dans la voie d'apoptose extrinsèque. Il y a également une augmentation des isoformes pro-apoptotiques des caspases 8 et -9. De même, E2F1 promeut l'épissage alternatif de Bcl-x, diminuant la forme longue anti-apoptotique : Bcl-xL en faveur de la forme courte pro-apoptotique : Bcl-xS (Merdzhanova et al., 2008).

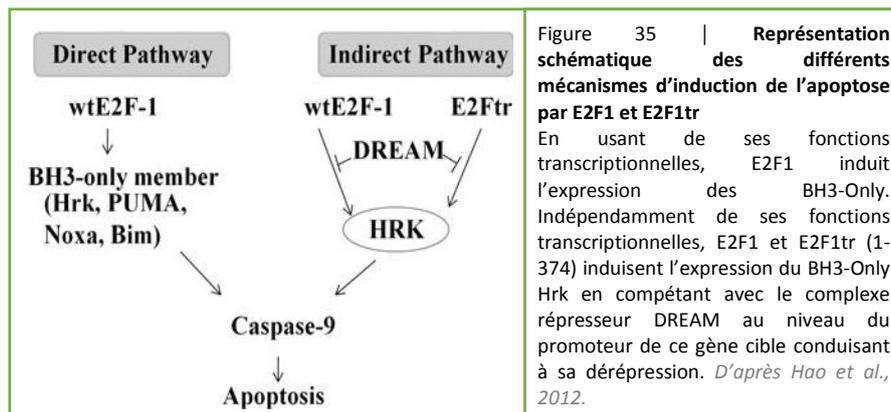
4. Voie d'apoptose induite par E2F1 indépendamment de ses fonctions transcriptionnelles

Deux études parues simultanément mettent en évidence, dans un contexte déficient pour p53, une apoptose induite par E2F1 en absence d'activité transcriptionnelle fonctionnelle (Hsieh et al., 1997; Phillips et al., 1997). Les auteurs utilisent des protéines d'E2F1 tronquées dans leur région C-terminale conduisant à une perte du domaine de transactivation, les rendant de ce fait inactives sur le plan transcriptionnel. Il en résulte néanmoins la mort des cellules, lors de leur surexpression dans ces dernières. Tandis que l'activité transcriptionnelle d'E2F1 ne semble pas indispensable pour ses fonctions apoptotiques, sa capacité à lier l'ADN apparaît en revanche comme un élément critique. En effet, le mutant E2F1 E132, caractérisé pour sa perte de liaison à l'ADN (Cress et al., 1993), ne présente plus d'activité pro-apoptotique. Il est alors proposé un mécanisme de dépression des cibles pro-apoptotiques des E2Fs par ces mutants d'E2F1. Ces derniers entreraient en compétition, au niveau du promoteur de ces cibles, avec des complexes E2Fs/DPs répresseurs, induisant ainsi la transcription de ces cibles pro-apoptotiques.

Les travaux de Bell cherchent à identifier plus précisément le mécanisme par lequel le mutant E2F1 $\Delta C_{(1-374)}$ induit l'apoptose (Bell et al., 2006). Dans un premier temps, les auteurs mettent en évidence une distinction entre les fonctions d'E2F1 dans l'apoptose ou la progression du cycle cellulaire. En effet, alors qu'E2F1 peut se passer de son activité transcriptionnelle pour induire l'apoptose, il ne peut pas en être dit autant pour son rôle dans la progression du cycle cellulaire. A l'aide d'une série de troncation, Bell parvient à identifier le domaine responsable des fonctions apoptotiques non transcriptionnelles d'E2F1, qui correspond à son seul DBD. En effet, dans leur modèle d'étude, le DBD qui n'est ni actif d'un point de vue transcriptionnel, ni capable de lier l'ADN induit néanmoins la mort des cellules lors de sa surexpression. Ces données s'opposent au modèle émis précédemment, mentionnant la nécessité de lier l'ADN pour qu'E2F1 conserve ses fonctions apoptotiques. Les auteurs émettent l'hypothèse qu'E2F1 puisse exercer ses fonctions apoptotiques en partie grâce à un mécanisme indépendant de la régulation transcriptionnelle de gènes cibles (qu'il s'agisse de transactivation, répression ou dépression des promoteurs).

En écho aux précédentes études, l'équipe de Hao a également entrepris une caractérisation des fonctions pro-apoptotiques du mutant E2F1 $\Delta C_{(1-374)}$, aussi nommé E2F1-tr pour forme tronquée. Il met en évidence un mécanisme moléculaire, expliquant au moins en partie, l'induction de l'apoptose par ce mutant en absence d'activité transcriptionnelle (Hao et al., 2012). E2F1 comme sa forme tronquée déclenche l'apoptose dans divers modèles cellulaires. Cela s'accompagne d'une

induction de l'expression du BH3-Only Hrk, qui est nécessaire pour une réponse apoptotique efficace. Les auteurs se lancent dans l'investigation des mécanismes de régulation transcriptionnelle du gène codant Hrk. La présence du complexe répresseur DREAM au niveau du promoteur n'est plus retrouvée lors de la surexpression d'E2F1 et de sa forme tronquée. Cela conduit à une dérégulation du gène et à l'expression de la protéine Hrk, qui peut alors exercer ses fonctions pro-apoptotiques aux mitochondries (**Figure 35**). Cette étude est en accord avec le premier modèle proposé par Hsieh et Phillips mais est contradictoire avec celui de Bell. Il est possible que le mutant E2F1 $\Delta C_{(1-374)}$, exerce en partie son rôle apoptotique grâce à une dérégulation de cibles pro-apoptotiques, et qu'il mette aussi en jeu d'autres mécanismes moléculaires ne nécessitant ni son activité transcriptionnelle, ni sa capacité à lier l'ADN. Il est à noter que l'étude de Hao, E2F1 induit l'apoptose quel que soit le statut p53 des cellules (déficient ou non) et indépendamment de pRB car la troncation C-terminale supprime son site de liaison à E2F1.



5. Mécanismes de régulation des fonctions apoptotiques d'E2F1

a. Régulation par modifications post-traductionnelles

E2F1 est une protéine aux fonctions extrêmement paradoxales pouvant autant promouvoir la progression du cycle cellulaire qu'orchestrer une réponse apoptotique. L'un des mécanismes principal, déterminant quelle sera la fonction d'E2F1, concerne les modifications post-traductionnelles. La protéine présente de nombreux résidus pouvant être ciblés. Il faut savoir que la grande majorité des modifications post-traductionnelles décrites pour E2F1 survient en réponse à un stress cellulaire et a pour objectif de moduler la stabilité de la protéine (Pützer and Engelmann, 2013a).

En effet, en absence de stress, l'expression d'E2F1 comme celles des autres E2Fs est relativement faible et oscille au cours du cycle cellulaire. Pendant la progression du cycle cellulaire, les niveaux intracellulaires d'E2F1 dépassent un 1^{er} seuil dit « mitogénique », ce qui se traduit par une pleine activité transcriptionnelle pour induire l'expression de cibles du cycle cellulaire. En cas d'activation d'E2F1 soutenue et prolongée outre mesure, il a alors été observé la survenue d'apoptose dans des cellules après leur entrée en phase S (Kowalik et al., 1995; Qin et al., 1994). Cela faisant d'ailleurs partie des études princeps *in vitro* à avoir identifié un rôle d'E2F1 dans l'apoptose, ce qui illustre l'importance du contrôle des niveaux intracellulaires d'E2F1. En réponse à un stress, une accumulation conséquente d'E2F1 se produit, amenant à franchir un 2nd seuil dit « apoptotique », à partir duquel E2F1 est destiné à transactiver une multitude de cibles pro-apoptotiques. (**Figure 36**) (Poppy Roworth et al., 2015; Trimarchi et Lees, 2002)

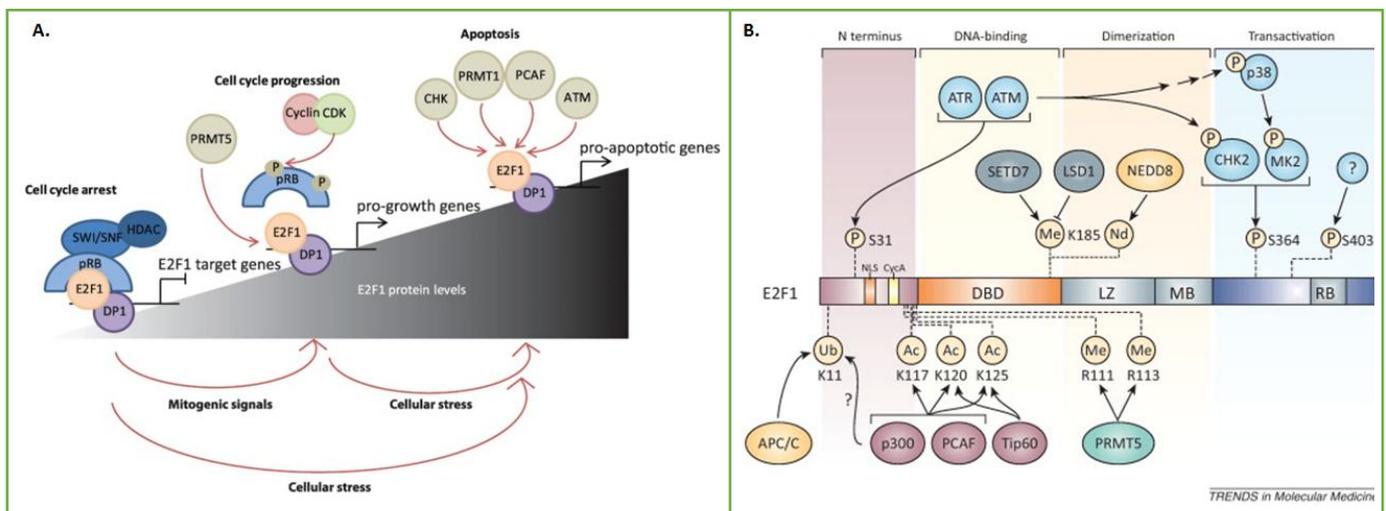


Figure 36 | Régulation des niveaux intracellulaires d'E2F1 et modifications post-traductionnelles associées

(A). Les hétérodimères E2F1-DP1 favoriseraient la prolifération ou l'apoptose en fonction de leur niveau intracellulaire et de leur modifications post-traductionnelles. Les stimulations mitogéniques rompent les complexes avec pRB, permettant la transcription de gènes du cycle cellulaire. Les dommages à l'ADN stabilisent E2F1 par diverses modifications post-traductionnelles, résultant dans la transcription de gènes pro-apoptotiques. D'après Roworth et al., 2015. (B). En réponse aux dommages à l'ADN, les kinases ATM et ATR phosphorylent E2F1 en N-terminal sur la sérine 31. ATM phosphoryle et active Chk2 et active indirectement MK2 par le biais de p38. Chk2 et MK2 phosphorylent E2F1 en C-terminal sur la sérine 364. Une kinase, qui reste à déterminer, agit dans la même région pour phosphoryler le résidu 403. Les acétyltransférases p300, PCAF et Tip60 acétylent E2F1 sur les lysines 117, 120 et 125, ce qui est critique pour son activité transcriptionnelle. Les phosphorylations et acétylations d'E2F1 augmentent sa stabilité, favorisent son accumulation au noyau et la transactivation de gènes cibles. À l'inverse les méthylations d'E2F1 sur les arginines 111 et 113 par PRMT5, réduisent sa stabilité et son activité. La régulation de la méthylation de la lysine 185 par SetD7 et LSD1 conduit à des effets controversés. La méthylation sur ce résidu suivi de sa NEDDylation diminue la stabilité de la protéine. Suite aux dommages à l'ADN ces modifications disparaissent. L'accumulation de chaînes d'ubiquitines spécifiques liées sur la lysine 11 est due à APC/C en réponse à des traitements. Dans des conditions de dommages à l'ADN, l'importance de cette modification reste à démontrer mais semble liée à l'acétylation médiée par p300. D'après Pützer et Engelmann, 2013.

Phosphorylations et acétylations d'E2F1

En réponse à des dommages à l'ADN, les kinases ATM et ATR, senseurs de stress, sont activées. Elles induisent alors la phosphorylation du résidu sérine 31 d'E2F1 ce qui stabilise la protéine, probablement en inhibant la liaison de l'ubiquitine Skp2 qui cible habituellement E2F1 à la dégradation protéosomale (Lin et al., 2001; Marti et al., 1999). En effet dans un contexte apoptotique, la forme E2F1-S31^P est retrouvée complexée à la protéine 14-3-3 ce qui inhibe l'ubiquitination d'E2F1 (Wang et al., 2004). De façon concomitante, Chk2, kinase en aval d'ATM et ATR, se retrouve elle aussi activée et va induire une phosphorylation supplémentaire d'E2F1 sur la sérine 364, ayant là encore un effet stabilisateur de la protéine (Stevens et al., 2003). Ces deux phosphorylations d'E2F1 par les kinases de stress résultent non seulement en une stabilisation de la protéine mais également en une élévation de ses fonctions transcriptionnelles notamment au niveau de cibles pro-apoptotiques telles que p73, APAF-1 ou les caspases (Stevens et al., 2003; Wang et al., 2004). Etant donné qu'ATM est une cible transcriptionnelle directe d'E2F1, il se crée un mécanisme de rétrocontrôle positif où E2F1 contribue de lui-même à son accumulation en réponse à un stress (Berkovich et Ginsberg, 2003). Une phosphorylation supplémentaire d'E2F1 sur la sérine 403 a été décrite en réponse à un traitement génotoxique. Bien que la kinase impliquée n'ait pu être identifiée, la conséquence de cette modification post-traductionnelle d'E2F1 a en revanche été rapportée. Sous sa forme S403^P, E2F1 devient sélectif envers un panel de cibles pro-apoptotiques telles que les BH3-Only, APAF-1, Smac/DIABLO, Bik *etc* (Real et al., 2010). Rapidement après la phosphorylation de la sérine 31, E2F1 est soumis à de nouvelles modifications post-traductionnelles. Cette fois, il s'agit d'acétylations sur les résidus lysine en position 117, 120 et 125, notamment orchestrées par les acétyltransférase p300 et PCAF. Concernant l'acétylation réalisée par p300, elle s'accompagne d'une ubiquitination d'E2F1, indépendante de Skp2. Dans ce contexte de dommage à l'ADN, E2F1 semble s'accumuler également sous une forme ubiquitinée qui n'a donc rien à voir avec un ciblage à la dégradation protéosomale (Galbiati et al., 2005; Ianari et al., 2004). Le statut d'acétylation d'E2F1 est requis pour lier spécifiquement le promoteur de cibles pro-apoptotiques comme p73 et la présence de cette modification d'E2F1 se traduit par une activité transcriptionnelle accrue (Pediconi et al., 2003). Il est à noter qu'E2F1 induit une boucle de rétrocontrôle négatif à ce niveau, en induisant l'expression de Sirt1, qui déacétyle E2F1 suite à leur association (Wang et al., 2006).

Méthylation et NEDDylation d'E2F1 sur résidu lysine

La lysine 185 d'E2F1 est sujette à des méthylations par la méthyltransférase Set-9 et des déméthylations par l'enzyme LSD-1 (*LySine Demethylase-1*). La méthylation d'E2F1 par Set-9 est associée à une diminution importante de la stabilité de la protéine, tandis que la perte de méthylation se traduit par une accumulation d'E2F1 et une activation transcriptionnelle de p73. Les auteurs exposent un mécanisme relationnel entre les modifications post-traductionnelles d'E2F1. La forme déméthylée d'E2F1 est favorable à la survenue des phosphorylations et acétylations mentionnées ci-dessus ce qui bloque la méthylation du résidu K185, évitant de la sorte une dégradation d'E2F1 (Kontaki et Talianidis, 2010). Cependant les conséquences de la méthylation sur la lysine 185 restent controversées car une étude a fourni des évidences contradictoires (Xie et al., 2011). Il se trouve que ce même résidu lysine 185 est également un site de NEDDylation d'E2F1. Une étude de La Thangue indique que la NEDDylation d'E2F1 déstabilise la protéine et réduit son activité transcriptionnelle. Or les auteurs indiquent que la NEDDylation d'E2F1 implique au préalable une méthylation sur le résidu K185 soulignant une coopération entre méthylation et NEDDylation d'E2F1 pour déstabiliser la protéine en accord avec les travaux de Kontaki (Loftus et al., 2012). L'équipe de Gotoh conforte ces données, car la déNEDDylation d'E2F1 par l'enzyme SENP8 est requise pour qu'il y ait transactivation de p73 et déclenchement de l'apoptose subséquente (Aoki et al., 2013).

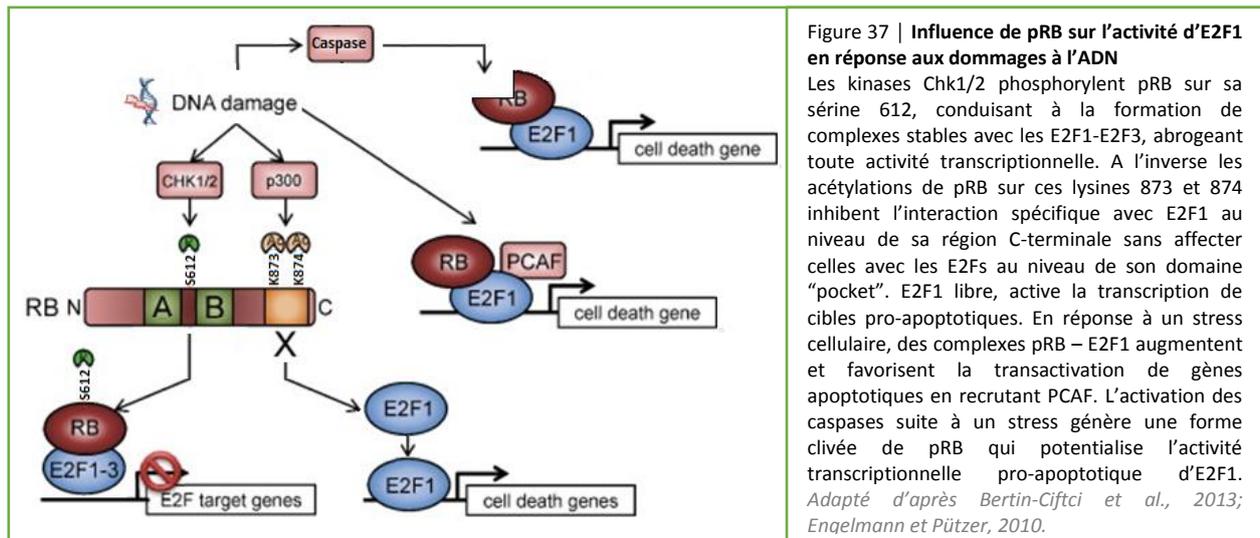
Méthylation d'E2F1 sur résidu arginine et déubiquitination

E2F1 est également méthylé par l'enzyme PRMT-5 (*Protein aRginine MethylTransferase-5*) au niveau de deux résidus arginine en position 111 et 113. La méthylation d'E2F1, dans ce cas-ci également, déstabilise la protéine, à tel point qu'une simple déplétion de PRMT-5 dans les cellules suffit à générer une accumulation immédiate d'E2F1 accompagnée de l'induction de cibles pro-apoptotiques et d'une apoptose indépendante de p53 ; tout cela en absence de stress cellulaire (Cho et al., 2012). En réponse aux dommages à l'ADN, il a été proposé un rôle de la déubiquitinase UCH37 pour retirer les chaînes d'ubiquitines de type K63 présentes sur E2F1. Il en résulte une plus grande activité transcriptionnelle au niveau du promoteur de gènes pro-apoptotiques tels que les caspases, APAF-1 et PARP (Mahanic et al., 2015).

b. Régulation par interaction avec divers partenaires protéiques

L'interaction E2F1 – pRB en réponse aux dommages à l'ADN

La protéine pRB est le principal régulateur d'E2F1 au cours de la progression du cycle cellulaire. S'il est évident que dans ce contexte il agit en tant que répresseur, son action sur l'activité apoptotique d'E2F1 n'est pas aussi catégorique (**Figure 37**). La protéine pRB possède un second site de liaison uniquement dédié à E2F1 (Dick et Dyson, 2003). En présence de dommages à l'ADN, pRB est sous une forme hypo-phosphorylée et donc liée aux E2Fs activateurs pour empêcher toute progression du cycle cellulaire, inappropriée en de telles circonstances. En revanche une phosphorylation en sérine 612 par Chk1/2 a été observée sur pRB et n'abroge pas son interaction avec E2F1 inhibant ses fonctions transcriptionnelles bien qu'elles soient destinées à promouvoir l'apoptose (Inoue et al., 2007). Cependant il a été mis en évidence une acétylation de pRB située dans le 2nd site d'interaction spécifique à E2F1. Dans ce cas, il se produit une rupture de l'interaction avec E2F1 sans que cela n'affecte la capacité de pRB à lier les autres E2Fs via son site canonique. E2F1 est alors libre d'orchestrer une réponse apoptotique (Markham et al., 2006). Ces études soutiennent le modèle initial d'une action répressive de pRB sur les fonctions transcriptionnelles d'E2F1 qu'elles soient dirigées vers des cibles impliquées dans la progression du cycle cellulaire comme dans l'apoptose. Cependant une étude d'Ianari indique une augmentation des complexes pRB – E2F1 en réponse aux dommages à l'ADN, qui par recrutement de PCAF favorise la transactivation de promoteurs de cibles pro-apoptotiques : p73 et caspase 7 (Ianari et al., 2009). De plus, au laboratoire nous avons mis en évidence, un complexe pRB – E2F1 activateur de la transcription du gène codant le BH3-Only Noxa, impliquant une forme clivée de pRB induite par les caspases (Bertin-Ciftci et al., 2013). En outre, les modifications post-traductionnelles d'E2F1 présentées ci-dessus participent également à réguler son association à pRB. Tandis que la phosphorylation de la sérine 31 et les acétylations subséquentes d'E2F1 favorisent une forme libre, E2F1 phosphorylé sur la sérine 364 a uniquement été retrouvé sous forme complexé à pRB (non phosphorylé sur sa sérine 612, ni acétylé). Pour autant ce complexe semble favoriser la transactivation du promoteur p73 (Carnevale et al., 2012). Il apparaît donc que le rôle de pRB dans la régulation des fonctions apoptotiques d'E2F1 est relativement complexe et dépend pour beaucoup des modifications post-traductionnelles présentes sur les deux protéines (Engelmann et Pützer, 2010).



Interaction d'E2F1 avec des régulateurs positifs de son activité pro-apoptotique

Plusieurs co-activateurs d'E2F1 ont été décrits favorisant ses fonctions pro-apoptotiques. Parmi eux, est retrouvée la protéine Jab-1 considérée comme le 1^{er} co-facteur pro-apoptotique d'E2F1 à avoir été identifié. Il s'associe à la Marked Box d'E2F1 et favorise spécifiquement son rôle pro-apoptotique mais n'exerce aucune action synergique avec les fonctions d'E2F1 dans la prolifération cellulaire. En revanche les mécanismes moléculaires sous-jacents n'ont pas été mis en évidence (Hallstrom et Nevins, 2006). La protéine Microcephaline (MCPH1/BRIT1) interagit via deux de ces domaines BRCT (*BRCA1-Carboxy Terminal*) avec la région N-terminale d'E2F1 en réponse aux dommages à l'ADN. MCPH1 augmente l'activité transcriptionnelle d'E2F1 et leur complexe est retrouvé notamment au niveau du promoteur des gènes codant p73, caspase 7, Chk1 (Yang et al., 2008). De façon semblable il a été observé un complexe entre E2F1 et sa cible transcriptionnelle RRP1B au niveau du promoteur de gènes cibles pro-apoptotiques. RRP1B stimule l'activité transcriptionnelle d'E2F1 et est requis dans l'apoptose induite par E2F1 (Paik et al., 2010). Par ailleurs, pendant la transition G₁-S, E2F1 s'associe à la protéine HCF-1 (Host Cell Factor-1) au niveau de son domaine de liaison à la cycline A, et ce dernier agit en tant que co-facteur d'E2F1 pour permettre le recrutement de méthyltransférases de la famille MLL. Il s'en suit une augmentation de la méthylation des promoteurs cibles d'E2F1, ce qui dans ce cas favorise leur transactivation (Tyagi et al., 2007). Il se trouve que des complexes E2F1 – HCF-1 – MLL sont recrutés suite aux dommages à l'ADN au niveau de promoteurs de cibles pro-apoptotiques d'E2F1 et augmentent leur transactivation (Tyagi et Herr, 2009).

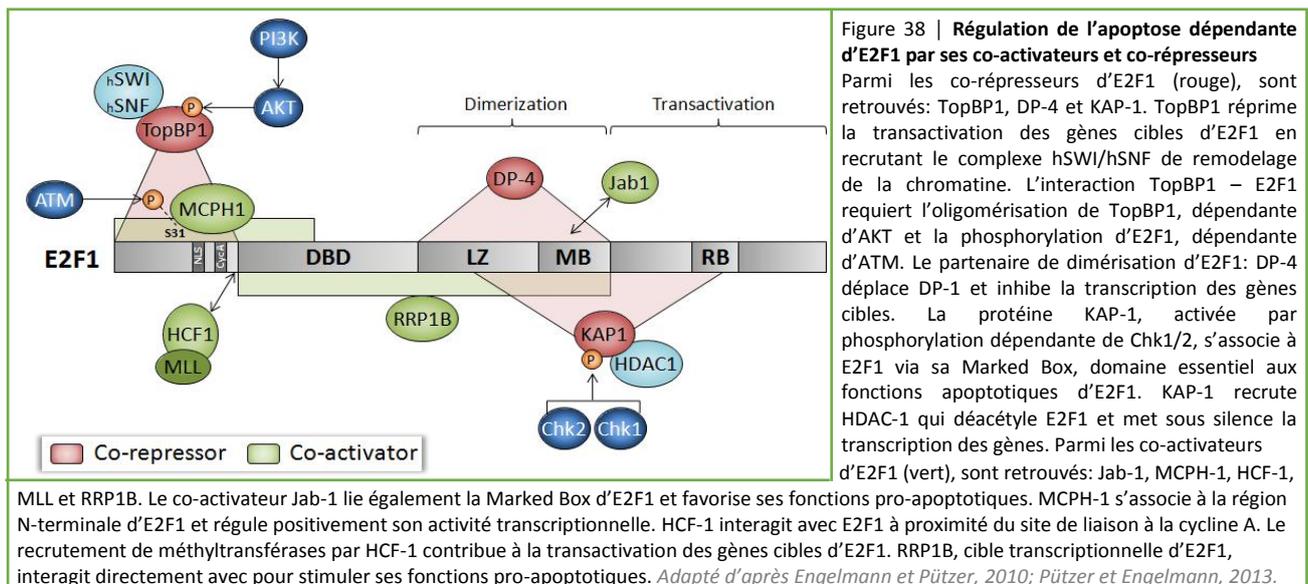
Interaction d'E2F1 avec des régulateurs négatifs de son activité pro-apoptotique

La protéine KAP-1 (*Krüppel-associated box (KRAB)-associated corepressor-1*) est considérée comme co-répresseur transcriptionnel universel. Il a été détecté une interaction directe avec E2F1 au niveau de sa Marked Box, qui comme mentionné ci-dessus, joue un rôle important pour les fonctions pro-apoptotiques d'E2F1. En tant que co-répresseur, KAP-1 recrute HDAC-1 pour éliminer les acétylations d'E2F1, induites suite aux dommages à l'ADN (**Figure 38**). Par son action KAP-1 diminue les fonctions transcriptionnelles d'E2F1 et l'apoptose subséquente (Wang et al., 2007a). La protéine DP4, contrairement aux autres membres de la famille DP, exerce une activité de répresseur transcriptionnel. En effet, en s'associant à E2F1, elle abroge toute liaison à l'ADN et par conséquent l'activité transcriptionnelle d'E2F1 (**Figure 38**). Il se trouve que son expression est induite lors de dommages à l'ADN, ce qui fait d'elle une protéine inhibitrice des fonctions pro-apoptotiques d'E2F1 (Ingram et al., 2011). Enfin la protéine MDM2 agit elle aussi comme régulateur des fonctions pro-apoptotiques d'E2F1. Une interaction a été détectée entre E2F1 et MDM2, impliquant son domaine de transactivation (Martin et al., 1995b). Or l'inhibition pharmacologique de MDM2 par la Nutlin-3a, dans un fond cellulaire déficient de p53 fonctionnel, provoque l'apoptose des cellules associée à une induction de cibles pro-apoptotiques dépendante d'E2F1 (Ray et al., 2011). En accord avec ces données, la nutlin-3a augmente l'apoptose induite par E2F1 en réponse à des stress génotoxiques (Ambrosini et al., 2007). MDM2 exerce son action inhibitrice de l'apoptose induite par E2F1 en favorisant sa dégradation (Loughran et La Thangue, 2000). Néanmoins l'activité répressive de MDM2 fait l'objet de controverses car plus récemment il a été montré des effets opposés où MDM2 stimule la transactivation du promoteur de p73 induite par E2F1 (Kasim et al., 2014). Une étude indique une stabilisation d'E2F1 par MDM2, due à une compétition avec l'ubiquitine ligase Skp2 pour l'association à E2F1 (Zhang et al., 2005). Le rôle de MDM2 est donc plus complexe qu'il n'y paraît et nécessite davantage d'investigations.

Boucles de rétrocontrôle négatif de l'activité pro-apoptotique d'E2F1

L'un des principaux mécanismes de rétrocontrôle négatif des fonctions pro-apoptotiques d'E2F1 implique la voie PI3K – Akt. En effet, E2F1 est capable d'induire l'activation d'Akt, en augmentant l'expression de la protéine Gab-2 (*Grb-2 Associated Binding-2*) impliquée dans ce processus (Chaussepied et Ginsberg, 2004). Il se trouve que TopBP-1 est un substrat d'Akt et sa phosphorylation favorise son oligomérisation permettant son interaction avec E2F1-S31^P (Liu et al., 2003, 2006). TopBP-1 contribue au recrutement de Brg-1 et Brm-1, pour rappel composants du complexe de remodelage de la chromatine, résultant *in fine* en une répression de l'activité

transcriptionnelle d'E2F1 (**Figure 38**) (Liu et al., 2004). Par ailleurs, E2F1 induit l'expression de la protéine du groupe polycomb : EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*), enzyme de méthylation des histones. EZH2 est retrouvée spécifiquement au niveau du promoteur Bim, ce qui s'accompagne d'un enrichissement de la méthylation de ce dernier. Par son action EZH2 réprime la transcription de Bim ce qui abroge l'apoptose induite par E2F1 (Wu et al., 2010). Il a été plus récemment observé une interaction directe entre E2F1 et EPC-1 (*Enhancer of Polycomb Homolog 1*), composant du complexe PRC2 où se trouve notamment EZH2. La protéine EPC-1 est également une cible transcriptionnelle d'E2F1. La conséquence de leur interaction est une inhibition de l'activité transcriptionnelle d'E2F1 au niveau du promoteur de cibles pro-apoptotiques telles que Bim ou d'arrêt du cycle cellulaire comme p27. L'action d'EPC-1 ne se résume pas à une répression de l'activité transcriptionnelle d'E2F1 puisqu'il est capable à l'inverse de la promouvoir au niveau du promoteur de cibles « pro-survie » telles que Bcl-2 ou la survivine (Wang et al., 2016).



III. E2F1 : Oncogène ou Suppresseur de tumeur ?

1. La voie pRB/E2Fs dans les cancers

La protéine pRB est le premier suppresseur de tumeur à avoir été identifié. Son gène RB1 est fréquemment retrouvé délété, mis sous silence par des modifications épigénétiques ou muté dans un grand nombre de tumeurs humaines. Dans l'ostéosarcome, plus précisément dans la lignée Saos-2, il y a une délétion des exons 21-27 du gène RB1. Cela conduit à l'expression d'une forme tronquée de pRB, déléetée de son domaine C-terminal. De ce fait, la protéine n'est plus en mesure

de lier les E2Fs et est fonctionnellement inactive (Qian et al., 1992; Shew et al., 1990). A cela s'ajoute, une inactivation fonctionnelle de pRB, observée là aussi dans un grand nombre de cancers. Pour rappel l'activité de pRB est dépendante de son statut de phosphorylation, la protéine est inactive sous sa forme hyperphosphorylée. Les complexes Cyclines – CDKs sont à l'origine de ces phosphorylations de pRB, et leur activité est sous contrôle des CDKi. L'un des mécanismes conduisant à l'inactivation de pRB dans les tumeurs concerne la surexpression des cyclines ou CDKs. Par exemple, la surexpression de CDK4 est retrouvée dans 40% des glioblastomes, celle de la Cycline D1 dans un peu plus de 50% des tumeurs mammaires et dans 90% des lymphomes du manteau, résultant dans ce cas d'une translocation chromosomique t(11 :14) plaçant le gène de la Cycline D1 sous contrôle du promoteur de la chaîne lourde des immunoglobulines. Il a également été observé l'apparition de mutations « gain de fonction » pour ces protéines. Dans le cas de CDK4, plusieurs de ces mutations sont situées au niveau du site de liaison aux CDKi, inhibant son interaction. Le second mécanisme d'inactivation de pRB résulte d'une suppression de l'activité des CDKi, due à des délétions géniques, mutations ou mise sous silence du gène. Ce mécanisme est extrêmement fréquent dans le cas de la protéine CDKi p16 car il survient dans 75% des cas de leucémies lymphoïdes aiguës, 80% des cas de cancers pancréatiques et chez 60% des patients atteints de glioblastome ou tumeur pulmonaire à petites cellules. Par ailleurs, il ne faut pas oublier les infections virales par les adénovirus ou papillomavirus où certaines des protéines virales exprimées dans les cellules infectées interagissent avec pRB. Il en résulte une incapacité de la protéine pRB à lier les E2Fs. (Sherr et McCormick, 2002)

L'activité des E2Fs est fréquemment dérégulée dans les cancers ; la principale cause étant l'inactivation du suppresseur de tumeur pRB décrite ci-dessus. Pour autant, des altérations géniques du gène codant E2F1 ont été reportées et contribuent à la survenue d'une dérégulation de la voie E2F1 dans les cancers. Des mutations somatiques ont été détectées mais sont extrêmement rares. En effet, pour 43 mutations retrouvées au niveau du gène E2F1, 1143 ont été observées dans le cas de pRB et 7716 concernant p53 (Bamford et al., 2004). En revanche, l'amplification génique du gène codant E2F1 se fait plus fréquente (Fujita et al., 2003; Postma et al., 2005; Saito et al., 1995; Watanabe et al., 2002). Elle est notamment retrouvée dans plusieurs lignées tumorales dont celles de mélanome et a justement été détectée dans les métastases de ce cancer (Nelson et al., 2006). De façon générale, une forte expression d'E2F1, quelqu'en soit l'origine est un trait commun à diverses tumeurs humaines.

2. E2F1 : Propriété oncogénique

Dans les études *in vitro*, E2F1 est très vite apparu comme un oncogène capable d'induire la formation de colonies en agarose et de promouvoir la transformation tumorale des cellules (Johnson et al., 1994; Singh et al., 1994). Plusieurs études réalisées *in vivo* supportent ce modèle. Des modèles murins transgéniques présentant une expression aberrante d'E2F1 développent des adénomes néoplasiques avec une incidence de 100% à 10 mois. Certaines des souris développent à terme des carcinomes hépatocellulaires (Conner et al., 2000). D'autres travaux réalisés par Pierce mettent également en avant un rôle d'E2F1 dans la tumorigénèse. Les auteurs développent un modèle murin transgénique où la surexpression d'E2F1 est ciblée aux tissus épithéliaux squameux (gène E2F1 sous contrôle du promoteur de la kératine 5 : E2F1 – K5). Les animaux développent des cancers de la peau, et ce phénomène est accentué par une déplétion du gène codant p53 (Pierce et al., 1998). Par ailleurs, afin de mimer la perte de pRB observée dans les cancers, des modèles murins RB^{+/-} ont été générés et il en résulte le développement de tumeurs pituitaires et thyroïdiennes. Or il se trouve qu'E2F1 joue un rôle critique dans ce processus car la perte d'E2F1 (souris pRB^{+/-} E2F1^{-/-}) réduit la fréquence d'apparition de ces tumeurs et augmente l'espérance de vie des animaux (Yamasaki et al., 1998). Au niveau diagnostique, l'expression d'E2F1 a été associée, dans de nombreux cas, à des tumeurs de haut grade, une progression tumorale accrue et un faible pronostic de survie pour les patients (Banerjee et al., 2000; Eymen et al., 2001b; Iwamoto et al., 2004; Yamazaki et al., 2003).

3. E2F1 : Propriété suppressive de tumeur

Comme explicité dans la partie précédente, E2F1 est un inducteur d'apoptose capable d'assurer une réponse apoptotique en cas d'absence de la protéine p53. Grâce à cette fonction pro-apoptotique, E2F1 sensibilise de nombreuses lignées tumorales à diverses chimiothérapies. De ce fait E2F1 a également été considéré comme suppresseur de tumeur. Quelques études *in vivo* soutiennent ce modèle. En effet, la déplétion d'E2F1 provoque le développement de tumeurs spontanées. S'il est vrai que la perte d'E2F1 diminue l'apparition des tumeurs pituitaires et thyroïdiennes chez les souris pRB^{+/-}, son absence conduit cependant à l'apparition d'autres types de tumeurs. Parmi les tumeurs les plus fréquemment observées suite à une déplétion d'E2F1 sont retrouvées les histiosarcomes (tissu conjonctif), les hémangiosarcomes (rate), les hépatocarcinomes et les tumeurs pulmonaires (Field et al., 1996; Yamasaki et al., 1996, 1998). Une autre étude utilise des souris transgéniques c-Myc – K5 (expression sous contrôle du promoteur

kératine 5) qui développent des tumeurs de la peau. Dans ce contexte, l'inactivation d'E2F1 accélère la tumorigénèse indiquant qu'E2F1 participe à limiter le développement tumoral (Rounbehler et al., 2002). L'équipe de Russell a entrepris de réutiliser le modèle murin E2F1 – K5 afin d'y étudier une éventuelle action anti-tumorale d'E2F1. Dans ce modèle, des tumeurs de la peau apparaissent spontanément chez les animaux âgés d'1 an. Ici les auteurs emploient des agents carcinogéniques pour initier le développement de tumeur impliquant notamment la survenue de mutation activatrice du gène Ras. Dans ce contexte, la surexpression d'E2F1 inhibe le développement des tumeurs via l'induction des protéines Arf et p53. E2F1 présente donc une action de suppresseur de tumeurs au stade précoce de la tumorigénèse (Russell et al., 2006). Une action bénéfique d'E2F1 a également été observée sur des études directement réalisées à partir d'échantillons tumoraux de patients. Une analyse de 183 échantillons prélevés lors de l'exérèse de tumeurs mammaires, révèle une association entre les tumeurs de bas grades et les niveaux d'expression élevés d'E2F1. Par ailleurs, les données cliniques de surveillance des patientes indiquent une plus faible récurrence des tumeurs ou de survenue des métastases dans les cas exprimant fortement E2F1 (Kwon et al., 2010). Il a par ailleurs été mis en évidence qu'une forte expression d'E2F1 dans les tumeurs gastriques et colorectales favorise la réponse des patients aux chimiothérapies (Belvedere et al., 2004; Lee et al., 2008).

4. Comment expliquer l'ambivalence d'E2F1 dans les tumeurs ?

E2F1 du fait de ses fonctions dans la progression du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose apparaît comme une protéine fonctionnellement versatile. Un très grand nombre de protéines interviennent afin de réguler positivement ou négativement ses fonctions pro-apoptotiques (abordé dans la partie précédente II-5-b). Des dysfonctions de l'activité de ces protéines peuvent altérer la capacité d'E2F1 à induire l'apoptose voir même convertir ses fonctions en faveur de la prolifération cellulaire. Un niveau de complexité supplémentaire s'ajoute avec les différentes boucles de rétrocontrôle négatif qu'E2F1 instaure lorsqu'il exerce son rôle pro-apoptotique. De plus, des voies oncogéniques telles que les voies PI3K/Akt ou EGFR abrogent l'activité pro-apoptotique d'E2F1. L'intégration des signaux pro-survie ou pro-apoptotique est déterminante pour convertir l'activité d'E2F1 d'une action oncogénique à suppressive de tumeur et vice versa. (Engelmann et Pützer, 2012)

IV. Régulation de la voie pRB/E2F1 par des actions non canoniques de la famille Bcl-2

La famille Bcl-2, outre sa capacité à réguler l'apoptose mitochondriale, présente également des fonctions annexes, caractérisées de non canoniques, du fait de la capacité de plusieurs de ses membres à interagir avec des partenaires n'appartenant pas à cette famille, modulant ainsi leur activité. De ce fait, la famille Bcl-2 intervient dans diverses autres fonctions biologiques telles que la régulation de l'homéostasie calcique, l'autophagie, la réparation de l'ADN, le contrôle de la transcription ou encore le cycle cellulaire (**Figure 39**) (Braun et al., 2013).

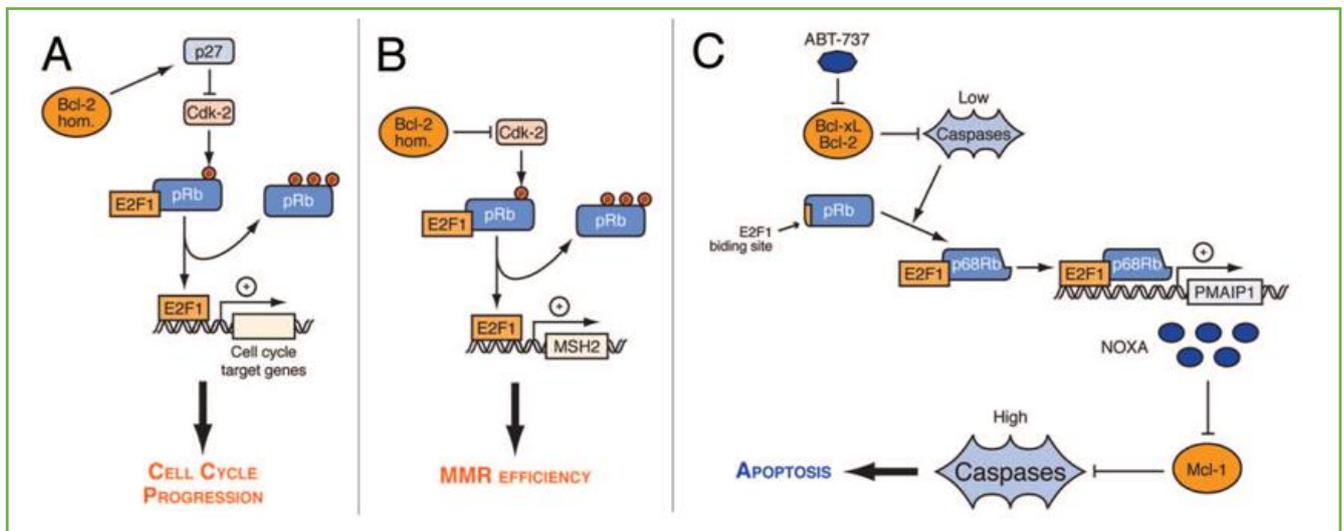


Figure 39 | Régulation de la voie pRB/E2F1 par la famille Bcl-2

(A). Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 inhibent CDK2 en augmentant les niveaux de CDKi p27. Il en résulte un maintien de pRB sous sa forme active hypophosphorylée. Par leur action les anti-apoptotiques préservent les complexes inactifs E2Fs-pRB ce qui retarde la progression du cycle cellulaire. (B) Les anti-apoptotiques Bcl-2 inhibent CDK2 via p27 ou par interaction directe. E2F1 est alors maintenu inactif sur le même principe que précédemment compromettant la transcription de Msh2 et la réparation des dommages à l'ADN subséquente. (C) L'inhibition de Bcl-2 et Bcl-xL par l'ABT-737 permet un clivage de pRB par les caspases. Sous cette forme, pRB forme un complexe activateur avec E2F1 et induit la transcription du BH3-Only Noxa, inhibiteur de l'anti-apoptotique Mcl-1. L'inhibition de Bcl-2/Bcl-xL est alors accompagnée de celle de Mcl-1 constituant une boucle d'amplification pour le déclenchement de l'apoptose. D'après Braun et al., 2013.

1. Régulation du cycle cellulaire

Les 1^{ères} évidences d'un lien entre la prolifération cellulaire et la famille Bcl-2 proviennent du constat qu'une surexpression des membres anti-apoptotiques dans les thymocytes ou fibroblastes retarde l'entrée dans le cycle cellulaire suite à une stimulation mitogénique. De façon globale leur surexpression diminue la prolifération des cellules (Borner, 1996; O'Reilly et al., 1996). Il a été proposé un mécanisme d'action où les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 inhibent la progression du cycle cellulaire en interférant avec l'activité des E2Fs. La surexpression de Bcl-2 est associée à une élévation du niveau de protéine CDKi : p27, qui inhibe les CDKs, maintenant de la sorte pRB sous une forme hypophosphorylée active. Par ailleurs, la surexpression d'E2F4 accentue les effets

répresseurs de Bcl-2 sur la progression du cycle cellulaire suggérant un rôle de cette protéine. Or il se trouve que Bcl-2 induit également une élévation des niveaux de protéines p130. Il est donc émis l'hypothèse que Bcl-2 favoriserait la formation de complexes E2F4 – p130 répresseur. Il est d'ailleurs détecté une accumulation retardée d'E2F1 suite à une stimulation mitogénique, pouvant s'expliquer du fait d'une répression transcriptionnelle accrue par E2F4 – p130. Ainsi Bcl-2 exerce une action inhibitrice de la prolifération cellulaire, d'une part en inhibant les CDKs grâce à une induction de l'expression de p27, et d'autre part en réprimant l'expression des E2Fs activateurs grâce à une induction de l'expression de p130, augmentant ainsi les complexes E2F4 – p130 (Lind et al., 1999; Quinn et Richardson, 2004; Vairo et al., 2000).

2. Régulation de la réparation des dommages à l'ADN

E2F1, à l'instar des protéines de la famille Bcl-2, est impliqué dans de multiples fonctions biologiques autres que celles décrites dans cette partie. Cela est notamment dû au fait qu'E2F1 contrôle l'expression d'un imposant panel de gènes cibles intervenant dans divers processus tels que la différenciation, le développement, l'autophagie, la biogénèse mitochondriale et la réparation des dommages à l'ADN (Benevolenskaya and Frolov, 2015; Müller et al., 2001; Polager et al., 2008; Pützer and Engelmann, 2013a).

La réponse apoptotique induite par E2F1 suite aux dommages à l'ADN n'est pas toujours la seule issue possible. En effet, E2F1 peut également orchestrer une voie de réparation des dommages (**Figure 40**). Cela implique la transcription de gènes cibles de la machinerie de réparation tels que Rad51, BRCA1, ERCC1, Msh2 *etc.* Mais l'action d'E2F1 dans la réparation des dommages à l'ADN peut aussi s'effectuer indépendamment de ses fonctions transcriptionnelles. En effet, la protéine apparaît relocalisée au niveau des sites de dommages à l'ADN où elle participe au recrutement de composants des machineries de réparation (Pützer and Engelmann, 2013a). Dans le système d'excision des nucléotides endommagés (*NER : Nucleotide Excision Repair*), TopBP1 recrute E2F1 sur ces sites de dommages et E2F1 recrute à son tour la protéine d'acétylation des histones : GCN5. Celle-ci augmente par son action l'accessibilité de la chromatine pour les composants du NER (Guo et al., 2010). Dans le cas de cassures double brin, c'est le système MRN qui intervient. Cela implique un complexe de trois protéines que sont Mre-11, Rad-50 et NBS1. Il se trouve qu'E2F1 interagit directement avec cette dernière favorisant la formation du complexe MRN et par conséquent la réparation des dommages par ce système (Chen et al., 2011; Frame et al., 2006).

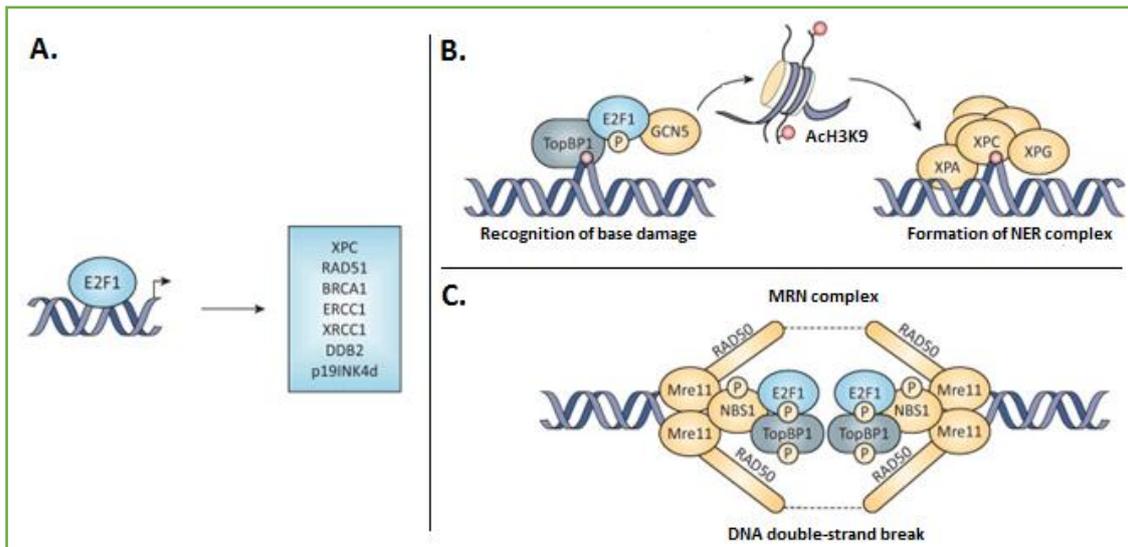


Figure40 | Fonctions transcriptionnelles et non transcriptionnelles d'E2F1 dans la réparation de l'ADN

(A). E2F1 transcrit directement différents éléments des systèmes de réparation de l'ADN. (B). Le système NER permet d'éliminer les nucléotides endommagés suite à des stress génotoxique ou irradiation. E2F1 est impliqué dans ce processus et favorise la reconnaissance des dommages et l'action du NER. E2F1 est recruté aux sites de dommages à l'ADN par TopBP1. GCN5 est lui aussi recruté aux sites de dommages grâce à son interaction avec E2F1. Il y permet une acétylation efficace des histones H3 permettant d'accroître l'accessibilité de la chromatine au NER. (C). Le système MRN intervient en cas de cassures double brin de l'ADN. Mre11, constituant du MRN, reconnecte les extrémités d'ADN avec Rad50. NBS1, également partie intégrante du MRN interagit avec TopBP1 et le phosphoryle. E2F1 s'associe à ces deux protéines en réponse aux dommages à l'ADN et promeut l'action de réparation médiée par le MRN. D'après Pützer et Engelmann, 2013.

La famille Bcl-2, et plus spécifiquement Bcl-2 et Bcl-xL, interfère avec la voie de réparation induite par E2F1. Le mécanisme implique à nouveau une induction de p27 par Bcl-2 qui contribue à inhiber l'activité des CDKs. En revanche, il est également observé une interaction directe entre Bcl-2 et CDK2 qui inhiberait son activité. Dans les deux cas Bcl-2 favorise le maintien de pRB sous sa forme hypophosphorylée, liée à E2F1. Cela s'accompagne d'une diminution de l'activité transcriptionnelle d'E2F1 et notamment d'une réduction de l'expression de Msh2. En absence de Msh2, la protéine Msh6 est dégradée et l'activité du système de réparation des mésappariements de nucléotides : MMR (*MisMatch Repair*) est abrogée. Les auteurs proposent une action inhibitrice de la réparation des dommages à l'ADN par les protéines anti-apoptotiques favorisant l'instabilité génétique et la progression tumorale par acquisition de nouvelles mutations (Youn et al., 2005).

3. Régulation de l'apoptose

Des travaux réalisés au laboratoire ont mis en évidence une régulation de l'apoptose dépendante d'E2F1 par les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. L'inhibition pharmacologique de ces derniers par l'ABT-737 induit un clivage de pRB, dépendant de l'activité des caspases. Deux formes sont ainsi générées : p48RB et p68RB, or il se trouve que cette forme conserve sa capacité à lier E2F1 et est retrouvée au niveau du promoteur du gène codant Noxa. Le

BH3-Only ainsi exprimé, inhibe spécifiquement Mcl-1, renforçant l'effet du traitement et permettant d'induire efficacement l'apoptose. Il apparaît donc que les protéines anti-apoptotiques, en limitant l'activité des caspases, répriment l'un des mécanismes par lesquels E2F1 promeut l'apoptose ; impliquant la génération d'une forme tronquée de pRB afin de former un complexe E2F1 – p68RB activateur de la transcription de cibles pro-apoptotiques (Bertin-Ciftci et al., 2013).

Objectifs de

la thèse

Une vaste majorité des tumeurs humaines présentent des dysfonctionnements dans les voies de signalisation de la famille Bcl-2, pRB/E2F1 et p53. Le contrôle de l'apoptose est l'une des fonctions biologiques commune à ces trois voies. C'est pourquoi leur dérégulation est souvent responsable de phénomène de résistance à la mort cellulaire induite par des stimuli inhérents à la tumeur ou apportés par des thérapies anti-cancéreuses. La famille Bcl-2 est au cœur du contrôle du déclenchement de l'apoptose et son activité est elle-même régulée par les voies pRB/E2F1 et p53. Des molécules BH3-mimétiques ont été spécifiquement développées afin de neutraliser les membres anti-apoptotiques de cette famille et favoriser l'action de leurs contreparties pro-apoptotiques. Mon travail de thèse s'est axé autour de la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu par ces voies de signalisation dans l'induction de l'apoptose et en réponse aux BH3-mimétiques.

Au début de ma thèse, j'ai contribué à finaliser la démonstration du rôle non transcriptionnel de p53 requis dans l'apoptose induite en réponse au traitement par le BH3-mimétique : ABT-737 (Le Pen et al., 2016; **voir l'Annexe 1**). Nous avons mis en évidence la nécessité du facteur de transcription pour l'activation de Bax induite par le traitement. Par le biais de fonction indépendante de la transcription, p53 augmente la sensibilité des cellules tumorales à l'action du traitement. Ces travaux identifient une action de p53 directement sur le priming mitochondrial, cependant nous n'avons pas réussi à identifier les événements moléculaires responsables de cet effet.

Une partie des travaux de recherche de l'équipe consiste à étudier la capacité des molécules BH3-mimétiques à interférer avec le réseau d'interactions de la famille Bcl-2 dans les cellules vivantes. J'ai notamment contribué au développement des analyses par BRET du réseau d'interactions de la famille Bcl-2. Nous avons ainsi mis en évidence que la localisation des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL ou Bcl-2 est déterminante pour l'efficacité des molécules BH3-mimétiques à inhiber les interactions engagées avec leurs partenaires apoptotiques. De manière intéressante, nous montrons qu'une augmentation de la dynamique cellulaire de Bcl-xL augmente l'efficacité d'un BH3-mimétique à inhiber les interactions et à induire la mort cellulaire (Pécot et al., *in press* ; **voir l'Annexe 2**). Comprendre ce qui régit la dynamique cellulaire de Bcl-xL pourrait donc être déterminant pour améliorer la réponse aux molécules BH3-mimétiques.

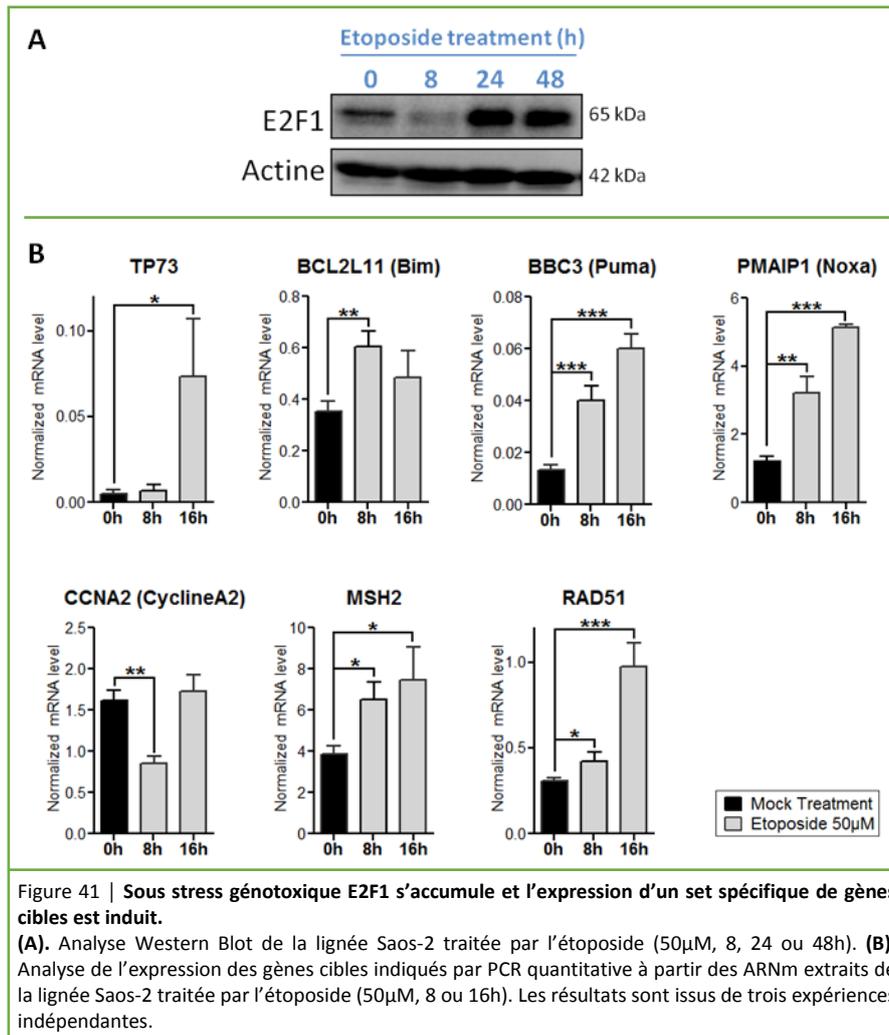
Nous avons précédemment mis en évidence l'intervention de la voie pRB/E2F1 dans la réponse à l'ABT-737. Dans ce cas-ci, la protéine E2F1 augmente l'efficacité du BH3-mimétique grâce à son action de facteur de transcription en induisant le BH3-Only Noxa. L'inhibition pharmacologique de Bcl-xL et Bcl-2 par le traitement, concomitante à celle de Mcl-1 par Noxa permet une réponse apoptotique efficace (Bertin-Ciftci et al., 2013). Certaines études indiquent que les fonctions transcriptionnelles de la protéine ne sont pas requises pour sa faculté à promouvoir l'apoptose (Phillips et al., 1997) . Au cours de mon travail de thèse, j'ai cherché à décrypter les mécanismes mis en œuvre lors du déclenchement d'une mort cellulaire dépendante d'E2F1 et plus particulièrement ceux ne faisant pas intervenir ses fonctions transcriptionnelles. Nous avons émis l'hypothèse d'un rôle cytoplasmique de la protéine et avons identifié cette dernière aux mitochondries. Une grande partie de mon travail s'est alors axée autour du rôle de ce pool d'E2F1 aux mitochondries. Nos travaux nous ont permis de déterminer une fonction apoptotique d'E2F1, agissant directement au niveau des mitochondries. A l'instar de p53, nous observons une action non transcriptionnelle d'E2F1 sur le priming mitochondrial. Nous avons alors émis l'hypothèse d'un lien direct entre les familles pRB/E2Fs et Bcl-2. Pour la première fois, nous mettons en évidence une interaction entre le facteur de transcription E2F1 et les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1. J'ai alors cherché à déterminer si Bcl-xL pouvait moduler les fonctions d'E2F1 et réciproquement. Alors que Bcl-xL n'est pas en mesure de modifier le programme transcriptionnel induit par E2F1, la protéine E2F1 est capable de moduler certaines propriétés relatives à Bcl-xL, notamment sa mobilité intracellulaire. Mes résultats me conduisent à proposer une relation entre la régulation de la dynamique cellulaire de Bcl-xL et ses fonctions anti-apoptotiques. Je vais vous présenter l'ensemble de ces résultats qui fait l'objet d'une publication en préparation (voir l'**Annexe 3**).

Résultats

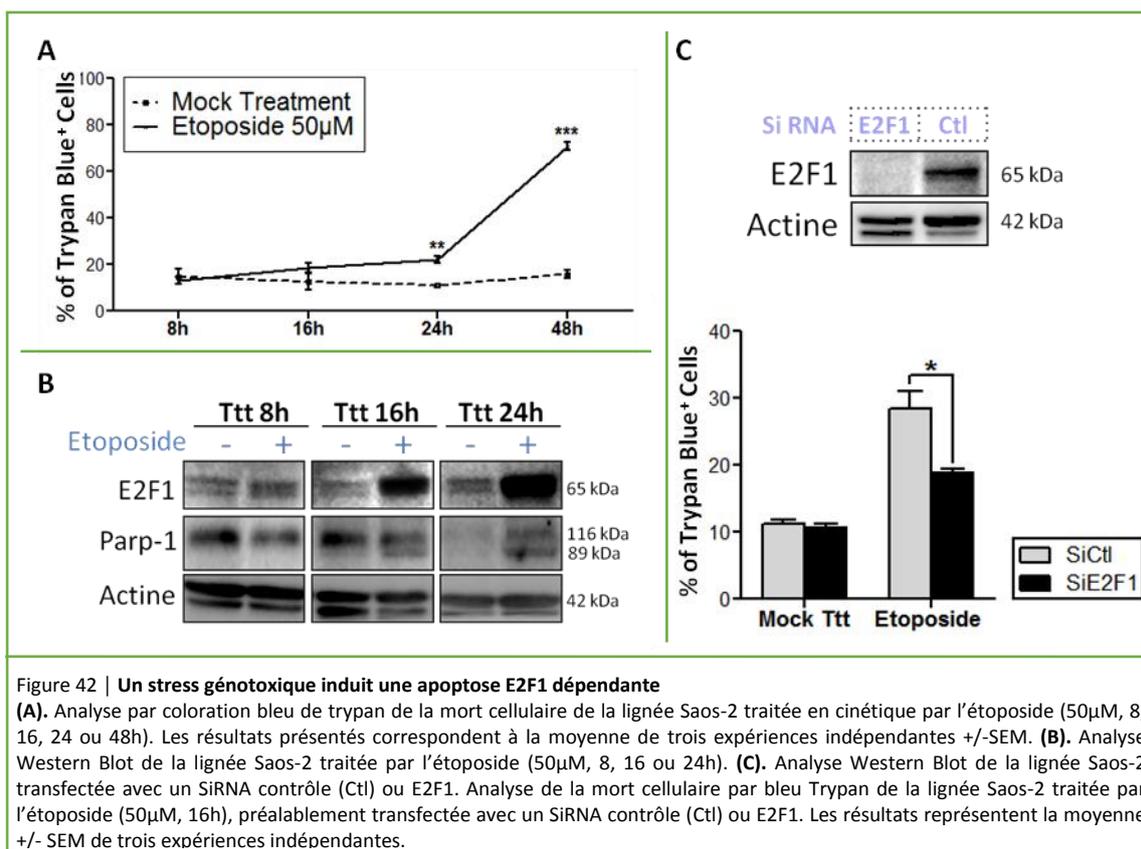
I. L'apoptose induite par un stress génotoxique est dépendante d'E2F1

Afin d'étudier l'apoptose induite par E2F1, nous avons choisi comme modèle d'étude la lignée tumorale d'ostéosarcome Saos-2 qui est à la fois déficiente pour p53 et présente une protéine pRB tronquée, de ce fait inactive. Cela permet de nous soustraire à la fois de la voie d'apoptose induite par E2F1, dépendante de p53, et de nous placer dans un contexte cellulaire particulièrement sensible à l'activité d'E2F1 du fait de l'absence de régulation par la protéine pRB. Nous avons utilisé l'étoposide comme stress génotoxique. Cette molécule inhibitrice de la topoisomérase II génère des dommages à l'ADN responsables du déclenchement d'une voie d'apoptose intrinsèque.

Les cellules tumorales Saos-2 ont été traitées avec 50µM d'étoposide en cinétique et des analyses par Western blot et qPCR ont été réalisées. Une augmentation du niveau de protéine E2F1 est observée après 24h de traitement et reste stable jusqu'à 48h (**Figure 41A**). Cette accumulation d'E2F1 sous traitement génotoxique est en accord avec les données décrites dans la littérature indiquant une stabilisation d'E2F1 via des modifications post-traductionnelles à la suite de l'apparition de dommages à l'ADN (Pützer et Engelmann, 2013). L'analyse de l'expression de cibles transcriptionnelles d'E2F1 est présentée **Figure 41B**. Une augmentation de la transcription du gène TP73 est détectée à 16h de traitement. Ce dernier est décrit comme étant l'acteur majoritaire de la mort induite par E2F1 car il prend le relais de p53 et induit en son absence une grande partie de la transcription de ces cibles (Stiewe et Pützer, 2000). Une augmentation du niveau des ARNm codant les protéines pro-apoptotiques BH3-Only est également observée dès 8h de traitement, c'est le cas de Bim, Puma et Noxa. Par ailleurs sous stress génotoxique, la transcription de gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN est augmentée, comme c'est le cas pour Msh2 et Rad51. En revanche, le niveau d'ARNm codant la cycline2A, cible d'E2F1 impliquée dans la progression du cycle cellulaire, est diminué à 8h de traitement probablement dû à un arrêt du cycle cellulaire du fait de dommages à l'ADN. Sous stress génotoxique, on observe donc une modification du programme transcriptionnel en faveur d'un programme génétique bien spécifique, lié à l'apoptose et la réparation de dommages à l'ADN.



La mort cellulaire des Saos-2 traitées par 50µM d'étoposide en cinétique a été évaluée par mesure bleu de trypan (**Figure 42A**). Une augmentation de la mort des cellules est observée en fonction du temps de traitement. Nous noterons une différence importante entre les traitements à 24 et 48h probablement due au temps nécessaire pour que la majorité de la population cellulaire déclenche un programme génétique pro-apoptotique. Une analyse par western blot a été effectuée **Figure 42B** sur les Saos-2 traitées ou non 8, 16 ou 24h. Un clivage de PARP est observé parallèlement à l'accumulation d'E2F1, indiquant que la mort mesurée précédemment présente les caractéristiques d'une réponse apoptotique. Enfin nous avons reconduit ces tests de mort cellulaire dans les cellules tumorales Saos-2 préalablement déplétées de la protéine E2F1 par ARN interférence (**Figure 42C**). Lorsque les niveaux de protéines E2F1 sont diminués, le traitement étoposide n'est plus en mesure d'induire de manière efficace la mort des cellules. Le facteur de transcription E2F1 est donc requis pour la réponse apoptotique de la lignée Saos-2 à un stress génotoxique.

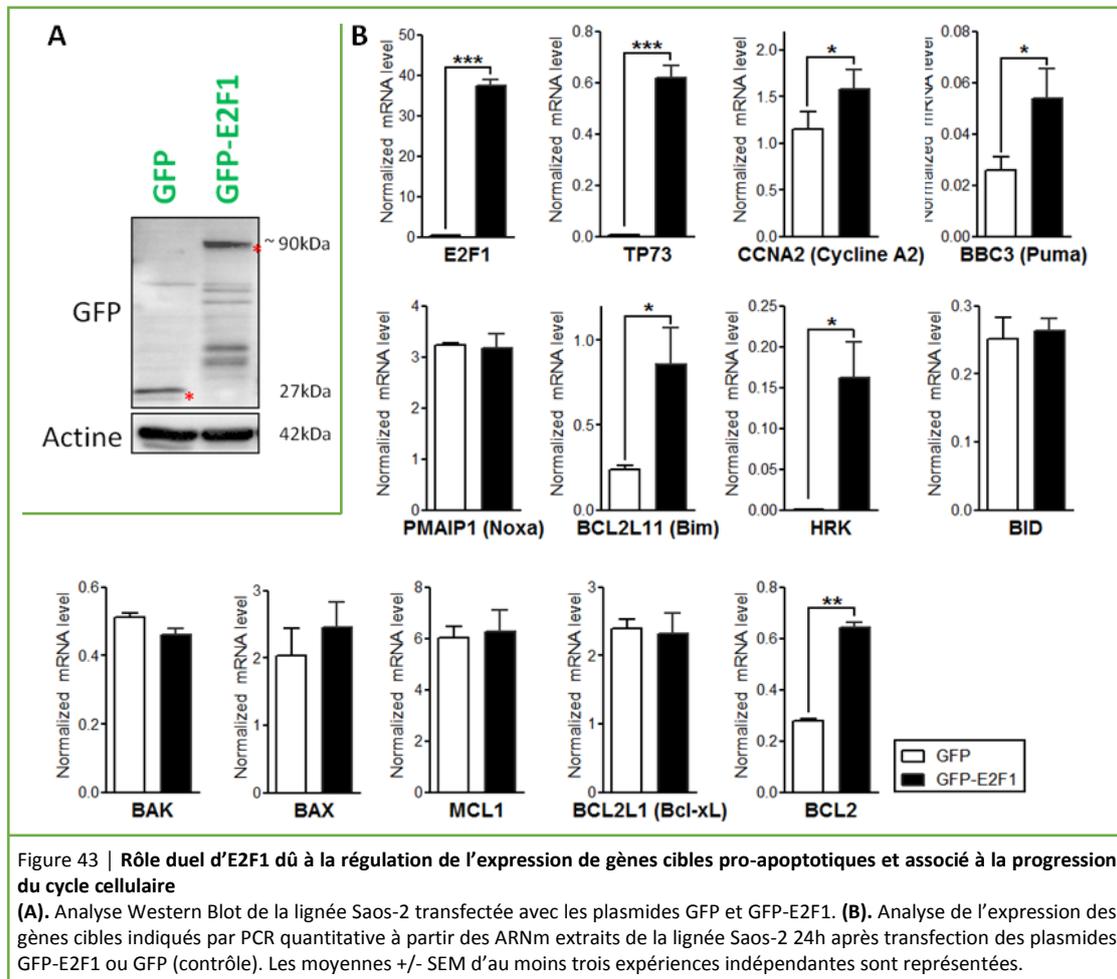


Ces résultats indiquent que dans le modèle cellulaire utilisé, l'étoposide induit une accumulation du facteur de transcription E2F1 associée à une augmentation de la transcription spécifiquement de certains gènes cibles. Cela corrèle avec une mort cellulaire qui s'avère être dépendante d'E2F1.

II. Mise au point d'un modèle de mort cellulaire induite par E2F1

En accord avec d'autres études nos résultats précédents indiquent une accumulation d'E2F1 lors d'un stress cellulaire. Or le dépassement d'un niveau seuil de protéine E2F1 intracellulaire constitue l'un des mécanismes responsable du revirement de ses fonctions dans la progression du cycle cellulaire vers le déclenchement d'une réponse apoptotique (Poppy Roworth et al., 2015). En vue d'étudier plus finement les rouages de la mort induite par E2F1, nous avons souhaité établir un modèle cellulaire plus direct car l'utilisation d'un stress génotoxique modifie différentes voies de signalisation en amont d'E2F1 pour conduire à l'activation de ses fonctions apoptotiques.

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une surexpression d'E2F1 serait suffisante à induire l'apoptose des Saos-2, mimant l'accumulation qui a lieu lors de l'apparition de dommages à l'ADN. Notre modèle consiste donc à exprimer transitoirement, dans la lignée cellulaire Saos-2, la protéine E2F1 fusionnée à la GFP ou la protéine GFP seule qui nous servira de condition contrôle.



Tout d'abord, une analyse par western blot a été réalisée afin de confirmer l'expression de la protéine de fusion. L'anticorps anti-GFP utilisé dans notre étude génère des bandes aspécifiques non retrouvées avec un anticorps dirigé contre E2F1, c'est pourquoi seules les bandes d'intérêt sont indiquées par une astérisque rouge (**Figure 43A**). Dans un second temps, une analyse de la capacité de GFP-E2F1 à transactiver ses gènes cibles a été effectuée par qPCR (**Figure 43B**). Les résultats indiquent que GFP-E2F1 transactive les gènes codant p73 et les BH3-Only : Hrk, Puma, Bim comparé au contrôle GFP. En revanche, aucune transactivation de Noxa n'est observée. Il est possible que l'augmentation de Noxa observée précédemment sous étoposide (**Figure 41B**) ne dépende pas d'E2F1 ou requiert des modifications post-traductionnelles de la protéine et/ou un co-activateur, induits sous stress génotoxique. Par ailleurs, l'expression des ARNm codant les protéines pro-

apoptotiques Bid, Bax et Bak ne semble pas être régulée par E2F1 dans ce contexte cellulaire. Bien que certaines études mentionnent la capacité d'E2F1 à réprimer la transcription des gènes codant les protéines anti-apoptotiques : Bcl-2 et Mcl-1 (Croxtton et al., 2002; Eischen et al., 2001), ceci n'est pas observé dans notre modèle. En revanche une augmentation d'un facteur 2, de la transcription de Bcl-2, est détectée lors de la surexpression de GFP-E2F1. Par ailleurs, la surexpression de GFP-E2F1 est associée à une légère augmentation du niveau d'ARNm codant la cycline A2. Cela dénote une différence entre la surexpression directe de la protéine E2F1 et son accumulation lors d'un stress génotoxique. Cela est probablement dû au fait que la surexpression d'E2F1 mime l'accumulation d'E2F1 observée lors d'un stress cellulaire mais sans reproduire les modifications post-traductionnelles qui ont eu lieu durant ce stress. Or, outre le fait de stabiliser E2F1, elles lui confèrent une spécificité accrue pour lier les promoteurs de gènes cibles pro-apoptotiques ainsi que des co-activateurs favorisant son rôle pro-apoptotique (Biswas et Johnson, 2012; Engelmann et Pützer, 2010). Cependant ces données indiquent que la protéine de fusion GFP-E2F1 est fonctionnelle et conserve sa capacité à induire l'expression de ses gènes cibles.

La mort des cellules surexprimant GFP ou GFP-E2F1 a été mesurée par cytométrie en flux 48h après transfection via un marquage Annexin-V APC qui fixe spécifiquement les phosphatidylsérines présentes sur la face externe de la membrane plasmique lors d'une réponse apoptotique. Les constructions utilisées ici ont pour avantage de permettre de suivre précisément les cellules qui ont surexprimé les protéines d'intérêts par cytométrie en flux. La **Figure 44A** présente un dot plot représentatif où l'on peut voir la population de cellules GFP+ sur les cadrans de droite. Une augmentation de la population de cellules GFP+ Annexin-V APC+ est visible lors de la surexpression de GFP-E2F1 passant de 15% avec la condition contrôle à 42% dans notre condition d'intérêt. Les résultats obtenus sur plusieurs expériences indépendantes indiquent que GFP-E2F1 induit une augmentation significative de la mort cellulaire comparativement à la GFP ; à raison d'un taux d'apoptose de 50% dans la population cellulaire transfectée (**Figure 44B, panel gauche**).

Dans une grande majorité des cas, l'apparition d'une réponse apoptotique est associée à l'activation de la cascade des caspases qui cause la mort des cellules due au clivage d'un très grand nombre de protéines substrats (Tait et Green, 2010). Nous avons souhaité évaluer le rôle des caspases dans la mort cellulaire induite par E2F1. Pour cela, un marquage Caspase 3 clivée a été réalisé dans les Saos-2 surexprimant GFP-E2F1 ou la protéine contrôle GFP, avec une cinétique identique à l'analyse de mort cellulaire effectuée précédemment (**Figure 44B panel central**). Le

clivage de la caspase 3 est effectué par la caspase 9 après son auto-activation dans le complexe apoptosome formé lors d'une MOMP (Li et al., 1997). Ce marquage permet donc de suivre la mise en place de la cascade des caspases lors d'une réponse apoptotique intrinsèque. La moitié des cellules surexprimant GFP-E2F1 présente une activation de la caspase 3 ce qui diffère de la condition contrôle GFP. Afin d'évaluer si cette activité caspase est essentielle à la mort observée après expression de GFP-E2F1, l'analyse de l'apoptose par marquage AnnexinV-APC dans les Saos-2 a été reconduite avec traitement ou non par un inhibiteur de caspase de large spectre : Q-VD-OPh (**Figure 44B panel droit**). L'inhibition de l'activité des caspases abroge complètement l'apoptose des cellules tumorales induite par E2F1.

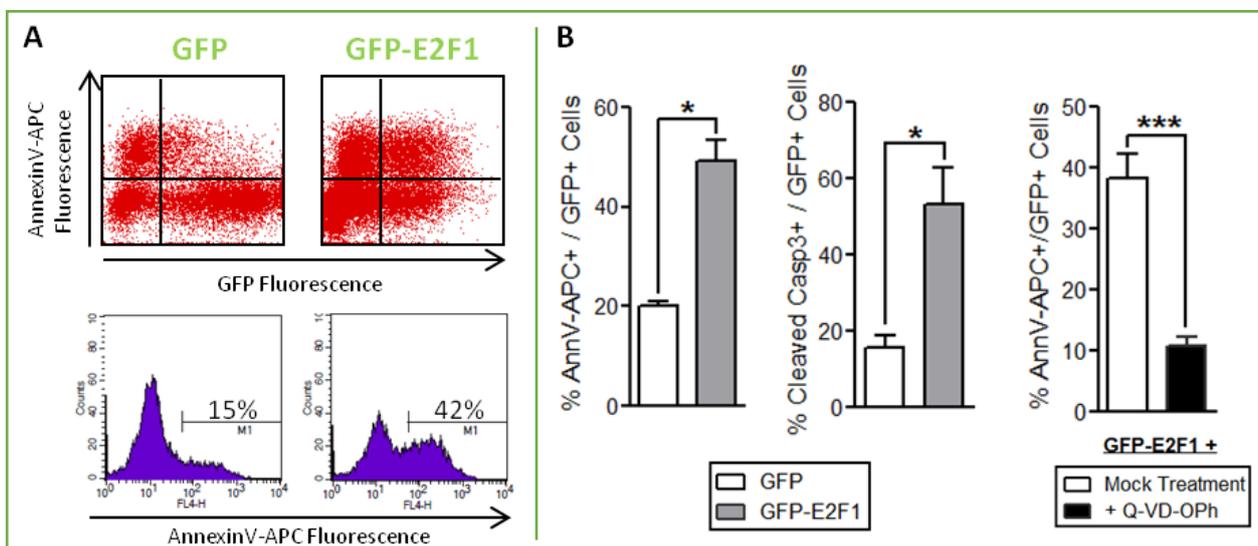


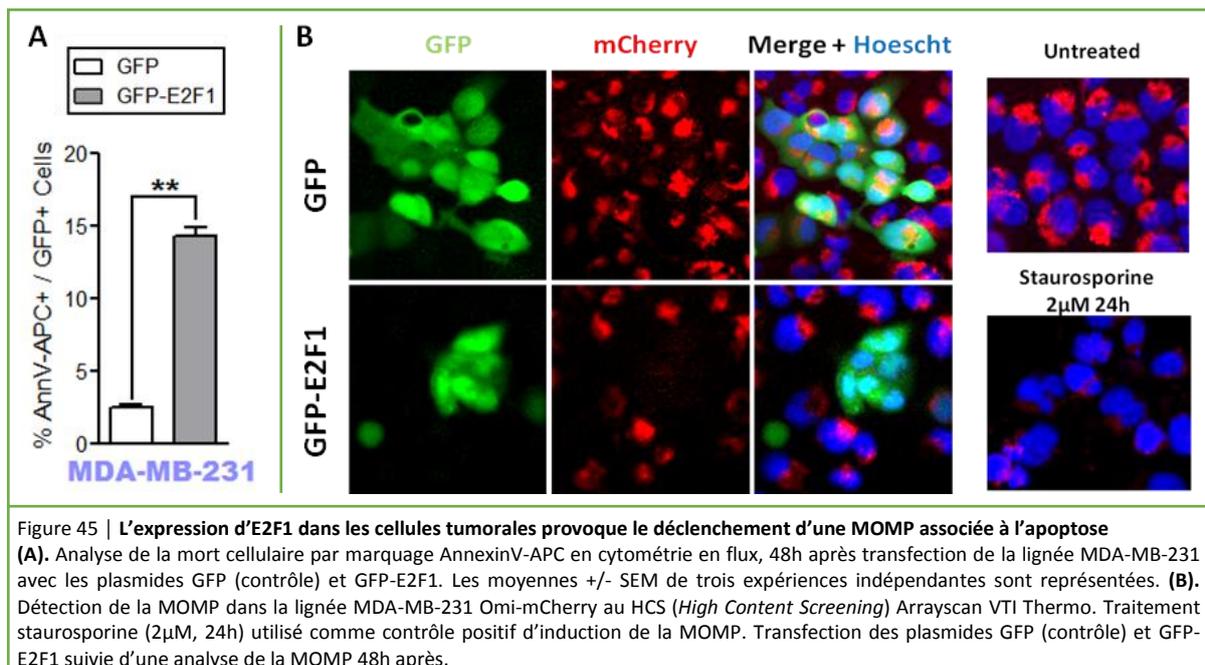
Figure 44 | La surexpression d'E2F1 est suffisante pour déclencher l'apoptose des cellules

(A). Analyse de la mort cellulaire par marquage AnnexinV-APC en cytométrie en flux, 48h après transfection de la lignée Saos-2 avec les plasmides GFP (contrôle) et GFP-E2F1. Dot Plot représentatif d'une expérience. (B). Analyse de la mort cellulaire par marquage AnnexinV-APC (panel gauche) et de l'activation de la caspase 3 par marquage Casp3 clivée-AF647 en cytométrie en flux (panel central), 48h après transfection de la lignée Saos-2 avec les plasmides GFP (contrôle) et GFP-E2F1. Analyse de la mort cellulaire par marquage AnnexinV-APC des Saos-2 surexprimant GFP-E2F1 en présence ou non avec l'inhibiteur de Caspase Q-VD-Oph (5µM, 48h) (panel droit). Les moyennes +/- SEM d'au moins trois expériences indépendantes sont représentées.

Ainsi la seule surexpression d'E2F1 dans les cellules tumorales Saos-2 est suffisante pour induire une réponse apoptotique qui implique la mise en place de la cascade des caspases dont l'activité s'avère indispensable.

La cinétique de réponse apoptotique la mieux décrite correspond à la perméabilisation de la membrane mitochondriale (MOMP), suivie de l'activation de la cascade des caspases (Tait et Green, 2010). Il semble très probable qu'une MOMP soit survenue dans les cellules sensibles aux fonctions apoptotiques d'E2F1, étant donné que l'activité des caspases est nécessaire à la mort cellulaire. Au laboratoire nous disposons d'un modèle d'étude de la MOMP par microscopie, correspondant à la

lignée de cancer du sein MDA-MB-231 qui exprime stablement la protéine Htra2/Omi fusionnée à la mCherry. Cette protéine présente une localisation au sein de l'espace intermembranaire mitochondrial. Lors d'une réponse apoptotique, le déclenchement de la MOMP induit sa libération dans le cytoplasme qui est suivie par sa dégradation par le protéasome. Ainsi les cellules saines présentent une fluorescence rouge ponctuelle au niveau des mitochondries tandis que les cellules en apoptose présentent une fluorescence rouge tout d'abord diffuse au stade les plus précoces de l'apoptose qui tendra à disparaître complètement aux stades de réponse les plus avancés. Dans un premier temps, une analyse du potentiel apoptotique d'E2F1 dans la lignée parentale MDA-MB-231 a été réalisée. Pour cela, une mesure du marquage AnnexinV-APC dans les cellules surexprimant GFP-E2F1 ou le contrôle GFP a été effectuée en cytométrie en flux. La protéine GFP-E2F1 induit une augmentation significative de l'apoptose de la lignée cellulaire, comparée à la condition contrôle (**Figure 45A**). On notera cependant une différence dans l'efficacité d'E2F1 à promouvoir la mort des Saos-2 comparée aux MDA-MB-231. Cette lignée étant mutée pour p53 (p53 R280K), l'apoptose induite par E2F1 s'effectue uniquement par la voie indépendante de p53, comme c'est le cas dans le contexte cellulaire des Saos-2. Cependant pRB est toujours présent dans la lignée MDA-MB-231 et pourrait exercer un frein à l'activité apoptotique d'E2F1. En effet, des études ont montré que bien que la protéine pRB soit connue pour ses fonctions de suppresseur de tumeur, elle peut en inhibant E2F1 prévenir une réponse apoptotique (Dick et Dyson, 2003; Iaquinta et Lees, 2007; Phillips et al., 1997).



Dans un second temps, nous avons mis à profit le modèle MDA-MB-231 Omi-mCherry pour évaluer le déclenchement de la MOMP dans les cellules surexprimant les protéines GFP contrôle ou GFP-E2F1 (**Figure 45B**). La fluorescence rouge Omi-mCherry a donc été suivie par microscopie dans les cellules GFP+. Un traitement Staurosporine 2 μ M 24h nous sert ici de contrôle positif de déclenchement d'une MOMP dans les MDA-MB-231 Omi-mCherry. Après traitement, quasiment l'intégralité de la fluorescence rouge a disparu. Les cellules GFP+ présentent une fluorescence rouge intense et ponctuée signe d'une MOM intègre. *A contrario*, les cellules surexprimant GFP-E2F1 ont perdu leur fluorescence rouge indiquant qu'une MOMP s'est produite dans ces cellules.

L'ensemble des données présentées ci-dessus indique que la seule surexpression d'E2F1 est responsable du déclenchement d'une MOMP associée à une réponse apoptotique dans deux modèles distincts de lignée cancéreuse.

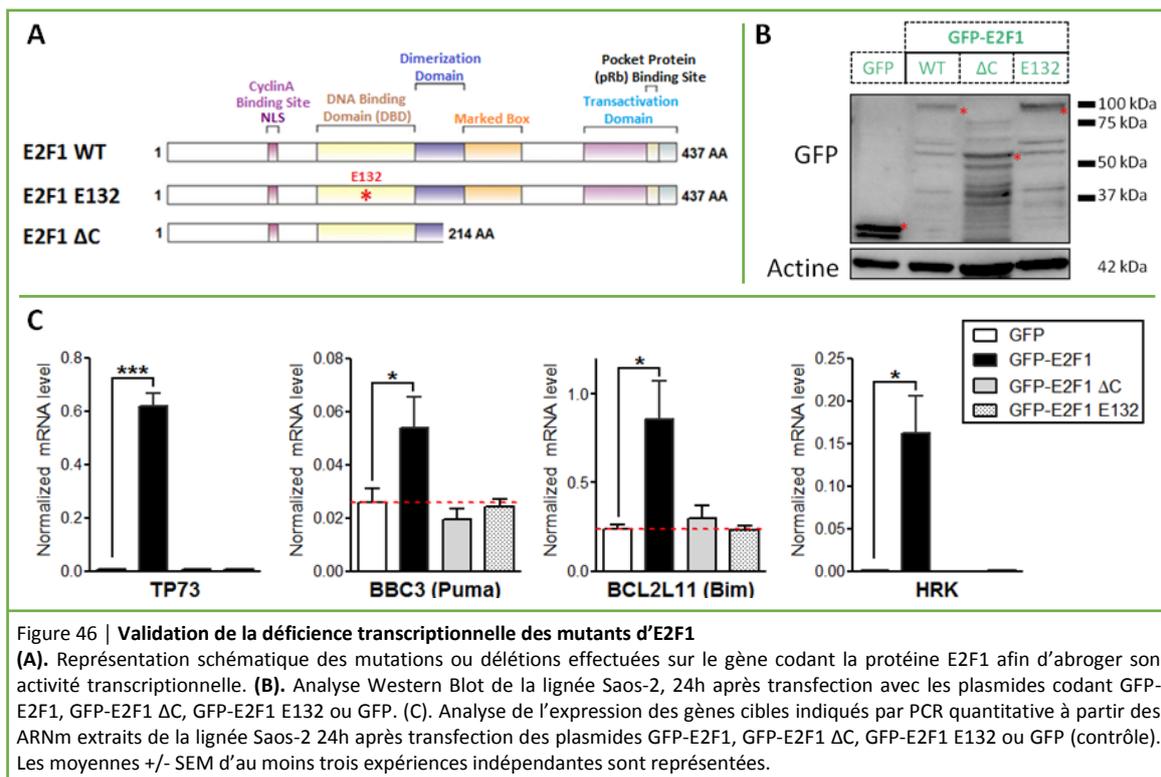
III. La mort cellulaire induite par E2F1 implique une voie non transcriptionnelle

Du fait de nombreuses cibles transcriptionnelles, une dualité existe entre certaines des fonctions exercées par le facteur de transcription E2F1 ; comme c'est le cas entre son rôle dans la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. Des mécanismes complexes régulent finement son activité en faveur d'une voie de signalisation spécifique. Ils agissent notamment sur sa stabilité et son interactome, modifiant ainsi sa spécificité et son affinité pour certains groupes de gènes cibles (Pediconi et al., 2003). L'activité transcriptionnelle d'E2F1 apparait donc au cœur de toutes ses actions dans la cellule. Pourtant certaines de ces fonctions ne semblent pas toujours dépendre de la transcription de gènes cibles. En absence d'activité transcriptionnelle fonctionnelle, E2F1 conserve sa capacité à induire l'apoptose, l'autophagie ou bien la réparation des dommages à l'ADN (Chen et al., 2011; Garcia-Garcia et al., 2012; Gomez-Gutierrez et al., 2010). En revanche en absence de ses fonctions transcriptionnelles, E2F1 n'est plus en mesure de promouvoir la progression du cycle cellulaire (Phillips et al., 1997). Ceci souligne une distinction supplémentaire entre son activité mitogénique et pro-apoptotique.

Dans le cadre de notre étude, nous avons souhaité déterminer si les fonctions transcriptionnelles d'E2F1, en effet actives que ce soit lors d'un traitement par un agent génotoxique ou bien lors de la surexpression directe de la protéine, sont absolument requises pour promouvoir l'apoptose des cellules tumorales.

1. Protéines E2F1 déficientes pour ses fonctions transcriptionnelles

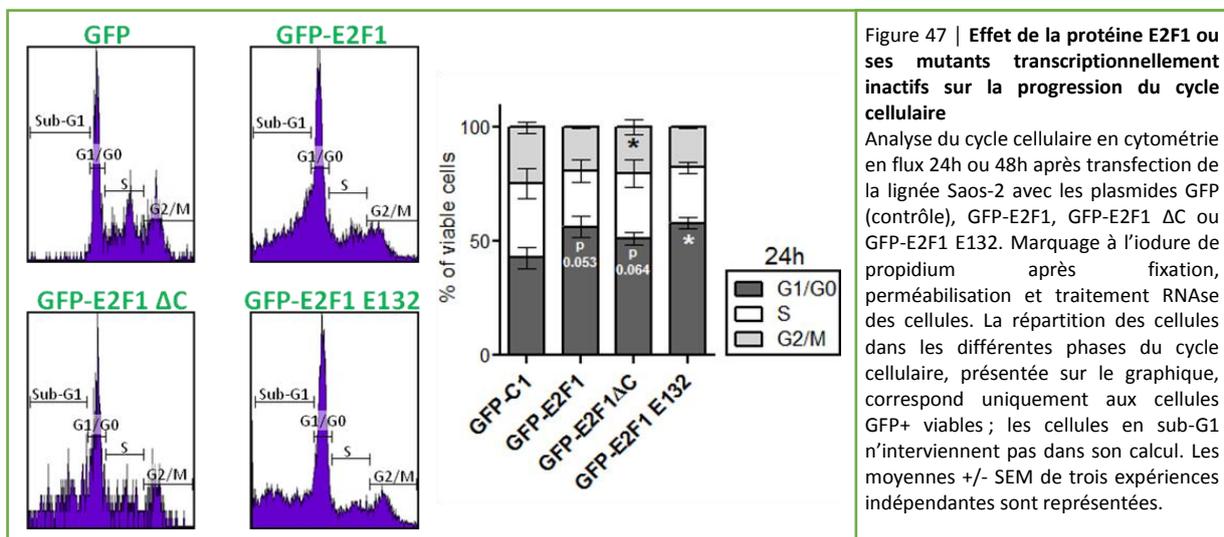
Dans un premier temps, des mutants d'E2F1 fusionnés à la GFP ont été générés comme illustré **Figure 46A**. La protéine E2F1 E132 comporte deux mutations : L132E N133F au niveau du domaine de liaison à l'ADN qui abrogent les liaisons à l'ADN. Le mutant E2F1 ΔC présente une délétion C-terminale ; il ne comporte plus de domaine de transactivation nécessaire pour activer la transcription de gènes cible une fois lié au promoteur de ces derniers. Par ailleurs, il ne possède plus le domaine Marked Box responsable des interactions avec des co-facteurs, conférant une spécificité pour les gènes cibles pro-apoptotiques (Hallstrom et Nevins, 2006). Leur expression a été vérifiée par Western Blot, présenté **Figure 46B**. L'activité transcriptionnelle de ces mutants a été analysée par une approche qPCR. Les résultats, présentés **Figure 46C**, indiquent que ni GFP-E2F1 E132 ni GFP-E2F1 ΔC ne sont capables d'induire la transcription des gènes cibles évalués ici, contrairement à GFP-E2F1 WT qui augmente le niveau d'ARNm de p73, Puma, Bim, Hrk. Un intérêt tout particulier a été porté au gène HRK car l'étude de (Hao et al., 2012) indique que le mutant E2F1 tr (1-374), transcriptionnellement inactif, entraîne une dérégulation du promoteur HRK. L'expression d'E2F1 ΔC (domaine 1-214) ne présente pas un tel effet sur l'expression d'HRK. L'ensemble de ces résultats indique que les deux mutants d'E2F1 sont dépourvus de toute activité transcriptionnelle.



2. Rôle des fonctions transcriptionnelles d'E2F1 dans la progression du cycle cellulaire

Bien avant d'être identifié comme une protéine pro-apoptotique, le facteur de transcription E2F1 a été identifié comme un élément essentiel à la progression du cycle cellulaire. Dans notre modèle de surexpression de GFP-E2F1, la protéine exerce une action pro-apoptotique au sein des cellules tumorales, néanmoins nous n'avons pas connaissance de son action sur le cycle cellulaire. Comme mentionné précédemment, l'étude de (Phillips et al., 1997) indique l'absolu nécessité de ses fonctions transcriptionnelles pour exercer son activité proliférative. Nous avons donc souhaité déterminer, d'une part si dans un contexte où E2F1 est pro-apoptotique, il maintient une activité dans la progression du cycle cellulaire et d'autre part si une différence d'effet est observée en absence de ses fonctions transcriptionnelles.

Une analyse du cycle cellulaire a été effectuée dans la lignée Saos-2 24h après surexpression de GFP-E2F1 WT, ses mutants déficients transcriptionnellement (E132 et ΔC) ou le contrôle GFP. Après perméabilisation et traitement RNase pour dégrader les ARNs cellulaires, l'ADN des cellules a été marqué par de l'iodure de propidium et le contenu en ADN a été analysé en cytométrie en flux. Des histogrammes représentatifs de la distribution du cycle cellulaire au sein de la population de cellules viables transfectées avec les constructions d'intérêt sont présentés sur la **Figure 47**.



Seule l'apparition d'une population en sub-G₁ apparaît flagrante dans les conditions GFP-E2F1 ou avec ses mutants, comparée à la condition contrôle. Les cellules en sub-G₁ correspondent à une population dont le contenu en ADN est inférieur à 2n, caractéristique de la fragmentation de l'ADN survenant au cours de la mort cellulaire. Le graphique regroupant la distribution des

différentes phases du cycle sur trois expériences indépendantes indique qu'en présence d'E2F1 ou de ses formes transcriptionnellement inactives, la population en phase G₁/G₀ tend à augmenter. Cela peut être une conséquence de l'activité pro-apoptotique d'E2F1 et correspondrait à un arrêt du cycle. Cet effet étant reconduit dans les conditions de déficience transcriptionnelle, la question se pose de déterminer le potentiel pro-apoptotique des mutants d'E2F1.

Ces résultats indiquent que dans notre modèle, E2F1 n'exerce pas son rôle pro-prolifératif en induisant la transition G₁/S par la transcription de gènes cibles, bien que nous observions une induction de la cycline A2 lors de la surexpression de GFP-E2F1 (**Figure 43**). Ainsi l'apport excessif d'E2F1 n'est pas responsable d'une modification de la progression du cycle cellulaire dans les cellules tumorales viables. Ces données sont cohérentes avec le modèle qu'E2F1 selon son niveau d'expression intracellulaire va soit réguler la progression du cycle cellulaire soit l'apoptose. Ces deux fonctions étant diamétralement opposées, il est difficile d'imaginer qu'elles puissent s'orchestrer simultanément. Cela ne se produit pas dans notre modèle, E2F1 n'y exerce qu'un rôle suppresseur de tumeur en promouvant l'apoptose.

3. Rôle des fonctions transcriptionnelles d'E2F1 dans la voie d'induction de l'apoptose

La capacité pro-apoptotique des différents outils dont nous disposons a été évaluée dans la lignée cellulaire Saos-2. L'apoptose a été mesurée après transfection des constructions codant GFP-E2F1, GFP-E2F1 E132, GFP-E2F1 ΔC ou le contrôle GFP, par marquage AnnexinV-APC en cytométrie en flux (**Figure 48A**). Les deux mutants d'E2F1 induisent l'apoptose des cellules tumorales, comparé à la condition contrôle GFP. La protéine E2F1 E132 semble induire un niveau plus faible de mort cellulaire qu'E2F1 (28% vs 38%, respectivement). Si l'on considère que la forme sauvage exerce une action pro-apoptotique d'une part transcriptionnelle et d'autre part non transcriptionnelle, il n'est donc pas absurde que le mutant E2F1 E132, qui ne peut agir que sur un plan non transcriptionnel, voit son effet pro-apoptotique diminué. En revanche, l'effet inverse est observé dans le cas du mutant E2F1 ΔC. Il ne peut être exclu qu'un mécanisme semblable à celui décrit par (Hao et al., 2012) se produise au niveau du promoteur d'autres gènes cibles pro-apoptotiques qui n'auraient pas été analysés lors de notre étude qPCR. Ce mutant pourrait donc, par sa capacité à lier l'ADN, interférer avec le programme transcriptionnel des cellules, et potentiellement comme l'E2F1 E132, agir sur une voie non transcriptionnelle n'impliquant pas de liaison à l'ADN.

L'expérience a été reconduite dans la lignée MDA-MB-231 et comme précédemment, en absence de fonction transcriptionnelle, les deux mutants sont encore en mesure d'induire la mort des cellules comparée à la condition contrôle GFP (**Figure 48B, panel gauche**). Nous noterons que les distinctions entre les mutants d'E2F1 ne sont pas retrouvées dans cette lignée. L'induction de la MOMP a ensuite été examinée dans les MDA-MB-231 Omi-mCherry, 48h après surexpression de GFP-E2F1 E132 et GFP-E2F1 ΔC. Comme illustré **Figure 48B, panel droit**, les deux mutants induisent la MOMP des cellules qui les surexpriment, car ces dernières présentent un profil de fluorescence rouge diffus et de faible intensité.

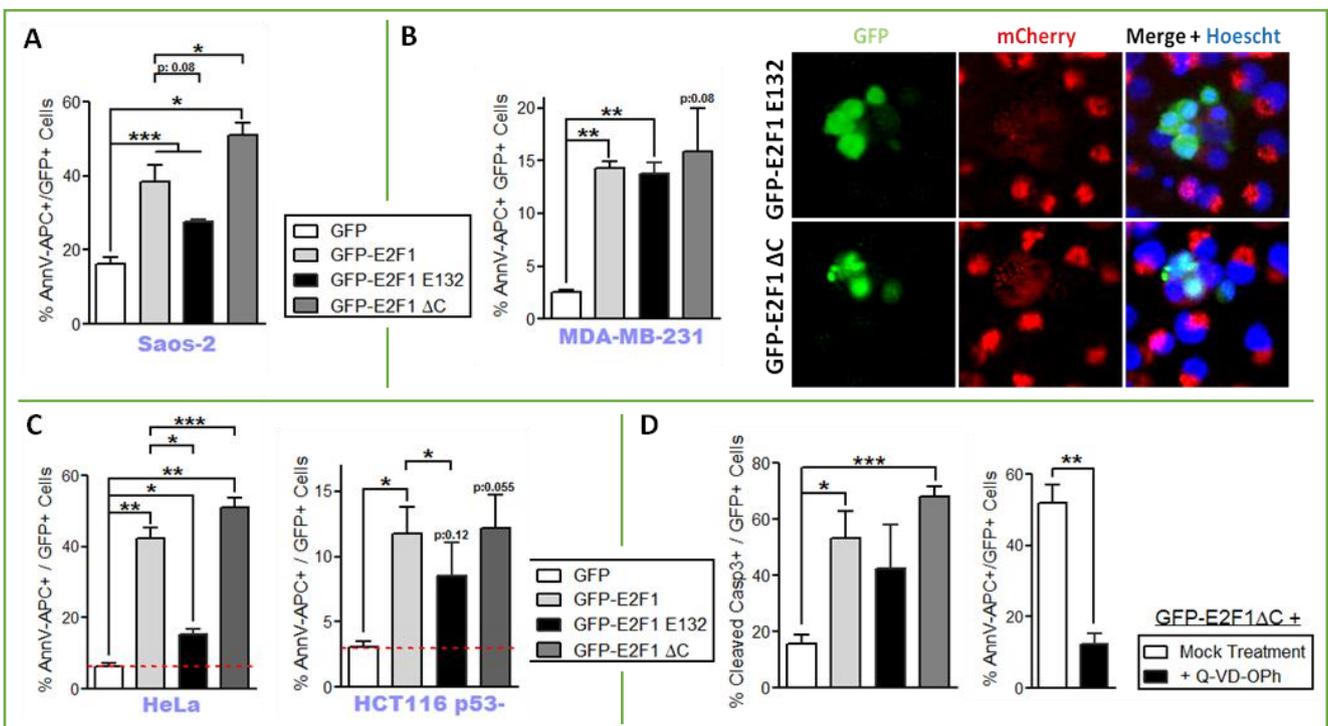


Figure 48 | Indépendamment de ses fonctions transcriptionnelles E2F1 induit l'apoptose
(A, B, C). Analyse de la mort cellulaire par marquage AnnexinV-APC en cytométrie en flux, 48h après transfection des lignées Saos-2 **(A)**, MDA-MB-231 **(B, panel gauche)**, HeLa ou HCT116 p53^{-/-} **(C)**, avec les plasmides GFP (contrôle), GFP-E2F1, GFP-E2F1 E132 ou GFP-E2F1 ΔC. Les moyennes +/- SEM de trois expériences indépendantes sont représentées. **(B, panel droit).** Détection de la MOMP dans la lignée MDA-MB-231 Omi-mCherry au HCS 48h après transfection des plasmides GFP-E2F1 E132 ou GFP-E2F1 ΔC. **(D).** Analyse de l'activation de la caspase 3 par marquage Casp3 clivée-AF647 (panel gauche) et la mort cellulaire par marquage AnnexinV-APC en présence ou non de l'inhibiteur de Caspase Q-VD-Oph (5μM, 48h) (panel droit) en cytométrie en flux, 48h après transfection de la lignée Saos-2 avec les plasmides GFP (contrôle), GFP-E2F1, GFP-E2F1 E132 ou GFP-E2F1 ΔC. Les moyennes +/- SEM d'au moins trois expériences indépendantes sont représentées.

Les lignées HeLa et HCT116 p53^{-/-} ont été utilisées afin d'étendre notre analyse du rôle des fonctions transcriptionnelles dans l'apoptose contrôlée par E2F1 à d'autres modèles tumoraux (**Figure 48C**). La lignée HeLa de carcinome cervical présente la particularité de contenir dans son génome des séquences du papillomavirus humain HPV-18. Ces dernières codent notamment pour les oncoprotéines virales E6 et E7, qui en fixant p53 et pRb respectivement, conduisent : pour p53 à sa dégradation et pour pRb à son inactivation (Münger et al., 1992). Ainsi ces cellules tumorales

présentent un niveau d'expression de p53 presque nul et une suppression de la voie de régulation des E2Fs par pRb. Cela constitue un fond cellulaire où l'activité d'E2F1 n'est pas réprimée par pRb et où ses fonctions apoptotiques se feront par le biais d'une voie indépendante de p53. La surexpression de GFP-E2F1 induit significativement la mort des cellules. Le potentiel apoptotique de la protéine GFP-E2F1 E132 est fortement affaibli comparé à la forme sauvage (15% vs 42%, respectivement). L'effet inverse est observé avec la protéine GFP-E2F1 ΔC . Cela conforte notre hypothèse que les deux mutants d'E2F1 utilisés ici n'agissent pas selon le même mécanisme au vu des différences observées entre leurs effets apoptotiques. La lignée HCT116 p53^{-/-} est déficiente pour la protéine p53 mais possède une protéine pRb fonctionnelle. La protéine GFP-E2F1 induit l'apoptose des cellules, néanmoins les niveaux de mort atteints restent relativement faibles indiquant une sensibilité réduite de cette lignée à la mort cellulaire induite par E2F1. Cela fait écho aux taux d'apoptose mesurés dans les MDA-MB-231. Il se trouve que ces deux lignées présentent une protéine pRB fonctionnelle pouvant en partie restreindre la mort induite par E2F1. Les deux mutants d'E2F1 semblent exercer une activité apoptotique, une fois encore, plus faible pour E2F1 E132 comparée à la forme sauvage.

Ces données indiquent que la protéine E2F1 ne requiert pas ses fonctions transcriptionnelles pour agir sur la voie d'apoptose intrinsèque et ainsi moduler le déclenchement de la MOMP et la mort des cellules tumorales. Cependant, la sensibilité des cellules à une voie d'apoptose transcriptionnelle et/ou non transcriptionnelle diffère selon les fonds cellulaires. Cela est particulièrement bien illustré avec les lignées MDA-MB-231 et HeLa. Tandis que la première répond de manière similaire à E2F1 et ses mutants déficients pour la transcription, la seconde s'avère beaucoup moins sensible aux fonctions pro-apoptotiques d'E2F1, en absence de liaison à l'ADN. Ces résultats suggèrent qu'E2F1 induit l'apoptose en agissant sur deux voies : dépendantes de la transcription de gènes cibles pro-apoptotiques ou non ; plus ou moins mises à profit pour induire l'apoptose selon le contexte cellulaire.

Nous avons souhaité évaluer le rôle des caspases dans la mort induite par E2F1 en présence ou non d'une activité transcriptionnelle fonctionnelle. Un marquage Caspase 3 clivée a été réalisé dans les Saos-2 surexprimant GFP-E2F1, ses mutants ou la protéine contrôle GFP, avec une cinétique identique à l'analyse de mort cellulaire effectuée précédemment (**Figure 48D, panel central**). Une activation de la caspase 3 est observée lors de la surexpression d'E2F1 et du mutant E2F1 ΔC comparativement à la protéine contrôle GFP. Une tendance similaire est observée avec le

mutant E2F1 E132. Les résultats obtenus indiquent l'activation des caspases, lors de la réponse apoptotique orchestrée par E2F1, qu'elle implique ou non la transcription de gènes cibles. Une mesure de l'apoptose des Saos-2, induite par GFP-E2F1 ΔC , a été reconduite en présence ou non d'un inhibiteur de caspase de large spectre : Q-VD-OPh (**Figure 48D, panel droit**). L'inhibition de l'activité des caspases abroge complètement l'apoptose dépendante d'E2F1 ΔC .

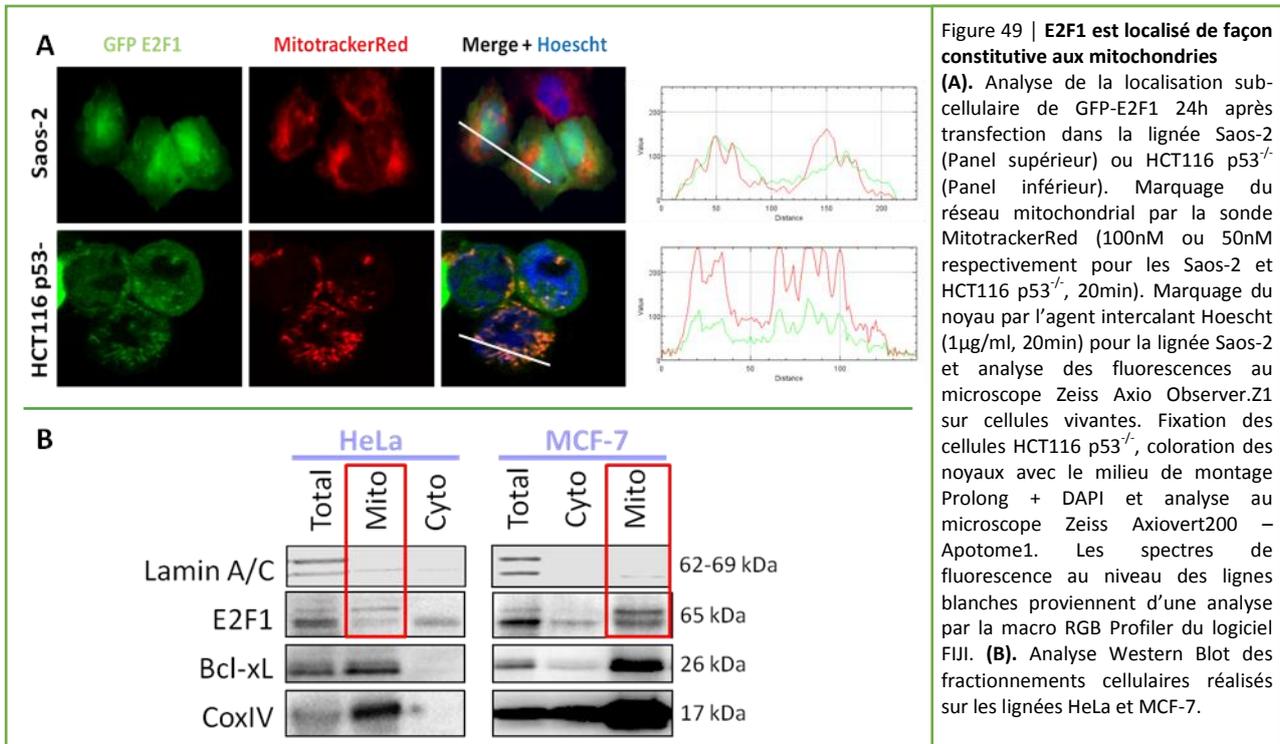
L'ensemble de nos résultats démontre que la protéine E2F1 induit une apoptose mitochondriale mettant en jeu des caspases et dont les voies de déclenchement en amont peuvent impliquer la transcription de gènes cibles ou en être complètement indépendantes.

IV. Localisation de la protéine E2F1 au niveau des mitochondries

L'existence d'une voie d'induction de l'apoptose par E2F1 indépendamment de ses fonctions transcriptionnelles soulève de nombreuses questions. Comment cette voie se déclenche-t-elle ? De quel mécanisme l'apoptose découle-t-elle suite à l'activation des fonctions pro-apoptotiques non-transcriptionnelles d'E2F1 ? Quels sont les partenaires protéiques intervenant ? Existe-t-il une coopération entre les voies de signalisation transcriptionnelle et non transcriptionnelle ?

Ce sont autant de questions que d'hypothèses excitantes à tester. Nous avons tout d'abord porté notre attention sur une première hypothèse à savoir si E2F1 pouvait exercer ses fonctions non transcriptionnelles en dehors du noyau auquel cas cela impliquerait une localisation d'E2F1 dans un autre compartiment cellulaire que le compartiment nucléaire. Afin d'étudier ce point, la protéine GFP-E2F1 a été surexprimée dans deux lignées cellulaires différentes : les cellules d'ostéosarcome Saos-2 et la lignée de cancer colorectal HCT116 p53^{-/-}. L'emploi de Mitotracker rouge a été pratiqué afin de marquer le réseau mitochondrial et l'utilisation d'un intercalant de l'ADN Hoeschst ou DAPI a été réalisée pour visualiser le noyau des cellules. La **Figure 49A** illustre le profil de fluorescence observé dans les cellules surexprimant GFP-E2F1. Outre sa localisation nucléaire, fortement majoritaire dans les Saos-2, la présence d'E2F1 est visible dans le compartiment cytoplasmique des deux lignées. Des zones de fluorescence verte davantage ponctuées sont détectées au cytoplasme et coïncident avec la présence d'une fluorescence rouge compatible avec une colocalisation de GFP-E2F1 au niveau du réseau mitochondrial. Le profil des fluorescences obtenu grâce au logiciel FIJI confirme la superposition des fluorescences vertes et rouges sur la ligne blanche analysée. Ces résultats semblent donc indiquer qu'E2F1, en plus de sa

présence attendue au noyau, est retrouvé au cytoplasme et potentiellement au niveau des mitochondries.



Les résultats présentés ci-dessus nécessitent une approche complémentaire, c'est pourquoi des fractionnements cellulaires ont été effectués dans différentes lignées tumorales : les lignées de cancer du col de l'utérus HeLa et de cancer du sein MCF-7. Cette seconde approche a pour avantage d'effectuer une analyse de la localisation cellulaire des protéines endogènes. Le fractionnement permet d'éliminer la fraction nucléaire et de séparer la fraction cytoplasmique des cellules, de la fraction dite à « lourdes membranes ». Elle est souvent considérée comme la fraction mitochondriale même s'il ne peut être exclu qu'une partie du réticulum endoplasmique y soit présente étant donné les contacts membranaires existants entre ces deux compartiments : les MAMs (*Mitochondria Associated ER Membrans*) (Vance, 1990, 2014; van Vliet et al., 2014). Dans un premier temps, il est nécessaire de contrôler la pureté des fractions obtenues. La Lamin A/C est un constituant de l'enveloppe nucléaire, elle est utilisée ici comme contrôle d'une contamination nucléaire dans les fractions cytoplasmiques et mitochondriales. Dans les deux fractionnements présentés en **Figure 49B**, les fractions cytoplasmiques ou mitochondriales ne présentent pas de contamination nucléaire notable. Le deuxième marqueur utilisé ici, CoxIV permet de vérifier la présence de protéines mitochondriales dans la fraction correspondante ce qui est le cas dans les fractions des cellules HeLa et MCF-7. La protéine Bcl-xL présentant majoritairement une localisation

mitochondriale nous sert de second contrôle pour les deux fractions analysées. De manière intéressante, la protéine E2F1 endogène est retrouvée présente au cytoplasme mais également dans la fraction mitochondriale. Nous observons aussi une bande de plus haut poids moléculaire, enrichie dans les fractions mitochondriales, soulevant la question d'une forme d'E2F1 modifiée post-traductionnellement.

L'ensemble de ces expériences indique qu'E2F1, bien qu'étant un facteur de transcription avec une localisation prépondérante au noyau, est également retrouvé au cytoplasme, notamment au niveau des mitochondries, et ce de façon constitutive au sein des cellules tumorales.

V. Rôle du pool d'E2F1 mitochondrial

Nos travaux ont mis en évidence d'une part l'existence d'une voie d'apoptose médiée par E2F1 qui ne nécessite pas la transcription de gènes cibles et d'autre part l'identification d'un pool de protéine E2F1 au niveau des mitochondries. Existe-t-il un lien entre ces deux événements ? Quel est le rôle des protéines E2F1 au niveau des mitochondries ? La présence de protéines nucléaires exerçant des fonctions aux mitochondries a déjà été décrite dans la littérature. C'est notamment le cas du facteur de transcription p53 ou bien du régulateur d'E2F1 pRB qui tout deux exercent des fonctions pro-apoptotiques directement au niveau des mitochondries (Hilgendorf et al., 2013; Mihara et al., 2003). Ayant connaissance de ces faits nous avons tout naturellement émis l'hypothèse d'un rôle pro-apoptotique d'E2F1 aux mitochondries.

1. Mise au point d'un modèle d'étude du ciblage d'E2F1 aux mitochondries

En vue de déterminer le rôle d'E2F1 aux mitochondries, une protéine E2F1 directement ciblée à ce compartiment a été produite. Pour cela, la séquence d'adressage aux mitochondries de la protéine Ornithine transcarbamylase a été fusionnée à GFP-E2F1 en N-terminal pour générer la construction GFP-E2F1-OTC. Cette séquence d'adressage a été utilisée dans le cadre des travaux sur p53 et pRB. Les protéines ainsi ciblées aux mitochondries entrent dans la matrice mitochondriale où se produit le clivage de la séquence d'adressage, puis se relocalisent vers l'un des compartiments mitochondriaux (MOM, MIM, matrice, espace intermembranaire), auquel elles sont adressées en condition physiologique (Lill et Neupert, 1996; Marchenko et al., 2000; Pfanner et Meijer, 1997).

Dans un premier temps, l'expression des protéines GFP-E2F1 et de sa forme ciblée aux mitochondries a été contrôlée par Western blot (**Figure 50A**). La protéine GFP-E2F1-OTC est bien exprimée, toutefois son expression semble plus faible que la forme sauvage soulignant probablement une stabilité quelque peu affectée par le ciblage mitochondrial. Par ailleurs, la localisation mitochondriale de GFP-E2F1-OTC a été analysée par approche microscopique. Pour cela, les cellules Saos-2 ont été transfectées avec GFP-E2F1-OTC, puis le réseau mitochondrial a été marqué à l'aide de la sonde Mitotracker rouge ; quant au noyau il a été marqué par l'agent intercalant de l'ADN : Hoeschst. Comme illustré **Figure 50B**, la fluorescence présente un profil ponctué semblable à celle du Mitotracker rouge. Les profils de fluorescence au niveau de la ligne blanche, obtenus sur FIJI, indiquent un chevauchement des deux spectres, synonyme d'une colocalisation de GFP-E2F1-OTC avec le réseau mitochondrial. Ainsi la fusion de GFP-E2F1 avec la séquence d'adressage mitochondrial de l'OTC permet un ciblage efficace aux mitochondries.

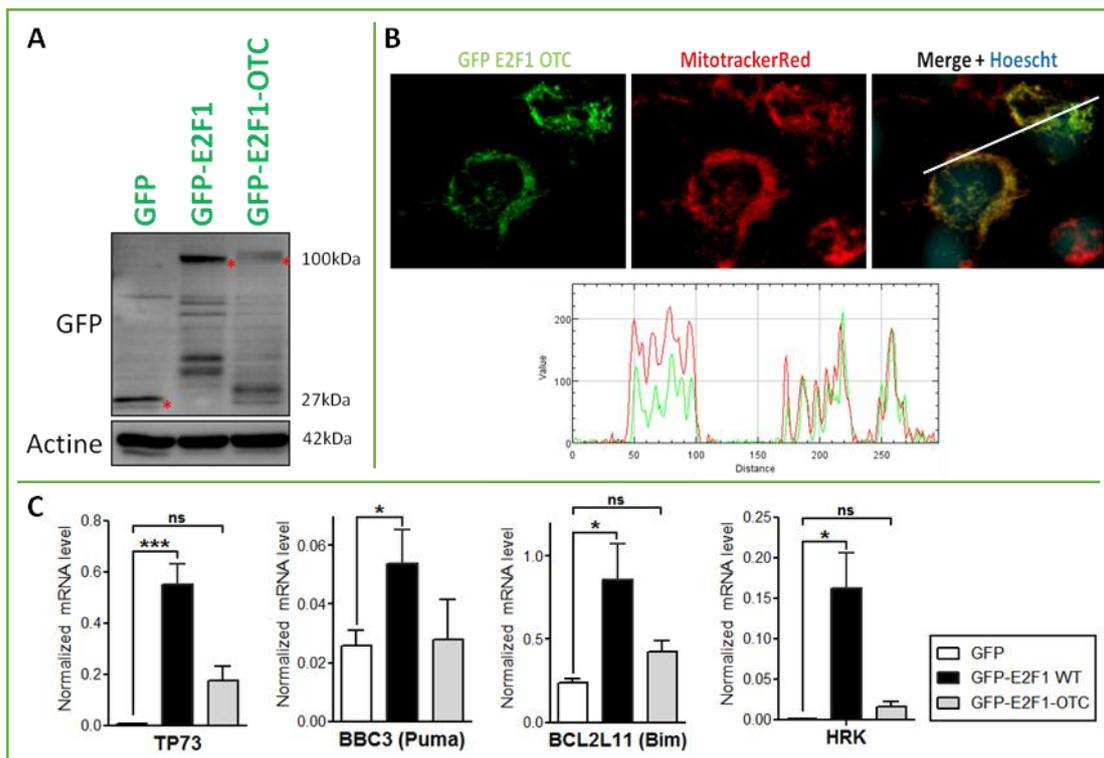


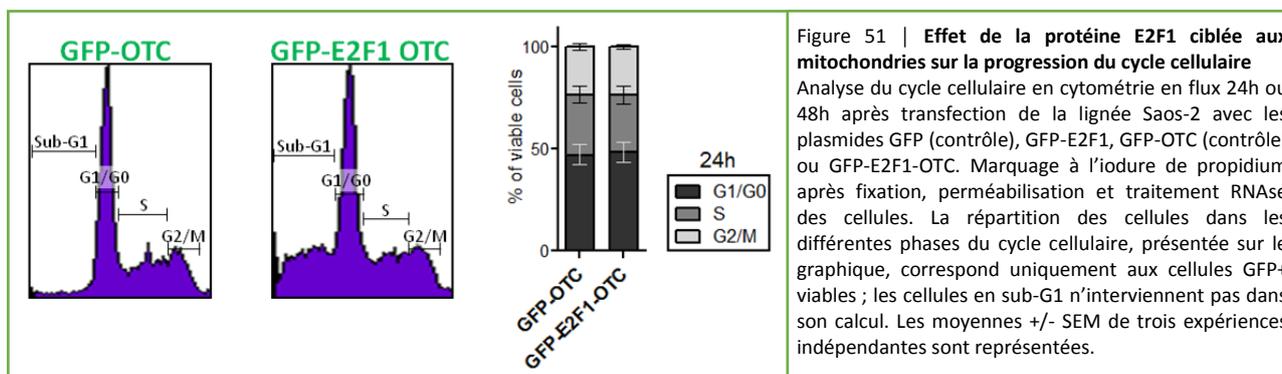
Figure 50 | Ciblage mitochondrial d'E2F1, associé à une perte d'activité transcriptionnelle

(A). Analyse Western Blot de la lignée Saos-2, 24h après transfection avec les plasmides codant GFP-E2F1, GFP-E2F1-OTC ou GFP. **(B).** Analyse de la localisation sub-cellulaire de GFP-E2F1-OTC 24h après transfection dans la lignée Saos-2. Marquage du réseau mitochondrial par la sonde MitotrackerRed (50nM; 20min) et du noyau par l'agent intercalant de l'ADN: Hoeschst (1µg/ml; 20min). Analyse des fluorescences au microscope Zeiss Axio Observer.Z1 sur cellules Saos-2 vivantes. Les spectres de fluorescence au niveau de la ligne blanche proviennent d'une analyse par la macro RGB Profiler du logiciel FIJI. **(C).** Analyse de l'expression des gènes cibles indiqués par PCR quantitative à partir des ARNm extraits de la lignée Saos-2 24h après transfection des plasmides GFP-E2F1, GFP-E2F1-OTC ou GFP (contrôle). Les moyennes +/- SEM d'au moins trois expériences indépendantes sont représentées.

Dans un second temps, l'activité transcriptionnelle des constructions utilisées a été analysée par qPCR, après surexpression de GFP-E2F1-OTC, GFP (contrôle négatif) ou GFP-E2F1 (contrôle positif) dans la lignée Saos-2 (**Figure 50C**). La transactivation des gènes codant p73, Puma, Bim, Noxa et Hrk, détectée lors de la surexpression de GFP-E2F1, n'est pas retrouvée avec la protéine ciblée aux mitochondries. Ainsi la fusion d'E2F1 avec la séquence d'adressage mitochondrial de l'ornithine transcarbamylase permet un ciblage aux mitochondries efficace, qui résulte en une perte de ses fonctions transcriptionnelles.

2. La progression du cycle cellulaire est insensible à la forme mitochondriale d'E2F1

Dans une démarche semblable à celle réalisée avec les mutants d'E2F1 déficients pour la transcription, nous avons dans un premier temps analysé la répartition du cycle cellulaire en présence de GFP-E2F1 mitochondrial en le comparant au contrôle correspondant GFP-OTC : protéine GFP ciblée de la même façon qu'E2F1 aux mitochondries. L'analyse du cycle cellulaire par marquage au iodure de propidium a été effectuée dans la lignée Saos-2 24h après surexpression de ces différentes protéines (**Figure 51**). Aucune différence n'est visible sur la distribution des cellules à travers les phases du cycle cellulaire entre les conditions étudiées. Les données quantitatives sur le graphique confortent effectivement ces observations.



En accord avec la précédente analyse des effets d'E2F1 sur le cycle cellulaire (**Figure 47**), l'apport excessif d'E2F1 aux mitochondries n'est pas responsable d'une modification de la progression du cycle cellulaire dans les cellules viables.

3. E2F1 exerce une fonction pro-apoptotique directement aux mitochondries indépendante de ses fonctions transcriptionnelles

La construction GFP-E2F1-OTC est un outil validé pour son ciblage mitochondrial et sa perte de fonctions transcriptionnelles. Afin d'élucider un potentiel rôle pro-apoptotique d'E2F1 aux mitochondries, nous avons surexprimé dans la lignée cellulaire Saos-2 GFP-E2F1-OTC ou son contrôle correspondant GFP-OTC. La mort cellulaire a été évaluée 48h après transfection des constructions via un marquage AnnexinV-APC en cytométrie en flux. Le dot plot représentatif, **Figure 52A**, indique que 36% de la population cellulaire surexprimant GFP-E2F1-OTC est apoptotique contrairement aux cellules ayant reçues la construction GFP-OTC où le taux de mortalité est de 22%. Le résultat de trois expériences indépendante est présenté **Figure 52B**. Une analyse en parallèle du potentiel apoptotique des protéines ciblées aux mitochondries et des protéines sauvages a été réalisée. Comme obtenu précédemment, GFP-E2F1 induit la mort des cellules à hauteur de 49% comparativement à la protéine contrôle qui cause 20% de mort due à la transfection. Aucune différence significative n'est détectée entre la mort mesurée dans les deux conditions contrôles indiquant qu'en lui-même, le ciblage mitochondrial de protéines par le biais de la séquence d'adressage de l'OTC n'est pas cytotoxique. La forme d'E2F1 ciblée aux mitochondries induit significativement l'apoptose des Saos-2 lors de sa surexpression (38%) comparée au contrôle GFP mitochondrial (24%). La mort ainsi provoquée par E2F1-OTC n'est pas significativement différente de celle induite par E2F1 pourtant la stabilité de la protéine est diminuée, comparée à la forme sauvage (**Figure 50A**). Il est donc possible que son potentiel pro-apoptotique soit sous-estimé. Comme mentionné ci-dessus, GFP-E2F1-OTC est dépourvu de fonction transcriptionnelle mais une activité résiduelle affectant d'autres cibles que celles analysées en qPCR (**Figure 50C**) ne peut être pleinement exclue. Aussi avons-nous généré la forme d'E2F1 inactive sur le plan transcriptionnel et ciblée au compartiment mitochondrial, à savoir la protéine GFP-E2F1 E132-OTC. Au préalable, l'expression des différentes protéines E2F1 et de ses mutants a été vérifiée par Western Blot (**Figure 52C**). L'ensemble des constructions est exprimé avec un niveau légèrement plus élevé pour la protéine E2F1 E132-OTC. La stabilité diminuée d'E2F1-OTC est retrouvée, mais il faut se méfier de sa faible expression sur le Blot car ici le contrôle de charge : actine n'est pas équivalent aux autres conditions. Le potentiel pro-apoptotique d'E2F1 E132 a été évalué dans différentes lignées tumorales, et comparé à celui d'E2F1, lorsque les protéines sont ciblées ou non aux mitochondries (**Figure 52D**). Comme attendu GFP-E2F1 induit l'apoptose de la lignée Saos-2 comparé à la GFP (38% vs 16%), de même que ne le fait son mutant E132 (28% de mort). La

protéine sauvage ciblée aux mitochondries provoque la mort des cellules (30% d'apoptose), et l'ajout de la mutation E132 sur la protéine, ne modifie pas son activité pro-apoptotique (28% de mort) suggérant qu'elle n'impliquait pas la transactivation de gènes cibles.

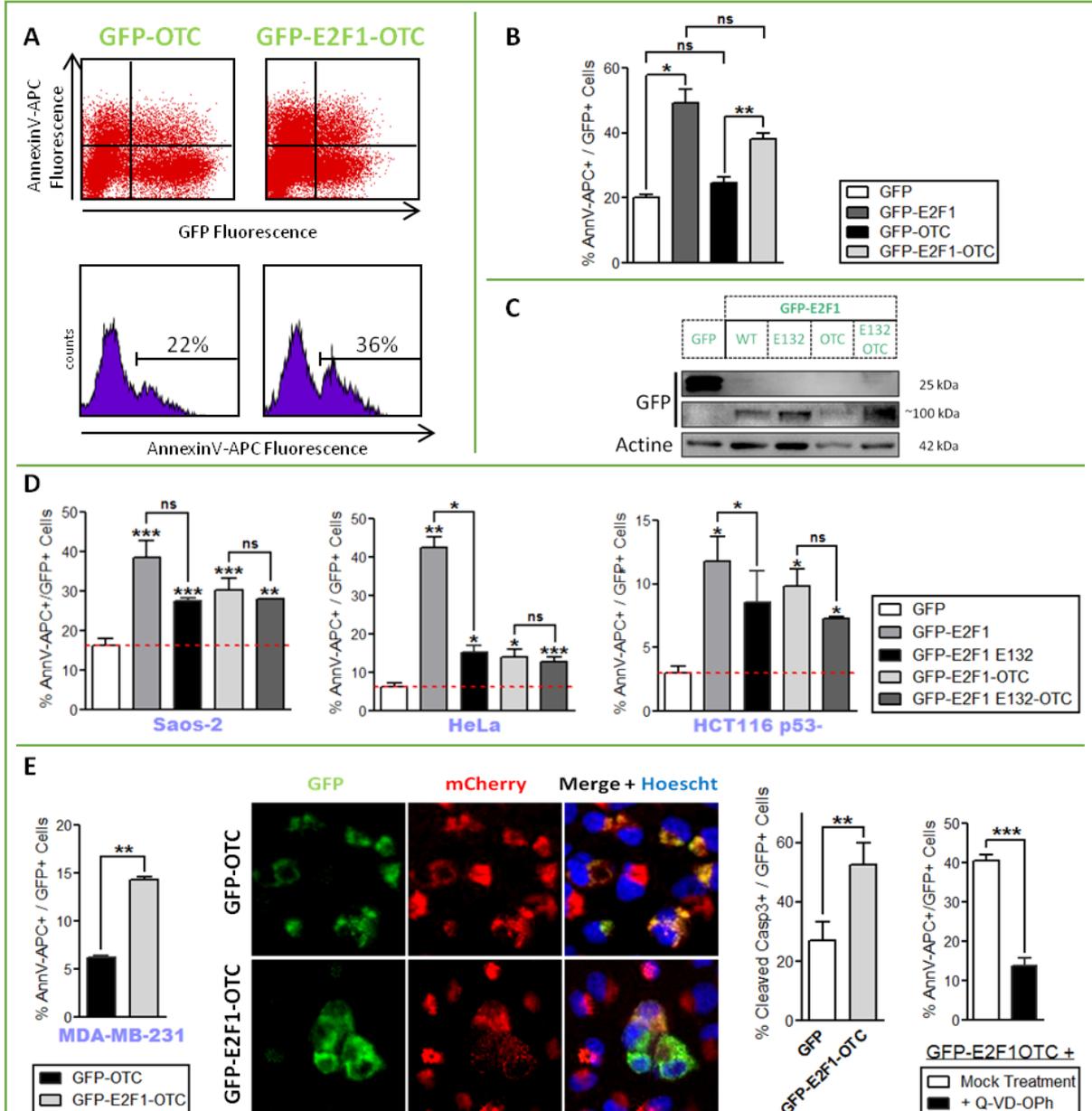


Figure 52 | E2F1 induit l'apoptose intrinsèque en agissant directement aux mitochondries indépendamment de ses fonctions transcriptionnelles

(A,B). Analyse de la mort cellulaire par marquage AnnexinV-APC en cytométrie en flux, 48h après transfection de la lignée Saos-2 avec les plasmides GFP (contrôle), GFP-E2F1 et/ou GFP-OTC (contrôle), GFP-E2F1-OTC. (A). Dot Plot représentatif d'une expérience. (B). L'histogramme représente les moyennes +/- SEM issues de trois expériences indépendantes. (C). Analyse Western Blot de la lignée Saos-2, 24h après transfection avec les plasmides codant GFP-E2F1, GFP-E2F1 E132, GFP-E2F1-OTC, GFP-E2F1 E132-OTC ou GFP. (D). Analyse de la mort cellulaire par marquage AnnexinV-APC en cytométrie en flux, 48h après transfection des lignées Saos-2, HeLa ou HCT116 p53^{-/-} avec les plasmides codant les protéines GFP (contrôle), GFP-E2F1, GFP-E2F1 E132, GFP-E2F1-OTC ou GFP-E2F1 E132-OTC. Les moyennes +/- SEM d'au moins trois expériences indépendantes sont représentées. (E). Analyse de la mort cellulaire des MDA-MB-231 par marquage AnnexinV-APC en cytométrie en flux (panel gauche) et détection de la MOMP dans la lignée MDA-MB-231 Omi-mCherry au HCS (panel droit), 48h après transfection des plasmides GFP-OTC (contrôle) ou GFP-E2F1-OTC. Les moyennes +/- SEM de trois expériences indépendantes sont représentées (panel gauche). (F). Analyse de l'activation de la caspase 3 par marquage Casp3 clivée-AF647 (panel gauche) et de la mort cellulaire par marquage AnnexinV-APC en présence ou non de l'inhibiteur de Caspase Q-VD-OPh (5µM, 48h) (panel droit) en cytométrie en flux, 48h après transfection de la lignée Saos-2 avec les plasmides GFP, GFP-OTC (contrôles) ou GFP-E2F1-OTC. Les moyennes +/- SEM d'au moins trois expériences indépendantes sont représentées

Un profil similaire de mort induite par E2F1 et ses mutants est obtenu dans la lignée HCT116 p53^{-/-}. En revanche, comme nous l'avons constaté sur la **Figure 48C**, la réponse de la lignée HeLa à l'apoptose induite par E2F1 repose principalement sur la transactivation de gènes cibles car la mutation E132 réduit considérablement la capacité d'E2F1 à promouvoir la mort de cette lignée. Le ciblage d'E2F1 aux mitochondries résulte en une mort semblable à celle induite par E2F1 E132. L'ajout de la mutation E132 sur la forme mitochondriale d'E2F1 ne modifie en rien son activité apoptotique indiquant que la protéine E2F1, une fois ciblée à ce compartiment cellulaire induit une mort totalement indépendante de la transcription de gènes cibles. Comme discuté précédemment, la protéine E2F1 induit probablement la mort des cellules via deux mécanismes distincts : l'un transcriptionnel et l'autre non. Le potentiel pro-apoptotique diminué d'E2F1 E132 par rapport à E2F1 résulte possiblement de son action limitée au seul mécanisme non transcriptionnel. Cette hypothèse peut également être soumise dans le cas des différences de niveaux de mort observées entre E2F1 et E2F1 mitochondrial car son ciblage comme la mutation E132 affecte l'activité transcriptionnelle d'E2F1. En outre, cette différence entre la forme sauvage et le mutant E132 n'est plus visible lors du ciblage mitochondrial probablement car les deux protéines agissent déjà toutes deux via un mécanisme similaire non transcriptionnel. Ces différents résultats indiquent qu'E2F1 exerce une action pro-apoptotique lors de son ciblage aux mitochondries, ne faisant aucunement intervenir la transcription de gènes cibles pro-apoptotiques.

Dans une démarche semblable à celle réalisée pour E2F1 et ses mutants inactifs transcriptionnellement, nous avons analysé la capacité d'E2F1 ciblé aux mitochondries à induire la MOMP et par conséquent une activation des caspases. La mesure de mort cellulaire effectuée dans la lignée MDA-MB-231 confirme l'activité pro-apoptotique de GFP-E2F1-OTC comparée au contrôle GFP-OTC (**Figure 52E, panel gauche**). Le modèle MDA-MB-231 Omi-mCherry a donc été une nouvelle fois mis à profit afin de déterminer si E2F1 mitochondrial conserve également sa capacité à déclencher la MOMP. Les données de microscopie, obtenues **Figure 52E, panel droit**, illustrent que le ciblage mitochondrial de la protéine GFP n'est pas cytotoxique pour les cellules. En effet, l'ensemble des cellules GFP+ conserve une fluorescence rouge ponctuée de forte intensité. En outre, elles indiquent que le ciblage mitochondrial d'E2F1 maintient sa capacité à promouvoir la MOMP. Dans ce cas, les cellules présentent une fluorescence rouge diffuse ou quasiment disparue, caractéristique d'une MOMP. En parallèle, une mesure de l'activité de la caspase 3 a été réalisée par marquage avec un anticorps dirigé contre la forme clivée de cette caspase (**Figure 52F, panel gauche**). Cela indique s'il y a eu déclenchement de la cascade des caspases en réponse à la MOMP

induite par E2F1 mitochondrial. Les cellules tumorales Saos-2 qui surexpriment GFP-E2F1-OTC présentent une augmentation du marquage caspase 3 clivée comparées aux cellules transfectées par la condition contrôle GFP (52% vs 27%). Donc la MOMP induite par E2F1 mitochondrial s'accompagne de la mise en place de l'activité des caspases au sein des cellules. L'activité des caspases est-elle, comme dans le cas d'E2F1 WT ou de ses mutants déficients transcriptionnellement, un événement immuable et indispensable à la réponse apoptotique qui suit l'accumulation d'E2F1 aux mitochondries ? La lignée Saos-2 a été transfectée avec GFP-E2F1-OTC en étant soumise ou non à un traitement par l'inhibiteur de large spectre des caspases : Q-VD-OPh. L'inhibition de l'activité des caspases au sein des cellules abroge tout effet apoptotique comme indiqué **Figure 52F, panel droit**. L'apoptose induite par E2F1 aux mitochondries est donc, comme celle déclenchée par E2F1, dépendante de l'activité des caspases.

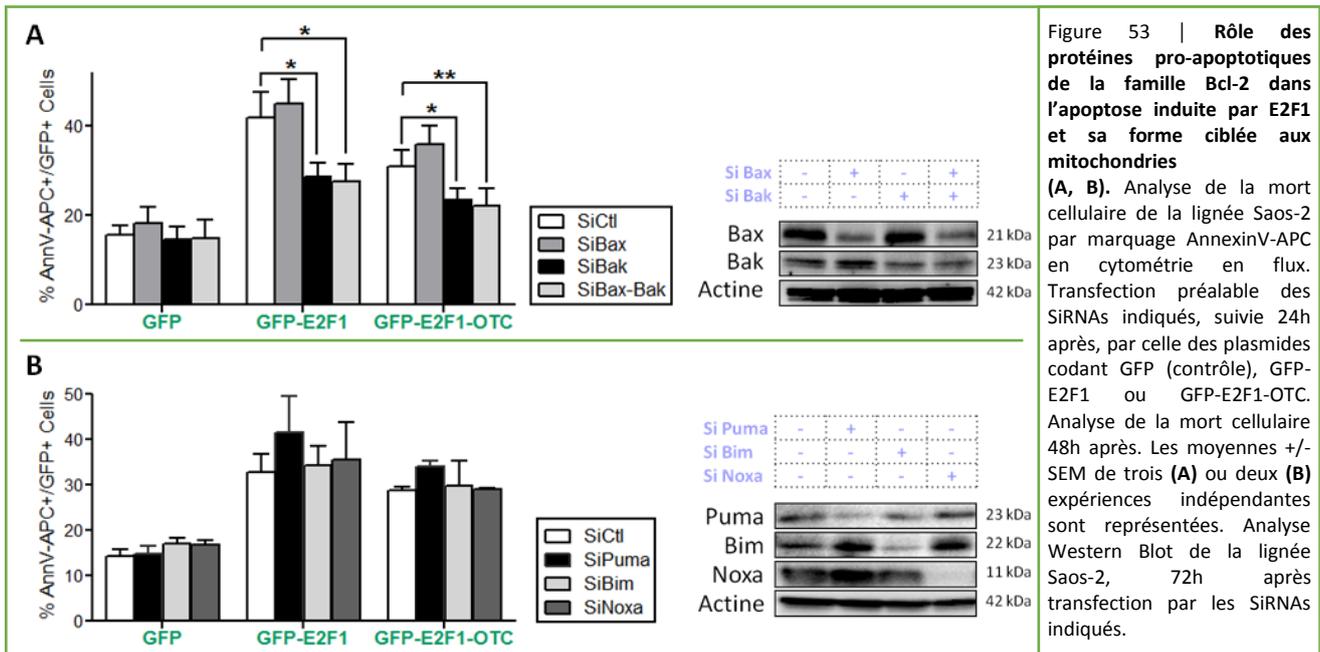
Toutes ces données mettent en évidence une nouvelle fonction pro-apoptotique d'E2F1 directement aux mitochondries, par le biais d'un mécanisme indépendant de la transcription de gènes cibles, faisant intervenir le déclenchement de la MOMP.

4. Caractérisation de la mort cellulaire induite par E2F1 mitochondrial

Afin de mieux comprendre comment s'effectue l'apoptose régulée par E2F1 directement aux mitochondries, nous avons au préalable souhaité déterminer les acteurs majeurs impliqués dans cette mort cellulaire. Ainsi l'implication des effecteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 ainsi que des protéines BH3-Only a été évaluée.

Dans un premier temps, une étude du rôle des protéines pro-apoptotiques effectrices Bax et Bak dans la mort cellulaire régulée par E2F1 et sa forme mitochondriale a été effectuée par une approche de déplétion dans la lignée Saos-2. Un contrôle d'efficacité de la déplétion a été réalisé 72h après transfection des ARNs interférences dirigés contre les protéines d'intérêts ; temps après mise sous silence des protéines effectrices, auquel la mort cellulaire est analysée dans la suite de notre étude. Comme le montre le Western Blot **Figure 53A, panel droit**, une diminution du niveau de protéines Bax et Bak est observée avec les SiRNAs correspondant. Ainsi l'expression des effecteurs est diminuée par ARN interférence, suivie 24h après, par une surexpression de GFP-E2F1, GFP-E2F1-OTC ou la protéine contrôle GFP. La mort cellulaire a été évaluée par marquage AnnexinV-APC dans les cellules GFP+, 48h après (**Figure 53A, panel gauche**). Les protéines GFP-E2F1 ou mitochondriale : GFP-E2F1-OTC, induisent la mort des cellules à hauteur de 42% et 31%

respectivement comparées au contrôle GFP (15%). La déplétion de Bax ne modifie en rien ces niveaux de mort. En revanche, la diminution de protéine effectrice Bak réduit la capacité d'E2F1 et E2F1-OTC à promouvoir la mort des cellules tumorales (28 et 23% respectivement). La déplétion concomitante des deux effecteurs n'affecte pas davantage le pouvoir pro-apoptotique d'E2F1 et E2F1-OTC. Nos résultats indiquent donc que la mort induite par E2F1 ou sa forme accumulée aux mitochondries fait intervenir Bak et non Bax pour promouvoir la MOMP. Cela souligne un rôle non redondant de ces deux protéines au sein de notre modèle cellulaire.



Au vu de ces résultats, il nous a paru intéressant d'approfondir la question concernant la protéine BH3-Only qui pourrait intervenir dans la mort induite par E2F1 et E2F1 mitochondrial conduisant à l'activation de Bak. Pour cela une approche semblable à celle décrite ci-dessus a été mise en œuvre avec une déplétion de différents BH3-Only dans la lignée Saos-2. La **Figure 53B, panel droit**, indique que les SiRNAs ont été efficaces pour la déplétion des protéines ciblées : Puma, Bim ou Noxa. La mesure de la mort cellulaire induite par GFP-E2F1 ou GFP-E2F1-OTC a été effectuée avec la même cinétique que précédemment ; à savoir une surexpression pendant 48h de ces deux constructions ou du contrôle GFP, 24h après déplétion des protéines BH3-Only. Bien qu'une diminution importante du niveau des BH3-Only soit observée sur le Western Blot, aucun effet n'est visible sur les niveaux de mort cellulaire induits par GFP-E2F1 ou GFP-E2F1-OTC (**Figure 53B, panel gauche**). La seule déplétion de l'un de ces BH3-Only est insuffisante pour affecter l'apoptose induite par E2F1 et E2F1 mitochondrial. La liste des protéines BH3-Only ciblées dans

cette expérience n'est pas exhaustive ainsi il est possible qu'une autre protéine BH3-Only que Puma, Bim ou Noxa intervienne. Cela suggère donc soit que les protéines BH3-Only, dont l'expression a été mise sous silence, ne sont nullement impliquées dans le mécanisme de mort orchestré par E2F1 ou E2F1-OTC ou bien que leur action s'avère redondante et nécessite des déplétions concomitantes pour qu'un effet soit visible.

VI. Fraction E2F1 mitochondriale et stress génotoxique

1. Un stress génotoxique favorise le recrutement d'E2F1 aux mitochondries

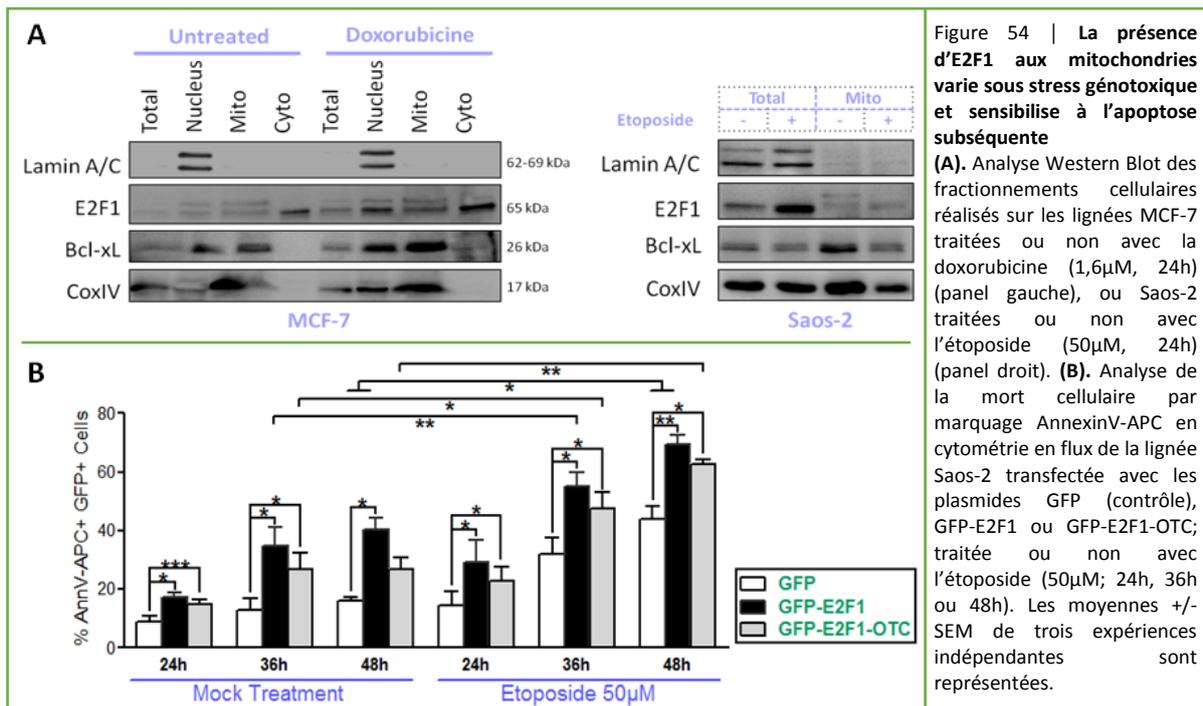
Nos données mettent en évidence pour la première fois l'existence d'un pool d'E2F1 présent constitutivement aux mitochondries dans différentes lignées tumorales. Le ciblage direct d'E2F1 à ce compartiment conduit à une réponse apoptotique intrinsèque. Ces résultats nous confrontent à de nouvelles interrogations. E2F1 aux mitochondries conserve ses fonctions pro-apoptotiques ; alors comment expliquer sa présence aux mitochondries en absence de stress. Le potentiel apoptotique de ce pool d'E2F1 est-il actif ? Ou bien un stress cellulaire est-il requis pour activer les fonctions pro-apoptotiques d'E2F1 aux mitochondries ou promouvoir son accumulation dans ce compartiment au-delà du seuil sub-léthal ?

Comme l'a montré nos travaux précédemment, un stress génotoxique est synonyme d'une accumulation de protéine E2F1 responsable de la mort des cellules. Comment se comporte le pool d'E2F1 aux mitochondries lors d'un stress cellulaire ? Des fractionnements cellulaires ont été réalisés sur les lignées MCF-7 ou Saos-2 traitées ou non pendant 24h par un agent génotoxique, à savoir la doxorubicine et l'étoposide respectivement.

Les fractions nucléaires, mitochondriales et cytoplasmiques ainsi qu'un extrait de protéines du lysat total des MCF-7 ont été déposés sur le Western Blot présenté **Figure 54A, panel gauche**. Tout d'abord, la pureté des fractions mitochondriales est vérifiée par l'absence de Lamin A/C, qui sert de marqueur de la fraction nucléaire, et l'enrichissement en protéine CoxIV, marqueur des mitochondries. En absence de stress, E2F1 est retrouvé au niveau du noyau comme attendu mais également au niveau du cytoplasme et des mitochondries comme l'avaient précédemment indiqué nos données : **Figure 49B**. Nous remarquerons que contre toute attente une proportion plus élevée d'E2F1 est retrouvée au cytosol comparée au noyau. Lors d'un traitement génotoxique, le niveau de protéine E2F1 augmente dans l'extrait total (Ligne5) comparé à celui sans traitement (Ligne 1). Une

analyse plus fine de sa répartition intra-cellulaire lors d'un stress indique que la protéine E2F1 se retrouve augmentée au niveau du noyau en accord avec les données de la littérature qui mentionnent son accumulation dans ce compartiment responsable de l'induction de cibles pro-apoptotiques (Jin et al., 2014). En outre, davantage de protéine E2F1 est détectée dans les fractions cytoplasmiques des cellules traitées comparativement à la même fraction en absence de traitement (Ligne 8 vs 4). Cependant un contrôle de charge de protéines cytoplasmiques serait requis pour l'affirmer pleinement. Par ailleurs, le niveau de protéine E2F1 est plus élevé dans les fractions mitochondriales des MCF-7 sous doxorubicine comparativement à la condition contrôle (Ligne 7 vs 3). Ainsi, la présence d'un stress génotoxique semble augmenter la quantité d'E2F1 aux mitochondries dans la lignée de cancer du sein MCF-7.

Des fractionnements cellulaires ont également été réalisés dans la lignée cellulaire Saos-2, traitées ou non sur 24h avec l'étoposide. Un Western Blot représentatif de l'un d'eux est présenté **Figure 54A, panel droit**. Seuls les extraits totaux et les fractions mitochondriales ont été déposés du fait des problèmes de pureté des fractions nucléaires rencontrés précédemment et d'absence de contrôle de charge pour les fractions cytoplasmiques. Les fractions mitochondriales ne présentent pas de Lamin A/C. L'étoposide augmente le niveau de protéine E2F1 dans les extraits totaux (Ligne 2 vs 1). En absence de stress E2F1 est localisé au niveau des mitochondries confortant les résultats de colocalisation de la fluorescence GFP-E2F1 et Mitotracker rouge obtenus dans les Saos-2 (**Figure 49A**). Un doublet est visible sur le Western Blot et l'hypothèse d'une forme d'E2F1 modifiée post-traductionnellement avait été mise en avant précédemment. En présence d'un traitement étoposide, un changement de profil apparaît : d'une part, il y a une augmentation de la bande inférieure du doublet visible dans les fractions non traitées ; d'autant plus que la quantité de protéine mitochondriale y est plus faible comme l'indique les niveaux de CoxIV et Bcl-xL entre les deux fractions et d'autre part, une disparition de la bande supérieure de ce même doublet est observée. Ainsi, l'étoposide tend à augmenter le recrutement d'E2F1 aux mitochondries dans la lignée Saos-2. Par ailleurs, la diminution de la bande supérieure du doublet d'E2F1 dans les fractions traitées par l'étoposide soulève la question d'une différence d'une ou plusieurs modifications post-traductionnelles d'E2F1 lors d'un stress cellulaire.



L'ensemble de ces résultats indique une élévation du pool d'E2F1 dans les fractions mitochondriales des cellules traitées par un agent génotoxique. Cela suggère qu'un stress cellulaire favoriserait le recrutement d'E2F1 aux mitochondries ou du moins stabiliserait la fraction de protéine E2F1 qui s'y rend de façon constitutive.

2. E2F1 mitochondrial favorise la réponse apoptotique induite par un stress génotoxique

Ayant connaissance d'une augmentation du recrutement du pool d'E2F1 aux mitochondries en condition de stress cellulaire, la question se pose de savoir quelle est sa contribution lors d'une réponse apoptotique à un traitement génotoxique. Pour rappel le mécanisme mis en jeu dans ce cas consiste en une élévation du niveau de protéine E2F1 endogène notamment via une stabilisation protéique grâce à des modifications post-traductionnelles. Cela permet le dépassement d'un seuil de protéine E2F1 dans les cellules au delà duquel ses fonctions pro-apoptotiques prennent le dessus et permettent l'induction par une voie transcriptionnelle de ses gènes cibles pro-apoptotiques tels que les protéines BH3-Only. Nous nous proposons de renforcer l'augmentation de la fraction d'E2F1 aux mitochondries en surexprimant directement la protéine ciblée à ce compartiment afin d'évaluer un potentiel effet coopératif avec la voie de signalisation apoptotique induite par l'agent génotoxique.

Les protéines GFP-E2F1, GFP-E2F1-OTC ou GFP (condition contrôle) ont été transfectées dans la lignée cellulaire Saos-2, puis s'en est suivi un traitement étoposide en cinétique : 24h, 36h ou 48h. La mort cellulaire a été mesurée par marquage AnnexinV au sein de la population de cellules GFP+ (**Figure 54B**). En absence de stress cellulaire (partie gauche), GFP-E2F1 induit l'apoptose des cellules de façon dépendante du temps avec des taux de mort de 17, 35 et 40% à 24, 36 et 48h respectivement par rapport au contrôle GFP (9, 12, 16%). La forme d'E2F1 ciblée aux mitochondries provoque également l'apoptose des cellules à raison de 14 et 27% de mort à 24h et 36-48h respectivement. La mesure de la mort sous traitement étoposide indique une augmentation qui se trouve dépendante du temps dans les cellules exprimant la GFP allant de 14, 32 à 44%. L'accentuation de la réponse apoptotique avec le temps de traitement peut être due à l'induction de gènes cibles pro-apoptotiques avec des cinétiques variables. La présence d'un excès d'E2F1 dans les cellules traitées accroît l'effet du traitement de façon significative dès 24h comparé aux cellules GFP+ traitées. Les niveaux de mort atteignent 29, 55 et 70% à 24, 36 et 48h respectivement. De même la présence du traitement accentue l'effet de l'accumulation de GFP-E2F1 dans les cellules passant de 35 à 55% de mort à 36h et 40 à 70% de mort à 48h entre les cellules exprimant GFP-E2F1 ou GFP-E2F1 sous traitement étoposide. Ainsi une forte accumulation d'E2F1 favorise l'action du traitement génotoxique ce qui peut être due à une augmentation de la transcription de gènes pro-apoptotiques induite de façon concomitante par la protéine E2F1 surexprimée et celle accumulée suite au traitement. Alors qu'en est-il avec la protéine E2F1 ciblée aux mitochondries qui a perdu sa capacité à induire l'expression de gènes cibles ? La surexpression de GFP-E2F1-OTC augmente significativement la mort induite par l'étoposide. Les cellules GFP+ sous traitement présentent des niveaux de mort de 14, 32 et 44% alors qu'ils atteignent 23, 48 et 63% dans les cellules GFP-E2F1-OTC+ sous traitement. Donc l'accumulation d'E2F1 au niveau des mitochondries promeut l'apoptose générée par un stress cellulaire. De même la présence du traitement favorise la réponse apoptotique induite par la surexpression de la protéine aux mitochondries (23, 48 et 63% de mort à 24h, 36h et 48h) car en son absence les cellules surexprimant GFP-E2F1-OTC présentent des taux de mort plus faibles, de 14, 27 et 27% aux différents temps étudiés.

Nos données indiquent qu'en présence d'un excès d'E2F1 aux mitochondries, la mort cellulaire induite par un agent génotoxique est accentuée. Ainsi E2F1 aux mitochondries semble sensibiliser (primer) les cellules, c'est-à-dire que la protéine les rend plus compétentes à répondre efficacement et plus rapidement à un stimulus apoptotique.

3. E2F1 mitochondrial amplifie l'action pro-apoptotiques des protéines BH3-Only

Nos travaux indiquent que la présence d'E2F1 aux mitochondries accentue et accélère la réponse apoptotique à un traitement génotoxique. Cela revient donc à considérer qu'E2F1 par sa présence aux mitochondries augmente le priming mitochondrial pour faciliter l'action des BH3-Only induits par des voies transcriptionnelles suite au traitement. Afin de nous conforter dans cette hypothèse, nous avons souhaité évaluer l'effet qu'E2F1 aurait sur l'action des protéines BH3-Only.

Tout d'abord une mesure de la mort cellulaire induite par les protéines BH3-Only ou effectrices Bax et Bak a été effectuée 24h après surexpression de ces dernières conjointement avec la protéine GFP avec un ratio 3 : 1 en ADN plasmidique (**Figure 55A**). Cet excès de protéines pro-apoptotiques par rapport à la GFP augmente la proportion de cellules GFP+ exprimant parallèlement les protéines BH3-Only ou Bax et Bak qui sont ici non taguées. Un contrôle de l'expression des protéines BH3-Only ou effectrices dans les cellules GFP+ est visible **Figure 55B**. Toutes les protéines pro-apoptotiques sont surexprimées comparé à la condition contrôle vecteur vide (Lignes 4, 7 et/ou 10 vs Ligne1). En revanche la surexpression de Bad nécessite encore confirmation. Le marquage AnnexinV des cellules Saos-2 a été analysé au sein de la population de cellules GFP+ (**Figure 55A**). Les protéines BH3-Only sensibilisatrices Noxa et Bad induisent une faible réponse apoptotique dans 11 et 15% des cellules par rapport au contrôle vecteur vide à 8%. Parmi les protéines BH3-Only activatrices Puma et tBid induisent des niveaux de mort cellulaire plus élevés à raison de 26 et 30% respectivement. La mort cellulaire induite par Bim est à hauteur de 15%. Au regard de nos précédents résultats (**Figure 53A**), la lignée Saos-2 semble particulièrement sensible à l'apoptose dépendante de Bak.

Ces résultats sont en accord avec la sélectivité des BH3-Only Puma et tBid pour Bak contrairement à Bim, due à des différences intrinsèques existant entre les domaines BH3 de ces trois protéines (Lopez et al., 2016). L'activation des effecteurs par les BH3-Only activateurs requiert un domaine BH3 fonctionnel. En effet, la surexpression du mutant Puma3A dans les Saos-2 n'induit aucunement la mort des cellules (8% de mort). Cette protéine présente trois mutations dans le domaine BH3 (L141A D146A L148A) abrogeant sa capacité à fixer la poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques comme celle des effecteurs Bax et Bak supprimant tout son potentiel apoptotique. Enfin la surexpression directe des effecteurs Bax et Bak conduit respectivement à 19 et 15% d'apoptose ; Bak semble donc plus à même de provoquer la MOMP et la mort cellulaire sub-séquente dans la lignée Saos-2 que Bax. Ainsi les cellules tumorales Saos-2 sont sensibles à l'action

pro-apoptotique des protéines BH3-Only et des effecteurs Bax et Bak mais dont le potentiel cytotoxique semble différer selon l'activité sensibilisatrice ou activatrice des protéines, de même que leur sélectivité envers l'un des effecteurs.

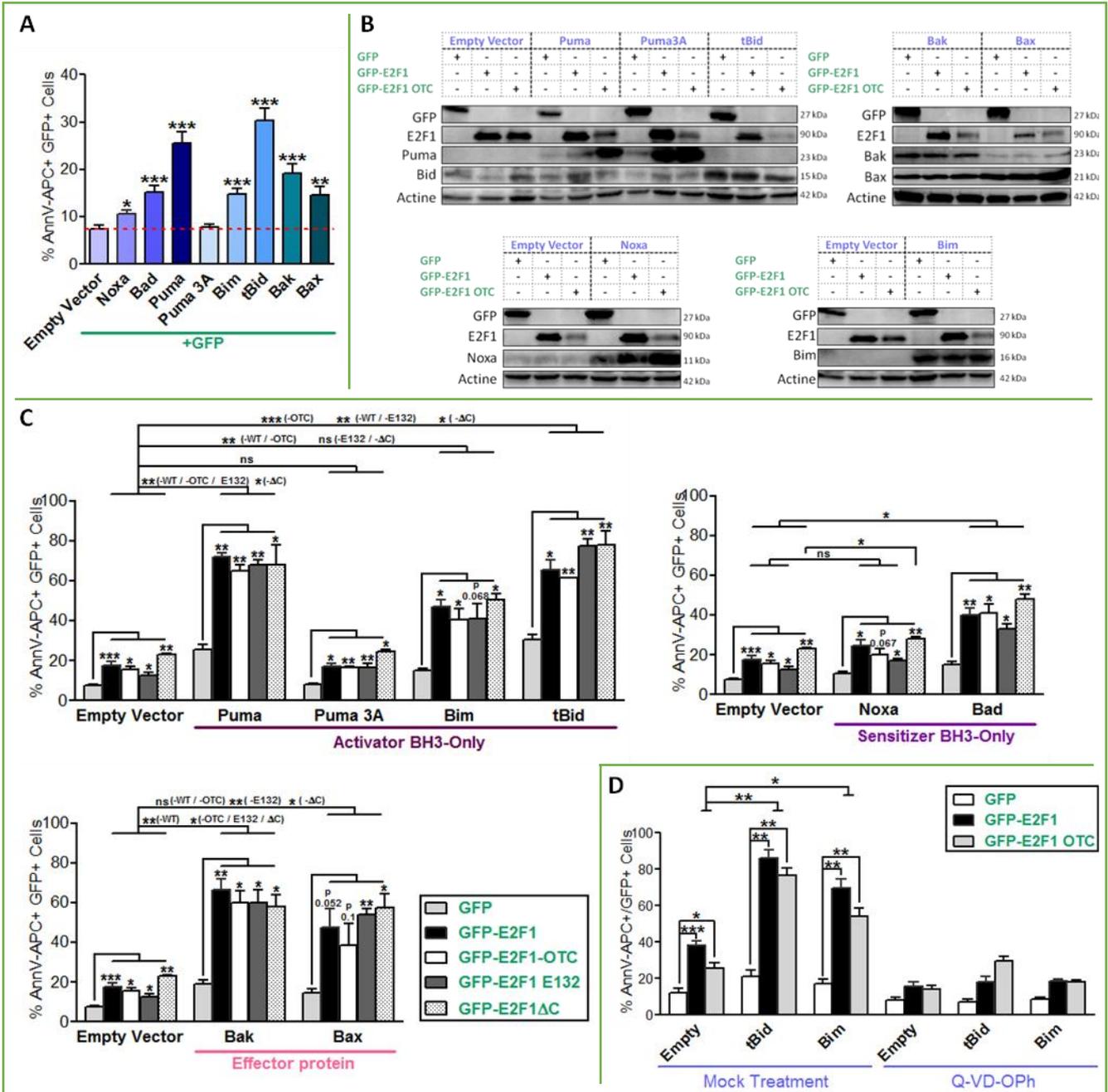


Figure 55 | E2F1 mitochondrial promeut l'action des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2

(A). Analyse de la mort cellulaire par marquage Annexin-V-APC en cytométrie en flux, 24h après co-transfection de la lignée Saos-2 avec les plasmides GFP (contrôle) et ceux codant les protéines de la famille Bcl-2 (non taguées) avec un ratio 1:3. Les moyennes +/- SEM d'au moins trois expériences indépendantes sont représentées. (B). Analyse Western Blot de la lignée Saos-2, 24h après co-transfection des plasmides indiqués, traitée au Q-VD-OPh (5µM, 24h). (C, D). Analyse similaire de la mort cellulaire des Saos-2: 24h après co-transfection avec les plasmides GFP (contrôle), GFP-E2F1, GFP-E2F1-OTC ou ses mutants transcriptionnels et ceux codant les protéines de la famille Bcl-2 ou un vecteur contrôle (Empty vector) (C) ou en présence ou non de l'inhibiteur de caspase Caspase Q-VD-OPh (5µM, 24h) (D). Les moyennes +/- SEM d'au moins trois expériences indépendantes sont représentées.

Ayant émis l'hypothèse qu'E2F1 et sa forme ciblée aux mitochondries augmentent le priming mitochondrial, nous avons reconduit l'expérience avec cette fois une co-expression des protéines BH3-Only ou effectrices avec les protéines GFP-E2F1 ou GFP-E2F1-OTC afin de déterminer si celles-ci sensibilisent les cellules à la mort induite par les pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Les contrôles Vecteur vide (Empty vecteur) non tagué et GFP constituent les conditions références. La co-expression des différentes protéines ensemble a été vérifiée sur les Western Blot présenté **Figure 55B**. La mesure de mort cellulaire s'effectue à 24h, temps auquel une réponse apoptotique de faible intensité est observée, qu'elle soit induite par les BH3-Only, les effecteurs Bax et Bak ou E2F1 et sa forme mitochondriale. Cela permet d'analyser un potentiel effet synergique entre E2F1 et les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ainsi c'est une analyse comparative de la mort induite par la coexpression de ces deux classes de protéines avec celle induite par les protéines seules qui est présentée sur la **Figure 55C**. Dans la condition Vecteur vide, GFP-E2F1 et GFP-E2F1-OTC induisent l'apoptose de 18 et 16% respectivement de la population cellulaire à 24h de surexpression comparé à la GFP (8%). Dans la condition GFP, les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 induisent la mort cellulaire comme présenté **Figure 55A** comparé au Vecteur vide. Une augmentation significative de la mort cellulaire est observée dans le cas de la surexpression de GFP-E2F1 ou GFP-E2F1-OTC avec Puma, Bim, tBid, Bad et Bak comparativement à d'une part GFP-E2F1 ou GFP-E2F1-OTC + Vecteur Vide et d'autre part aux protéines Bcl-2 pro-apoptotiques + GFP. En effet E2F1 seul induit 18% de mort et Puma 26%, leur expression conjointe provoque 72% de mort. De même Bim seul induit 15% de mort alors qu'en présence d'E2F1 les taux atteignent 48%. tBid provoque 30% d'apoptose, E2F1 seul 18% et ensemble la mort est de 65%. Dans le cas de Bad, 15% de mort sont obtenus par sa seule expression, tandis que 40% sont détectés avec E2F1. Concernant Bak, sa surexpression provoque 19% de mort et son association avec E2F1 conduit à 66% d'apoptose. Des niveaux de mort comparables sont observés avec la surexpression de GFP-E2F1-OTC (16% de mort seul) : 65% avec Puma, 40% avec Bim, 61% avec tBid, 41% avec Bad, et 60% avec Bak. Ainsi les présents résultats indiquent qu'E2F1, qu'il soit localisé spécifiquement aux mitochondries ou non, favorise l'action des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 qu'il s'agisse de BH3-Only sensibilisateurs comme Bad, d'activateurs comme tBid, Puma et Bim ou des effecteurs Bak et Bax. En revanche, un tel effet synergique n'est pas obtenu avec Noxa.

E2F1 sensibilise les mitochondries à l'action des protéines Bcl-2 pro-apoptotiques. Cela peut être du à la fois à une action transcriptionnelle : augmentation d'autres protéines BH3-Only coopérant avec celle surexprimée et à une action non transcriptionnelle ce que suggère l'effet

obtenu avec E2F1 mitochondrial. Afin de mettre en avant l'absence d'implication de la voie transcriptionnelle, les mêmes tests ont été réalisés en présence de GFP-E2F1 Δ C et GFP-E2F1 E132 tout deux déficients pour la transcription. Seuls, ces derniers provoquent 13 et 23% de mort après 24h, respectivement. Une augmentation significative de la mort induite par les deux mutants lors de leur co-expression avec Puma (68% de mort), tBid (77%), Bad (33 et 48%, respectivement), Bak (60% et 58%) et Bax (54% et 57%) est observée. De nouveau cet effet n'est pas visible ni avec la forme inactive de Puma : Puma3A ni avec Noxa. Nous remarquerons que dans ce cas l'effet différentiel entre Bak et Bax n'est plus observé. Ces données confirment qu'en absence de sa capacité à induire l'expression de gènes cibles, E2F1 conserve son effet coopératif avec les protéines BH3-Only et effectrices pour déclencher d'une manière efficiente la mort des cellules tumorales.

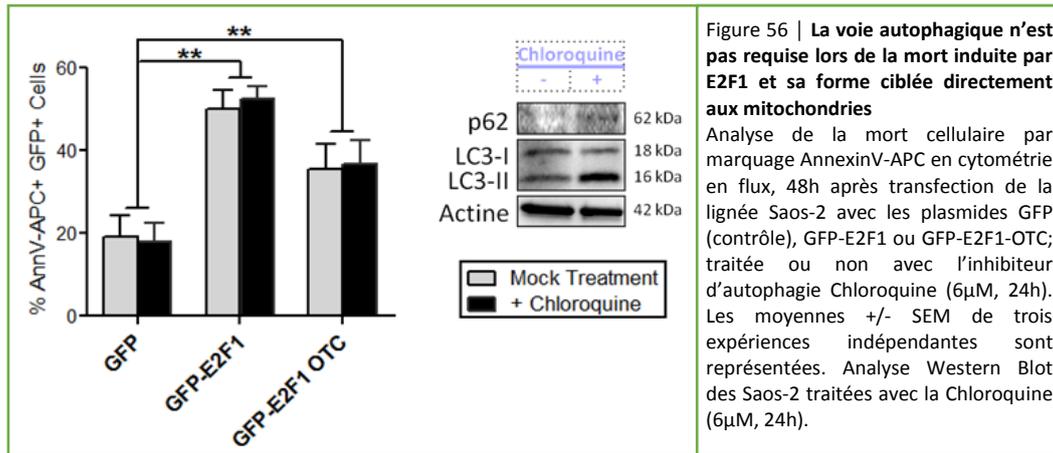
4. Rôle indispensable des caspases dans l'apoptose promue par E2F1 aux mitochondries et les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2

En présence d'E2F1 qu'il soit actif sur le plan transcriptionnel ou non, ciblé aux mitochondries ou non, les BH3-Only comme les effecteurs Bax et Bak sont plus aptes à promouvoir la mort des cellules. Dans ces conditions l'induction massive de la MOMP dans un laps de temps réduit doit être responsable de la libération de nombreuses protéines de l'espace intermembranaire participant notamment à l'activité des caspases. Afin d'évaluer la contribution de la cascade des caspases dans les effets apoptotiques synergiques obtenus précédemment nous avons eu recours à l'emploi de Q-VD-OPh pour inhiber leurs actions (**Figure 55D**). Les protéines GFP-E2F1 et sa forme mitochondriale induisent environ 40% de mort. La co-expression de tBid avec GFP-E2F1 et GFP-E2F1-OTC conduit à 86 et 76% de mort respectivement. De manière similaire les effets, bien que plus faibles, sont retrouvés avec Bim (70 et 54% de mort). En absence d'activité caspase, la mort cellulaire est considérablement diminuée. Ainsi l'activité des caspases est essentielle dans la réponse apoptotique orchestrée conjointement par E2F1 ou sa forme ciblée aux mitochondries avec les BH3-Only pro-apoptotiques.

VII. Recherche du mécanisme moléculaire mis en œuvre par E2F1 aux mitochondries pour promouvoir l'apoptose.

1. Implication de la voie autophagique dans la mort induite par E2F1 mitochondrial ?

Une connexion et une action coopérative existe entre les voies d'induction de l'autophagie et de l'apoptose (Mariño et al., 2014). La voie pRB/E2F1 est capable d'intervenir dans la régulation de l'autophagie notamment via le contrôle de la transcription de gènes cibles associés à l'autophagie tels que LC3, ATG1/5 ou DRAM (Polager et al., 2008). D'autre part, une induction de l'autophagie a été observée suite à l'expression d'un mutant d'E2F1 délété de son domaine de transactivation en C-terminal (Garcia-Garcia et al., 2012). Ces travaux suggéraient un rôle de la voie autophagique ainsi induite dans la réponse apoptotique à ce mutant d'E2F1. Au vu de ces données nous avons examiné le rôle de l'autophagie dans la mort régulée par E2F1 ou sa forme mitochondriale déficiente pour la transcription. Afin d'explorer cette hypothèse un traitement chloroquine a été utilisé pour bloquer la mise en place d'un éventuel flux autophagique induit par E2F1. La chloroquine est une molécule non chargée qui diffuse à travers la membrane plasmique et devient protonée une fois localisée dans les lysosomes où elle augmente alors le pH. Par cette action, elle bloque l'activité de dégradation du cargot par les enzymes lysosomales qui s'y trouvent, dont les fonctions enzymatiques requièrent un pH acide (Pasquier, 2016). Dans un premier temps, un contrôle de l'efficacité du traitement aux doses utilisées a été réalisé (**Figure 56, panel droit**). Pour cela les cellules Saos-2 ont été soumises pendant 48h à un traitement par l'agent Chloroquine. Le Western Blot indique une augmentation du niveau des protéines relatives à l'autophagie : p62 et LC3-II. Cela dénote la présence d'un blocage du flux autophagique avant qu'il n'y ait dégradation lysosomale ce qui cause l'accumulation de ces deux protéines. La mort cellulaire a été analysée 48h après transfection des Saos-2 avec les plasmides codant GFP-E2F1, sa forme mitochondriale ou le contrôle GFP ; traitées ou non par la Chloroquine (**Figure 56, panel gauche**). L'inhibition du flux autophagique par la drogue n'affecte en rien la mort induite par E2F1 ou E2F1-OTC. Ces résultats indiquent qu'E2F1 ne fait pas intervenir de boucle autophagique pour promouvoir l'apoptose des cellules dans notre modèle d'étude.



2. Implication de la dynamique mitochondriale dans la mort induite par E2F1 mitochondrial ?

Le réseau mitochondrial est au cœur de l'apoptose intrinsèque. Outre le contrôle du déclenchement de la MOMP par les complexes entre les membres pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, l'état du réseau mitochondrial peut constituer un élément régulateur de l'apoptose (Jourdain et Martinou, 2009). Au sein des cellules saines un équilibre existe entre les phénomènes de fission et fusion mitochondriale contribuant à la dynamique du réseau mitochondrial. Le réseau se présente majoritairement sous une forme filamenteuse interconnectée mais sa fragmentation est visible au cours du processus apoptotique. De nombreuses controverses ont eu lieu quant à savoir s'il s'agissait d'une conséquence de la voie de signalisation apoptotique ou bien d'un mécanisme acteur de cette réponse. Un nombre grandissant d'évidences indique que les protéines Bcl-2 interfèrent avec la dynamique mitochondriale avec notamment une action inhibitrice des anti-apoptotiques sur le phénomène de fission mitochondriale *a contrario* des protéines pro-apoptotiques qui semblent la favoriser (Brooks et Dong, 2007). Or un réseau peu fragmenté est moins propice à la libération des protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial telles que le cytochrome C. Par ailleurs, l'oligomérisation de Bax et Bak semble favorisée avec un réseau mitochondrial fragmenté du fait de propriétés architecturales altérées (Autret et Martin, 2009).

Il a été mis en évidence une action d'E2F1 sur la dynamique mitochondriale conduisant à une fragmentation accrue du réseau. Des mécanismes distincts ont été décrits faisant intervenir ou non ses fonctions transcriptionnelles (Ambrus et al., 2013; Wang et al., 2015). Par ailleurs Bak, contrairement à Bax régule également la fission/fusion des mitochondries en interagissant directement avec des acteurs de la machinerie de fusion (Mfn1 et Mfn2). Lors d'un stress cellulaire il y a rupture du complexe Bak-Mfn2 provoquant la fragmentation du réseau (Brooks et al., 2007).

Etant donné le rôle prépondérant de Bak, non redondant avec celui de Bax dans l'apoptose induite par E2F1 aux mitochondries, nous avons émis l'hypothèse d'un lien entre la dynamique mitochondriale et la voie d'apoptose orchestrée par E2F1 à ce compartiment de façon indépendante de ses fonctions transcriptionnelles.

C'est pourquoi une analyse de la mort cellulaire induite par E2F1 et sa forme mitochondriale a été réalisée en présence ou non de la molécule mDIVI-1. Cet inhibiteur pharmacologique de la protéine Drp1 bloque le processus de fission des mitochondries. Un déséquilibre dans la dynamique mitochondriale est alors instauré et le réseau se retrouve davantage fusionné. Ce phénomène est visible sur la lignée Saos-2 24h après traitement puis marquage du réseau mitochondrial avec le Mitotracker rouge comme le montrent les images de microscopie **Figure 57A**. En revanche, la mort cellulaire mesurée 48h après surexpression de GFP-E2F1 ou GFP-E2F1-OTC n'est aucunement affectée par le traitement mDIVI-1 (**Figure 57B**). Il apparaît donc que dans notre modèle cellulaire la fission du réseau mitochondrial n'est pas un élément déterminant pour le déclenchement de la voie de signalisation apoptotique.

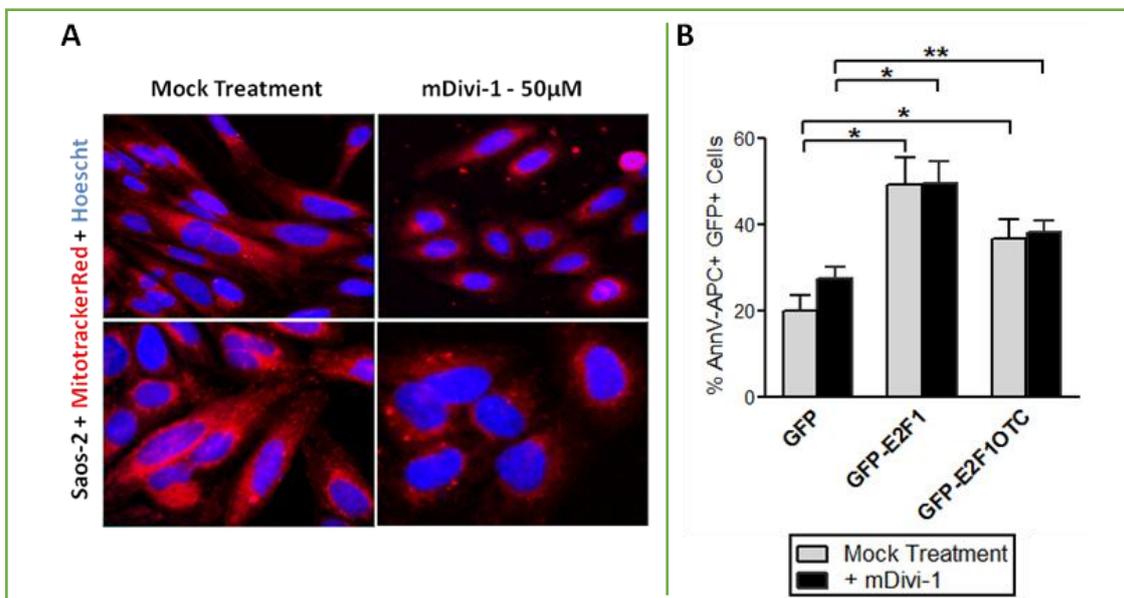


Figure 57 | **Le blocage de la fragmentation mitochondriale n'affecte pas l'apoptose induite par E2F1 et sa forme ciblée aux mitochondries**

(A). Analyse du réseau mitochondrial de la lignée Saos-2 traitée ou non par l'inhibiteur de fragmentation mitochondriale mDIVI-1 (50µM, 24h) via un marquage MitotrackerRed (100nM, 20min). Marquage du noyau par l'agent intercalant Hoescht (1µg/ml, 20min). Analyse microscopique sur cellules fixées au HCS. (B). Analyse de la mort cellulaire par marquage AnnexinV-APC en cytométrie en flux, 48h après transfection de la lignée Saos-2 avec les plasmides GFP (contrôle), GFP-E2F1 ou GFP-E2F1-OTC; traitée ou non avec le mDIVI-1 (50µM, 48h). Les moyennes +/- SEM de trois expériences indépendantes sont représentées.

Bien que le réseau mitochondrial soit hautement fusionné en présence de l'inhibiteur pharmacologique mDIVI-1, la faculté d'E2F1 à promouvoir la mort des cellules en agissant

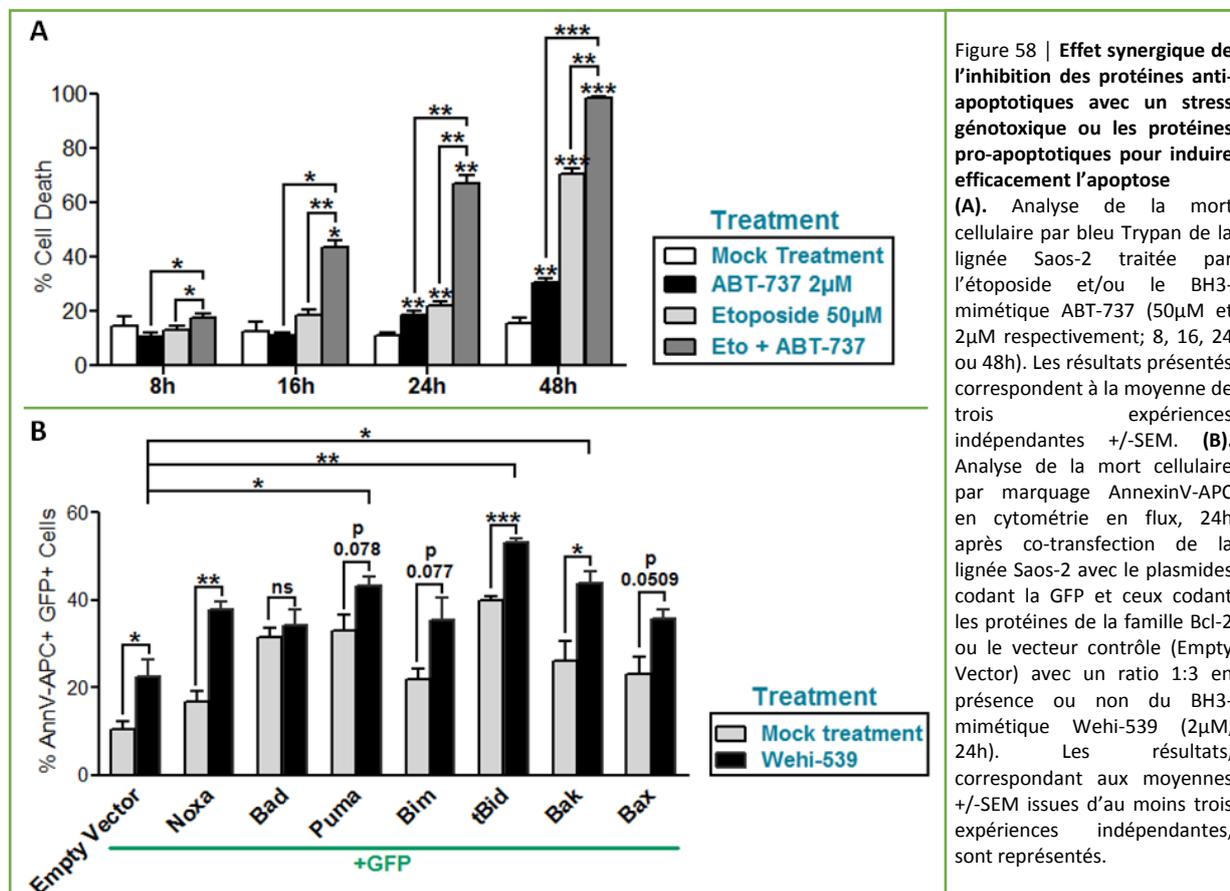
directement au niveau de ce réseau n'a pas été perturbée. Ainsi le processus de fragmentation mitochondriale qui survient lors de réponses apoptotiques à divers stimuli n'est pas indispensable pour que la mort n'ait lieu. Il semble donc peu probable que l'action pro-apoptotique d'E2F1 aux mitochondries se résume à une régulation de la dynamique mitochondriale.

3. L'inhibition des protéines anti-apoptotiques favorise les réponses apoptotiques induites par un stress génotoxique ou par expression directe des protéines BH3-Only et effectrices Bak et Bax

Ni la voie autophagique, ni la dynamique mitochondriale ne représente le mécanisme d'action par lequel E2F1 induit directement l'apoptose aux mitochondries. Nos travaux indiquent qu'E2F1 induit l'apoptose via le déclenchement d'une MOMP et l'activation des caspases. Les protéines de la famille Bcl-2 régulent la survenue de la MOMP. C'est le déséquilibre dans les signaux pro-survie et pro-apoptotique qui provoque l'activation des effecteurs et la MOMP. Il peut être causé par une élévation du niveau de protéines BH3-Only, par exemple suite à l'induction transcriptionnelle par E2F1. Une inhibition efficace des protéines anti-apoptotiques favorise l'action des BH3-Only. Dans notre étude, même en étant ciblé aux mitochondries, E2F1 favorise l'apoptose induite par un stress génotoxique ou expression directe des BH3-Only. Nous avons donc émis l'hypothèse d'une action inhibitrice d'E2F1 sur les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Afin d'évaluer ce potentiel mécanisme d'action, nous avons préalablement analysé l'effet d'une inhibition pharmacologique des protéines anti-apoptotiques sur l'apoptose induite par le traitement étoposide ou par la surexpression des protéines BH3-Only.

La lignée cellulaire Saos-2 a été traitée en cinétique (8h, 16h, 24h, 48h) avec l'étoposide associé ou non au BH3-mimétique ABT-737. Cette molécule permet l'inhibition simultanée de Bcl-2 et Bcl-xL du fait de son interaction spécifique avec leur sillon hydrophobe abrogeant leur capacité à lier les domaines BH3 de leurs contreparties pro-apoptotiques (Oltersdorf et al., 2005). La mort cellulaire a été mesurée comme indiquée sur la **Figure 58A**. Pour les traitements seuls au temps les plus précoces, relativement peu de mort cellulaire est détectée, excédant difficilement 20% à 24h. En revanche sur cette même cinétique, le co-traitement induit une mort significativement plus élevée que chaque traitement seul. L'effet est notable à partir de 16h où l'ABT-737 induit seul 11% de mort, l'étoposide : 18% mais leur co-traitement entraîne la mort de 43% de la population cellulaire. De même à 24h : l'ABT-737 est responsable de 19% de mort, l'étoposide 22% et ensemble les niveaux atteignent 67%. Au temps le plus long de traitement, c'est-à-dire à 48h, l'ABT-737 génère davantage de mort cellulaire à hauteur de 30%, l'étoposide 70% et le co-traitement

induit presque 100% de mort cellulaire. Ces résultats indiquent, de façon plus flagrante au temps précoce, l'existence d'un effet synergique entre l'inhibition des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL par l'ABT-737 et l'action du stress génotoxique.



L'effet de l'inhibition des anti-apoptotiques sur la mort induite par les protéines BH3-Only lors de leur surexpression dans la lignée Saos-2 a été étudié **Figure 58B**. L'utilisation du BH3-mimétique Wehi-539 dans ce test permet une inhibition spécifique de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. L'apoptose a été mesurée par marquage AnnexinV-APC dans les cellules tumorales 24h après leur co-transfection par les plasmides codant la GFP et les protéines BH3-Only, effectrices Bak ou Bax ; ou la condition contrôle (Empty Vector). Cela permet de se placer dans des conditions identiques aux expériences indiquant un effet coopératif d'E2F1, dont sa forme mitochondriale, avec les protéines BH3-Only ou effectrices. Le Wehi-539 en agent simple induit un faible niveau d'apoptose dans les cellules à 24h, dépassant à peine 20%. La surexpression seule de chacune des protéines pro-apoptotiques étudiées ici génère des taux de mort légèrement plus élevés que ceux observés dans les tests précédents (**Figure 55**). Néanmoins le Wehi-539 augmente significativement la mort induite par Noxa, tBid et Bak. Une tendance similaire est observée avec Puma, Bim et Bax.

Par ailleurs la présence de Puma, tBid et Bak amplifie significativement l'effet du traitement. Ainsi l'inhibition de Bcl-xL concomitante avec un excès de protéines BH3-Only ou effectrices permet une meilleure réponse apoptotique. L'effet est plus net avec Puma, tBid et Bak, comme observé avec les effets synergiques avec E2F1 également plus accentués pour ces trois protéines. Cependant, contrairement à l'action d'E2F1, le Wehi-539 augmente de façon importante la mort induite par Noxa. Etant donné que Noxa est un BH3-Only sensibilisateur dont la seule action est d'inhiber spécifiquement Mcl-1, l'inhibition supplémentaire de Bcl-xL augmente son effet pro-apoptotique. Sur le même raisonnement, le Wehi-539 cible le même anti-apoptotique que la protéine BH3-Only sensibilisatrice Bad (qui inhibe spécifiquement Bcl-xL) ; cela explique l'absence d'amplification de la mort cellulaire étant donné que tout deux exercent la même action aux mitochondries.

Comme attendu, l'ensemble de ces résultats indique que l'inhibition des protéines anti-apoptotiques constitue un mécanisme favorisant la mort induite par un traitement génotoxique comme par les protéines BH3-Only ou effectrices. Cela phénocopie en partie l'effet observé avec E2F1 mitochondrial mais des différences sont visibles notamment avec le Wehi-539. Cela suggère que son effet ne se limite pas à la seule inhibition de Bcl-xL mais est probablement plus complexe. L'inhibition des autres protéines anti-apoptotiques peut être également requise.

4. E2F1 interagit avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Les données présentées ci-dessus indiquent que l'inhibition des protéines anti-apoptotiques, dans la lignée Saos-2, est un mécanisme contribuant fortement à accentuer les réponses apoptotiques induites par un stress cellulaire ou directement par la surexpression de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Or nous avons mis en évidence une action d'E2F1 directement aux mitochondries où la protéine augmente considérablement ces mêmes réponses apoptotiques. Recherchant le mécanisme moléculaire par lequel E2F1 exerce son rôle apoptotique aux mitochondries, nous émettons l'hypothèse d'une action directe d'E2F1 au niveau du réseau de protéines de la famille Bcl-2. Il pourrait s'agir plus spécifiquement d'une action inhibitrice au niveau du sous-groupe des membres anti-apoptotiques, par le biais d'interaction avec ces protéines comme observé dans le cas du facteur de transcription p53.

Nous avons mis à profit la technique de BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) afin d'évaluer l'existence d'éventuelles interactions entre E2F1 et les protéines anti-apoptotiques en cellules entières. Cette technique implique la co-expression des deux partenaires de l'interaction

à étudier, fusionnés soit à un donneur d'énergie : la Renilla Luciférase (RLuc) ou à un accepteur d'énergie : la eYFP. Ainsi la lignée HeLa a été transfectée avec une quantité fixe de plasmides codant RLucE2F1 avec des quantités croissantes de plasmides codant YFPBcl-xL, YFPMcl-1 ou YFPBcl-2 (**Figure 59A**). Une courbe de saturation est obtenue entre les couples RLucE2F1 – YFPBcl-xL et RLucE2F1 – YFPMcl-1, synonyme d'une interaction spécifique ce qui n'est pas observé avec le couple de protéines RLucE2F1 – YFPBcl-2 où le signal BRET est linéaire et de faible intensité ; signe d'une interaction aspécifique. Lorsque l'interaction est spécifique, malgré une augmentation croissante de l'un des partenaires, les sites d'interactions finissent par être tous occupés ne permettant donc pas de générer davantage de complexes, le signal atteint donc un plateau. *A contrario*, lorsque l'interaction est aspécifique, les rencontres aléatoires se font plus fréquentes avec l'augmentation croissante de l'un des partenaires et le signal BRET ne cessera de croître. Ces premières données semblent indiquer qu'E2F1 est capable d'interagir avec les membres anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 mais pas avec Bcl-2.

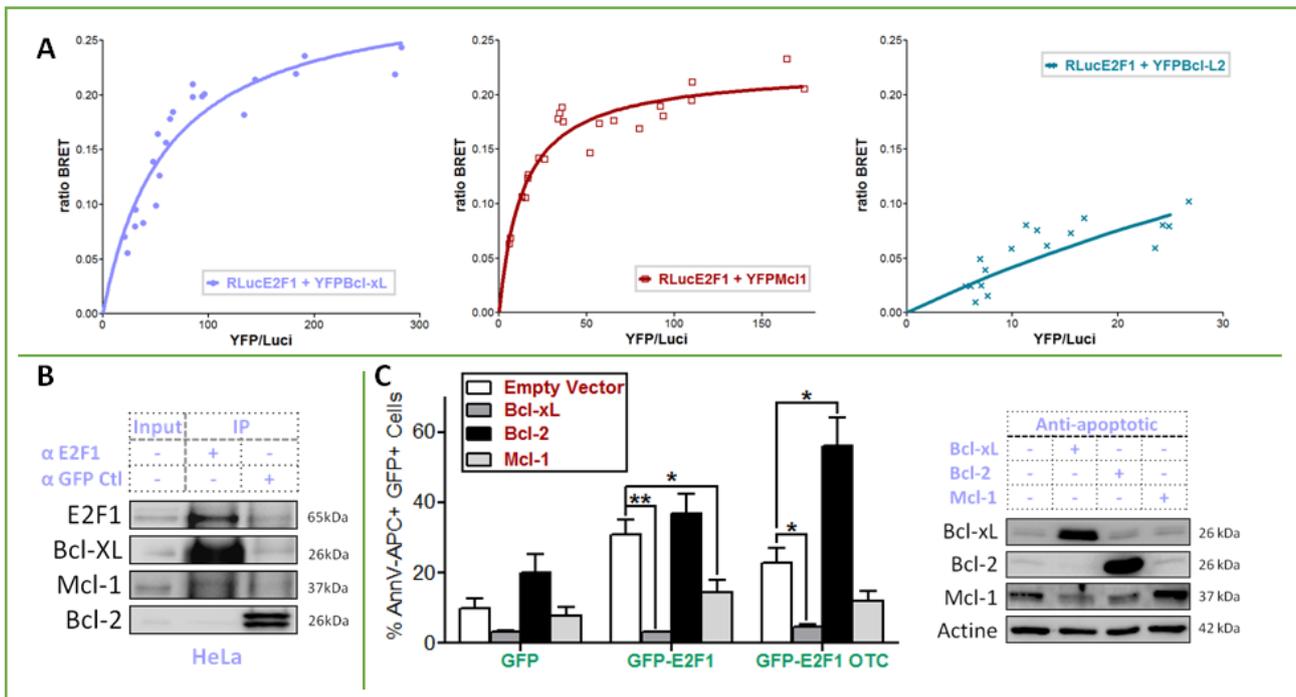


Figure 59 | E2F1 interagit avec certaines protéines anti-apoptotiques qui contrecarrent ses fonctions pro-apoptotiques

(A). Mesure BRET des interactions protéiques dans la lignée HeLa co-transfectée avec 50ng de plasmide codant RLucE2F1 et des quantités croissantes de plasmides eYFPBcl-xL, Mcl-1 ou Bcl-2. Les données présentées sont représentatives d'au moins trois expériences indépendantes. (B). Analyse Western Blot des lysats protéiques de cellules HeLa immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre E2F1 (αE2F1) ou la GFP (contrôle négatif). (C). Analyse de la mort cellulaire par marquage Annexin-V-APC en cytométrie en flux, 48h après co-transfection de la lignée Saos-2 avec les plasmides codant GFP (contrôle), GFP-E2F1 ou GFP-E2F1-OTC et ceux codant les protéines anti-apoptotiques ou le vecteur contrôle (Empty Vector) avec un ratio 1:3. Les moyennes +/-SEM issues d'au moins trois expériences indépendantes sont représentées. Analyse Western Blot des lysats protéiques de cellules Saos-2 24h après la surexpression de chacun des anti-apoptotiques indiqués.

Afin de conforter ces données, une seconde approche d'étude des interactions sur protéines endogènes a été réalisée. Les lysats protéiques provenant des cellules HeLa ont été soumis à une

immunoprécipitation par un anticorps dirigé contre E2F1 ; la condition contrôle est un anticorps de même isotype dirigé contre la GFP, absente des cellules. Le Western Blot présenté **Figure 59B** indique la présence de protéines Bcl-xL et Mcl-1 co-immunoprécipités avec E2F1, ce qui n'est pas le cas de Bcl-2. Ainsi par deux approches différentes nous détectons une interaction entre E2F1 et les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1.

Nous avons alors souhaité déterminer quelle était la capacité de ces protéines anti-apoptotiques à inhiber la mort induite par E2F1 et sa forme directement ciblée aux mitochondries. Une analyse de l'apoptose des Saos-2 a été effectuée 48h après la surexpression de GFP-E2F1, GFP-E2F1-OTC ou le contrôle GFP avec les anti-apoptotiques ou le contrôle (Empty Vector). Le marquage AnnexinV-APC a été évalué au sein des cellules GFP+. Tout comme pour les protéines BH3-Only et effectrices dans les tests précédents, les protéines anti-apoptotiques sont exprimées en excès avec un ratio 3 : 1 en ADN plasmidique, du fait de l'absence de tag. Chaque protéine anti-apoptotique est bien retrouvée surexprimée sur le Western Blot (**Figure 59C, panel droit**). Les résultats du test de mort cellulaire présentés **Figure 59C, panel gauche**, mettent en évidence une inhibition de l'apoptose induite par E2F1 ou E2F1 mitochondrial par Bcl-xL et dans une plus faible mesure par Mcl-1. En revanche, non seulement Bcl-2 ne protège pas de la mort induite par E2F1 mais de manière surprenante sa présence accentue celle induite par E2F1-OTC.

L'ensemble de nos résultats met en évidence pour la première fois une interaction entre le facteur de transcription E2F1 et les membres anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1. Ces derniers antagonisent avec ses fonctions pro-apoptotiques aux mitochondries.

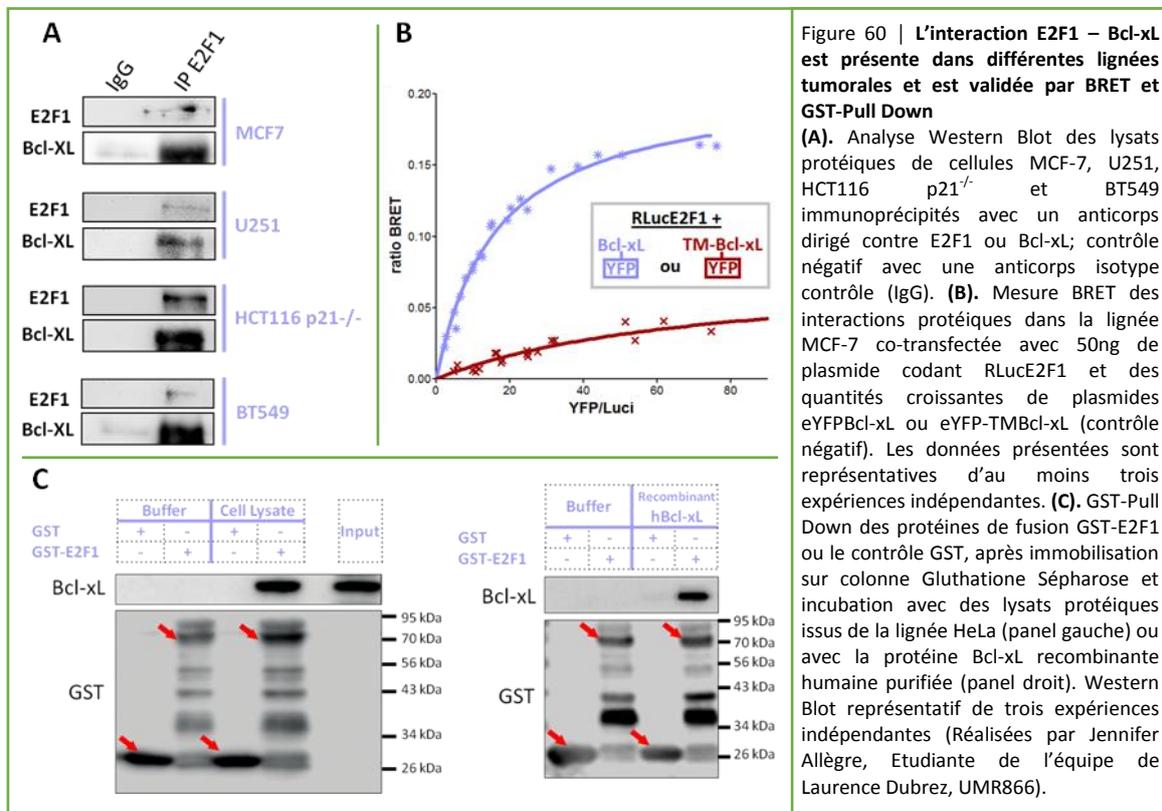
VIII. Caractérisation de l'interaction E2F1 – Bcl-xL

1. L'interaction E2F1 – Bcl-xL est retrouvée dans différentes lignées tumorales

Au vu de nos précédents résultats nous avons choisi en première intention de caractériser l'interaction E2F1 - Bcl-xL car l'interaction était mieux détectée entre les protéines endogènes et l'action pro-apoptotique d'E2F1 était quasiment annihilée avec Bcl-xL.

L'étude de l'interaction entre E2F1 et Bcl-xL a été étendue à d'autres modèles tumoraux afin de déterminer si ce phénomène dépendait de fonds cellulaires bien précis. Ainsi les lysats protéiques des lignées de cancer du sein MCF-7 ou BT549, de glioblastome U251 et de cancer colorectal HCT116 p21^{-/-} ont été immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre E2F1 ; un

anticorps de même isotype sert ici de contrôle. Comme le montre le Western Blot présenté sur la **Figure 60A**, une co-immunoprécipitation de Bcl-xL est retrouvée dans chacune des lignées analysées, indiquant que l'interaction avec E2F1 n'est pas un événement restreint à un fond cellulaire donné. Par ailleurs, les lignées utilisées pour cette expérience présentent des statuts variables des protéines p53 et pRb. En effet, les lignées MCF-7 et HCT116 p21^{-/-} présentent toutes deux un statut sauvage pour les gènes TP53 et RB1. A l'inverse les lignées U251 et BT549 ont un allèle TP53 muté (R273H et R249S, respectivement). De plus la lignée BT549 est déficiente pour pRB. La présence ou la fonctionnalité des protéines p53 et pRB n'est donc pas indispensable à l'interaction entre les protéines E2F1 et Bcl-xL.



La spécificité de l'interaction E2F1 – Bcl-xL a été vérifiée par BRET, dans le but d'utiliser cette approche pour la suite de notre étude de caractérisation de leur interaction. Pour cela, la lignée MCF-7 a été co-transfectée avec RLucE2F1 en quantités fixes et YFPBcl-xL ou YFP-TMBcl-xL en quantités croissantes (**Figure 60B**). La construction YFP-TMBcl-xL correspond à la fusion du domaine transmembranaire de Bcl-xL avec la YFP ce qui lui confère un ciblage mitochondrial identique à celui de Bcl-xL. Cela nous sert ici de contrôle négatif afin de déterminer si E2F1 s'y associe de façon spécifique ou non. La mesure du signal BRET conduit à l'obtention d'une courbe de saturation pour le couple RLucE2F1 – YFPBcl-xL, reproduisant les résultats précédemment obtenus dans la lignée

HeLa (**Figure 59A**). A l'inverse un signal BRET linéaire et de faible intensité est obtenu entre RLucE2F1 et YFPTM-Bcl-xL. Au regard de nos résultats nous pouvons donc en conclure que l'interaction entre E2F1 et Bcl-xL n'est pas due à des rencontres aléatoires aux mitochondries. Il s'agit d'une interaction spécifique entre les deux partenaires étudiés, nous permettant donc l'utilisation de l'approche BRET afin d'étudier plus amplement la façon dont ses deux protéines interagissent ensemble.

Une approche complémentaire de GST-PullDown a été réalisée par Jennifer Allègre, étudiante de l'équipe de Laurence Dubrez. Des lysats cellulaires de HeLa ont été incubés avec les protéines GST-E2F1 ou le contrôle GST, protéines de fusion préalablement immobilisées sur colonne Glutathione Sépharose. Les complexes formés dans la colonne ont été élués et les interactions analysées sur le Western Blot présenté **Figure 60C, panel gauche**. Aucune protéine Bcl-xL n'a été retenue dans la condition contrôle GST. Une interaction est détectée entre Bcl-xL et GST-E2F1. Par ailleurs, l'expérience a été reconduite en incubant directement ensemble les deux partenaires recombinants produits à partir de bactéries (**Figure 60C, panel droit**). Bcl-xL est retrouvé associé à GST-E2F1 mais pas avec le contrôle GST. Ces résultats confortent nos données d'immunoprécipitation et de BRET indiquant que les deux protéines E2F1 et Bcl-xL interagissent ensemble. De plus, cette dernière expérience indique que l'interaction est directe et ne requiert pas une tierce protéine pour avoir lieu.

2. Bcl-xL favorise le recrutement d'E2F1 aux mitochondries

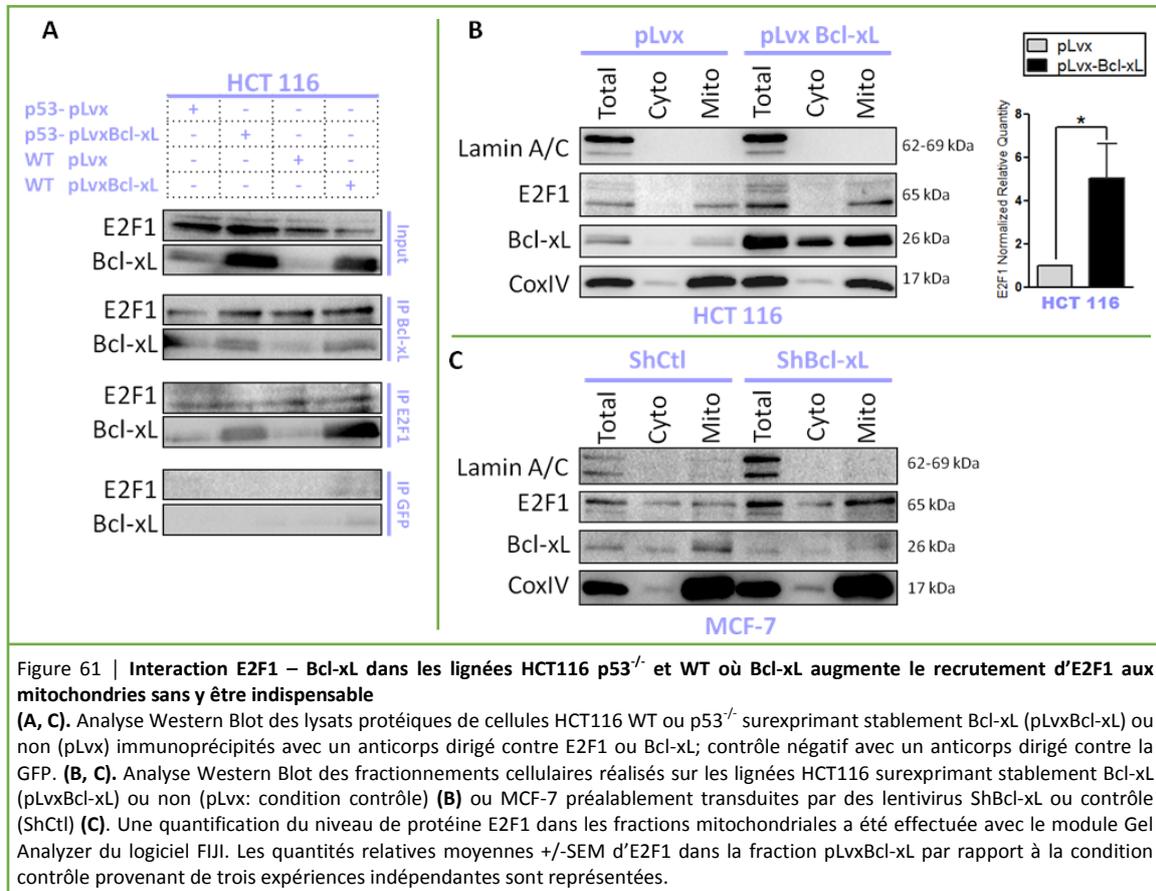
L'identification d'E2F1 aux mitochondries avait soulevé de nombreuses interrogations ; l'une d'elle étant le signal permettant son ciblage à ce compartiment. La protéine ne possède pas de domaine transmembranaire, il est donc probable que son ciblage dépende de protéines partenaires. En ce sens, Bcl-xL constitue un bon candidat. C'est pourquoi nous avons souhaité déterminer si cette protéine anti-apoptotique contribue à la localisation d'E2F1 aux mitochondries.

Dans un premier temps nous avons analysé la localisation sub-cellulaire d'E2F1 dans des modèles cellulaires HCT116 surexprimant stablement ou non Bcl-xL (HCT116 WT pLvX et HCT116 WT pLvXBcl-xL). L'interaction E2F1 – Bcl-xL dans ces lignées parentales et leurs versions isogéniques déficientes pour p53 a été au préalable contrôlée par immunoprécipitation des lysats protéiques avec un anticorps dirigé contre E2F1, Bcl-xL ou la GFP (anticorps isotype contrôle). Le Western Blot **Figure 61A** indique une co-immunoprécipitation d'E2F1 dans les IP Bcl-xL et vice versa dans les IP

inverses ; et ce quel que soit le statut p53 des lignées. L'interaction E2F1 – Bcl-xL est donc également détectée dans ces modèles cellulaires. Etant donné que p53 n'est pas essentiel à la localisation mitochondriale d'E2F1 (**Figure 49B, 54A**) ni à sa faculté de lier Bcl-xL (comme indiqué ci-dessus), l'expérience qui suit sera réalisée uniquement sur la lignée HCT116 parentale. Un fractionnement cellulaire a été effectué sur les lignées HCT116 WT pLv et pLvxBcl-xL (**Figure 61B**). La pureté des fractions mitochondriales est vérifiée par l'absence de marqueur nucléaire : les Lamin A/C et la présence de protéines mitochondriales CoxIV. La surexpression de Bcl-xL est visible dans les extraits totaux entre les lignées pLvxBcl-xL et pLv (Ligne 4 vs 1). La protéine anti-apoptotique est connue pour présenter une localisation mitochondriale majoritaire, néanmoins elle est également dans une moindre mesure localisée au cytoplasme (Todt et al., 2013). Cela est très nettement visible lorsque la protéine est en excès dans les cellules ; tout en conservant une fraction majoritaire aux mitochondries et une plus faible au cytoplasme (Ligne 5 et 6). E2F1 est détecté au niveau des mitochondries dans les HCT116 WT pLv mais sa localisation à ce compartiment semble augmenter dans la lignée HCT116 WT pLvxBcl-xL (d'autant plus qu'il y a une baisse de CoxIV entre les fractions mitochondriales des HCT116 pLvxBcl-xL comparées à celles des pLv). L'expérience a été réalisée à trois reprises de façon indépendante. Une quantification du niveau d'E2F1 dans les fractions mitochondriales des lignées surexprimant Bcl-xL normalisée par la condition contrôle a été effectuée et les résultats sont présentés sur l'histogramme. Il y a environ cinq fois plus de protéines E2F1 aux mitochondries lorsque Bcl-xL est en excès dans les cellules suggérant qu'il favorise son recrutement à ce compartiment.

Dans un second temps, nous avons souhaité déterminer si Bcl-xL était nécessairement requis pour le ciblage mitochondrial d'E2F1. Une extinction de l'expression de Bcl-xL a été réalisée par infection lentivirale de la lignée MCF-7 avec un ShRNA dirigé contre l'ARNm d'intérêt (ShBcl-xL) ou un ShRNA contrôle (ShCtl). Les différentes fractions obtenues suite aux fractionnements des MCF-7 shScr ou MCF-7 ShBcl-xL ont été déposées sur le Western Blot présenté **Figure 61C**. Une diminution du niveau de protéine Bcl-xL est observée dans les MCF-7 ShBcl-xL comparées aux MCF-7 ShCtl dans les extraits totaux et les fractions mitochondriales, indiquant l'efficacité de l'ARN interférence utilisé. La protéine E2F1 est retrouvée au niveau des mitochondries des MCF-7 ShCtl, comme attendu au regard de nos précédents résultats, mais également au niveau des mitochondries des MCF-7 ShBcl-xL. Une augmentation y est même observée mais est très probablement due à une augmentation générale de la quantité de protéines mitochondriales dans les fractions ShBcl-xL comparée à celle des fractions contrôles, car CoxIV qui sert de contrôle de

charge pour ces fractions est également augmenté. Ainsi en absence de Bcl-xL, la protéine E2F1 est encore localisée au niveau des mitochondries.



L'ensemble de nos résultats indique que non seulement E2F1 est présent au niveau des mitochondries et interagit avec Bcl-xL, probablement au niveau de ce compartiment ; mais en plus son recrutement est accentué par Bcl-xL. En revanche Bcl-xL n'est pas indispensable à la localisation mitochondriale d'E2F1. Il est possible que d'autres protéines interviennent dans le ciblage mitochondrial d'E2F1 avec un effet redondant à celui de Bcl-xL; Mcl-1 pourrait en faire partie du fait de sa capacité à interagir avec E2F1.

3. Recherche des domaines de Bcl-xL impliqués dans son interaction avec E2F1

a. L'interaction se fait indépendamment du sillon hydrophobe de Bcl-xL

La protéine anti-apoptotique Bcl-xL exerce ses fonctions canoniques en interagissant avec les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Cela implique des interactions engagées entre le sillon hydrophobe de Bcl-xL et le domaine BH3 des protéines : à multidomains Bax et Bak ou à

domaine BH3-Only. Il en résulte une inhibition de l'activation des effecteurs et par conséquent de leur oligomérisation suivie de la MOMP. Nos données mettent en évidence un effet pro-apoptotique d'E2F1 directement aux mitochondries et son association avec les membres anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1. La recherche des domaines protéiques de Bcl-xL impliqués dans son interaction avec E2F1 peut nous éclairer sur le mécanisme d'action pro-apoptotique orchestré par E2F1 aux mitochondries. Cette protéine ne comporte pas de domaine BH3 putatif aussi il semble peu probable que l'interaction avec les anti-apoptotiques s'effectue au niveau de leur poche hydrophobe.

Nous avons donc émis l'hypothèse d'une résistance de cette interaction à l'inhibition pharmacologique de Bcl-xL par un traitement BH3-mimétique. L'ABT-737 comme le Wehi-539 sont des drogues désignées pour se loger au sein de la poche et rompre les complexes « poche-BH3 » dépendants. Une approche d'immunoprécipitation a été réalisée sur la lignée Saos-2 traitée ou non pendant 24h au Wehi-539 (**Figure 62A, panel supérieur**). Une co-immunoprécipitation d'E2F1 est observée avec Bcl-xL indépendamment de la présence du BH3-mimétique. Une légère diminution de la co-immunoprécipitation est visible sous Wehi-539 mais est associée à une plus faible quantité de Bcl-xL immunoprécipité. Ces premières données indiquent une persistance de l'interaction E2F1 – Bcl-xL sous Wehi-539. Parallèlement, les interactions E2F1 – Bcl-xL et en référence Bak – Bcl-xL ont été mesurées en présence ou non de la molécule ABT-737 comme indiqué sur la **Figure 62B, panel inférieur**. Pour chaque couple testé une courbe de saturation représentative est associée aux histogrammes des paramètres Bmax et Bret50 issus des courbes obtenues à chaque expérience indépendante. L'intensité maximale du signal Bret (Bmax), obtenue à saturation, correspond au transfert d'énergie maximum mesuré entre les deux interactants étudiés. Le Bret50 correspond au rapport YFP/RLuc permettant d'atteindre 50% du signal Bret maximum (soit 50% du Bmax). Le rapport YFP/RLuc est dépendant de la quantité des deux interactants ainsi le Bret50 reflète l'affinité relative du couple étudié. Tandis que l'interaction E2F1 – Bcl-xL reste identique avec ou sans traitement celle de Bak avec Bcl-xL est perturbée. En effet, le Bret50 augmente, synonyme d'une diminution de l'affinité des deux protéines en présence d'ABT-737 et le Bmax augmente signe que l'interaction est affectée. Selon le groupe de Couturier, lorsqu'une interaction, mesurée en BRET, est perturbée mais incomplètement rompue il peut y avoir une réorientation des partenaires. Pour conséquence, un rapprochement des donneurs et accepteurs d'énergie peut se produire, permettant ainsi un meilleur transfert d'énergie conduisant à un Bmax plus élevé (Couturier et

Deprez, 2012). Nos résultats indiquent, que contrairement à Bak, l'interaction E2F1 – Bcl-xL est résistante à l'effet d'un traitement BH3-mimétique.

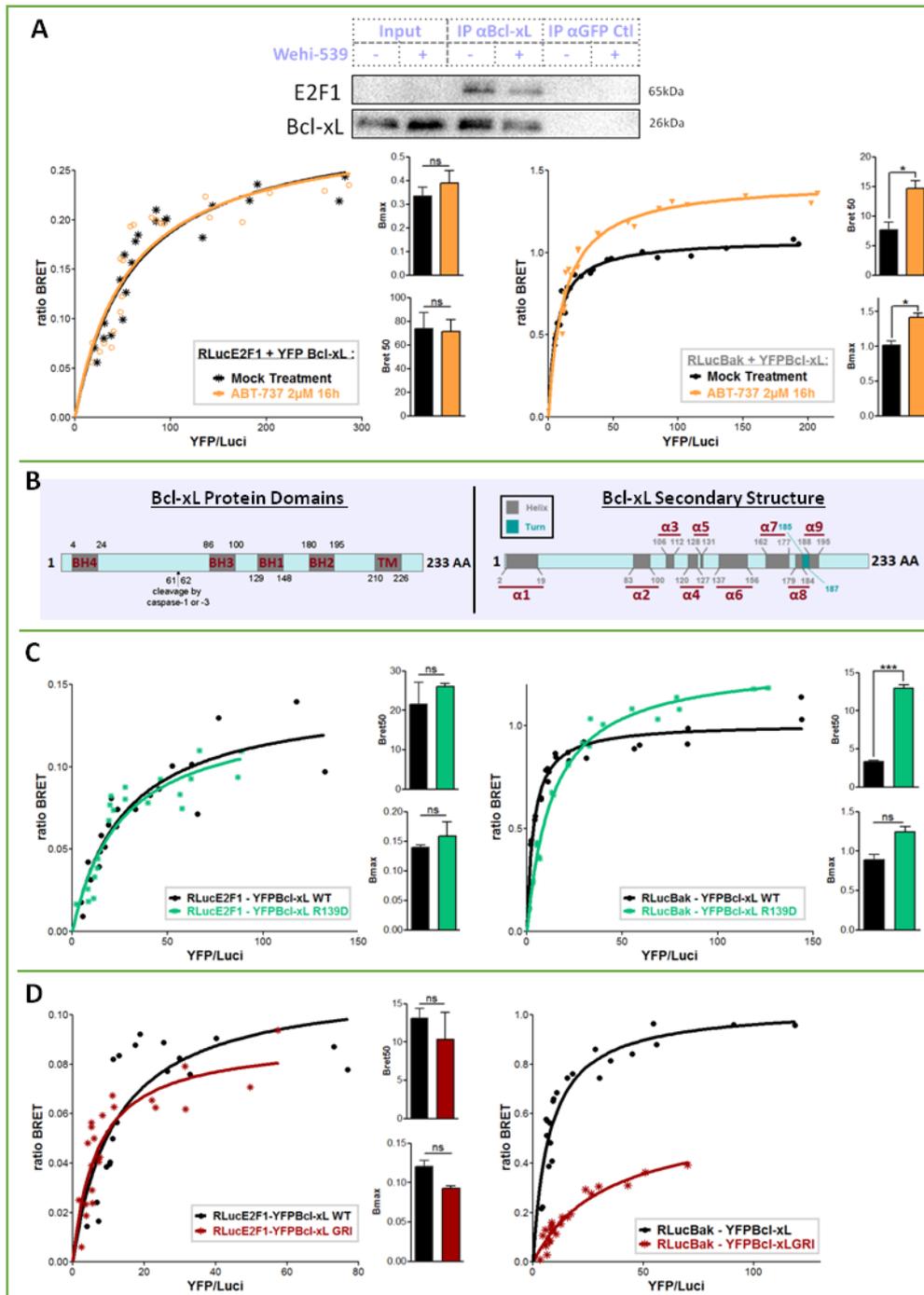


Figure 62 | La poche hydrophobe de Bcl-xL n'est pas requise pour son interaction avec la protéine E2F1

(A). Analyse Western Blot des lysats protéiques de cellules Saos-2 traitées ou non au Wehi-539 (2 μM, 24h), immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre Bcl-xL ou la GFP (contrôle négatif) (panel supérieur). Mesure BRET des interactions protéiques dans la lignée HeLa (panel inférieur gauche) ou MCF-7 (panel inférieur droit) co-transfectées avec 50ng ou 100ng de plasmides codant RLucE2F1 ou RLucBak respectivement et des quantités croissantes de plasmides eYFPBcl-xL sous traitement ou non ABT-737 (2 μM, 16h). Les paramètres Bret max (Bmax) et Bret50 présentés sur les histogrammes proviennent de trois expériences indépendantes. Les courbes de saturation sont représentatives de l'une d'elle. (B). Illustration des domaines protéiques et de la structure secondaire de Bcl-xL (modifié d'après ©Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology). (C, D). Mesure BRET des interactions protéiques dans les MCF-7 co-transfectée avec 50ng ou 100ng de plasmides codant RLucE2F1 ou Bak respectivement et des quantités croissantes de plasmides eYFPBcl-xL WT ou présentant des mutations dans la poche hydrophobe: R139D (C) ou GRI (D). Les paramètres Bret max (Bmax) et Bret50 présentés sur les histogrammes proviennent d'une ou plusieurs expériences indépendantes. Les courbes de saturation sont représentatives de l'une d'elle.

Le travail de thèse de Jessie Pécot, auquel j'ai contribué (Annexe 2), met en évidence des résistances de certains couples au traitement BH3-mimétique, bien que leur interaction s'effectue sur un modèle « poche hydrophobe – domaine BH3 ». C'est notamment le cas de Puma et Bcl-xL. Ainsi en vue d'exclure définitivement un rôle de la poche hydrophobe de Bcl-xL dans son association à E2F1, une approche complémentaire a été utilisée. Une analyse de la capacité de

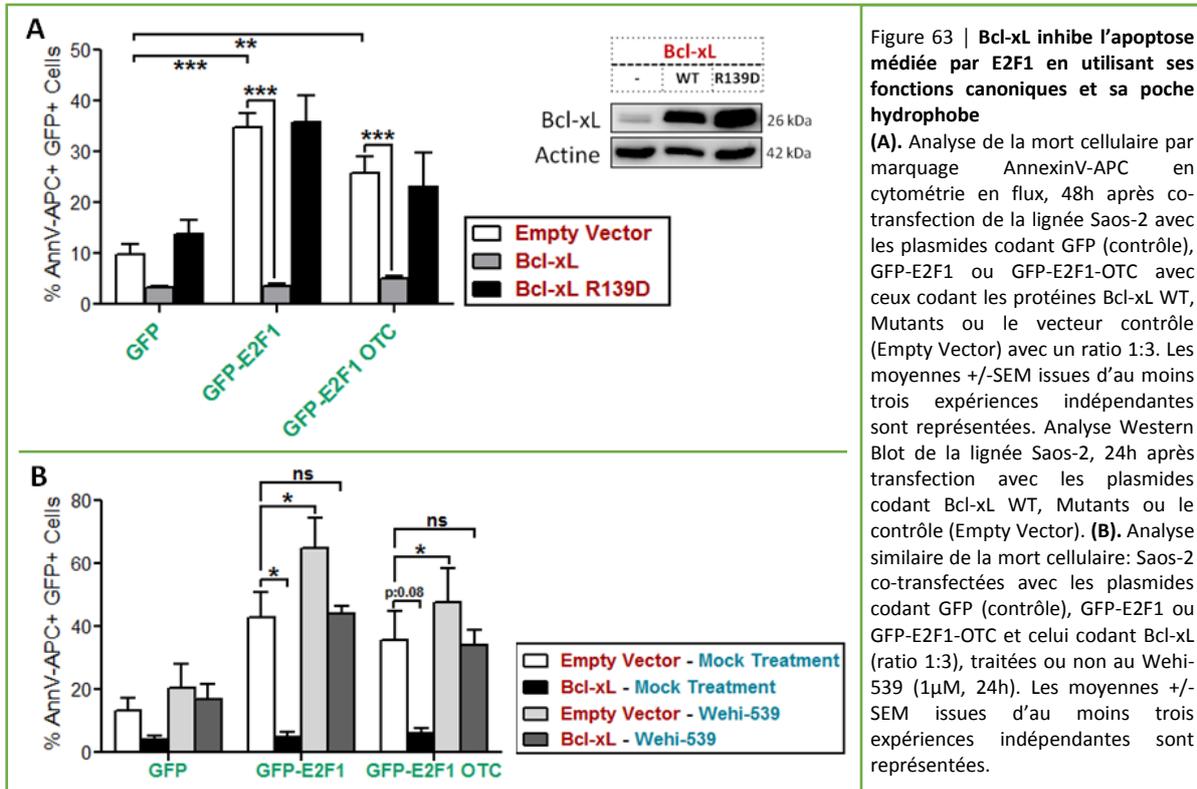
mutants de Bcl-xL à interagir avec E2F1 malgré la présence de mutations dans le sillon hydrophobe a été effectuée par BRET. L'illustration schématique de la structure protéique de Bcl-xL (**Figure 62B**) permet de localiser où se trouvent les mutations des mutants utilisés pour cette étude. Le premier mutant : Bcl-xL R139D comporte une mutation ponctuelle dans le domaine BH1 de Bcl-xL, le second : Bcl-xL GRI pour G138E R139L I140N, comporte 3 mutations dans ce même domaine. Le couple Bak – Bcl-xL, dont l'interaction requiert la poche hydrophobe de Bcl-xL, est utilisé en référence. Les cellules MCF-7 ont été transfectées avec des quantités fixes de plasmide RLucE2F1 ou RLucBak et des quantités croissantes de plasmides codant YFPBcl-xL ou ses mutants. L'étude de la mutation R139D de Bcl-xL sur sa capacité à lier Bak et E2F1 est présentée **Figure 62C**. Dans le cas de Bak, la présence de la mutation provoque une augmentation du Bret50 signifiant que l'affinité relative de Bak pour ce mutant de Bcl-xL est réduite. *A contrario*, l'interaction entre E2F1 et Bcl-xL n'est pas affectée par la mutation car ni le Bret50, ni le Bmax ne varie. Ces données tendent à décrire l'interaction entre E2F1 et Bcl-xL comme étant indépendante de la poche hydrophobe. L'étude de la capacité du mutant Bcl-xL GRI à interagir avec E2F1 ou Bak est présentée **Figure 62D**. L'ajout de mutations supplémentaires abroge complètement l'interaction avec Bak comme l'indique le signal Bret quasi linéaire et de très faible intensité obtenu pour ce couple. En absence de signal saturable, les paramètres Bmax et Bret50 ne peuvent être exploités. En revanche, cet effet n'est pas retrouvé avec E2F1 qui est toujours en mesure d'interagir avec ce mutant de façon équivalente à Bcl-xL sans variation du Bmax ou du Bret50.

L'ensemble de ces résultats indique que la poche hydrophobe de Bcl-xL qui lui permet d'interagir, entre autres avec Bak, n'est pas le domaine impliqué pour son interaction avec E2F1.

b. Bcl-xL inhibe l'apoptose induite par E2F1 mitochondrial par le biais de ses fonctions canoniques

Ayant connaissance de la capacité du mutant Bcl-xL R139D à interagir avec E2F1, nous avons évalué sa faculté à inhiber la mort induite par E2F1 et sa forme ciblée aux mitochondries. Pour cela, l'apoptose des Saos-2 a été mesurée par marquage AnnexinV-APC, 48h après transfection des plasmides codant Bcl-xL ou le mutant R139D en excès (ratio3 : 1) par rapport à ceux codant GFP-E2F1, GFP-E2F1-OTC ou le contrôle GFP (**Figure 63A**). Comme obtenu précédemment (**Figure 59C**), Bcl-xL inhibe la mort induite par E2F1 et E2F1-OTC. Cependant, le mutant Bcl-xL R139D n'est plus en mesure d'induire une quelconque protection contre la mort dépendante d'E2F1. La différence d'effet entre Bcl-xL et son mutant ne peut pas être attribuée à une plus faible expression du mutant comme l'indique le Western Blot associé à la **Figure 63A**. Donc l'inhibition de la mort cellulaire

générée par E2F1 et E2F1-OTC implique un sillon hydrophobe de Bcl-xL non altéré. Le mutant R139D, bien qu'interagissant avec E2F1 ne protège plus la mort cellulaire sub-séquente. Cela suggère que Bcl-xL exerce son action anti-apoptotique en interagissant avec les protéines pro-apoptotiques via sa poche hydrophobe.



Un test de mort a été effectué sur la lignée Saos-2 co-exprimant GFP-E2F1, GFP-E2F1-OTC ou le contrôle GFP avec Bcl-xL ou le contrôle (Empty Vector). Les cellules ont été soumises ou non à 24h de traitement Wehi-539 avant mesure de la mort cellulaire, 48h après transfection comme indiqué sur la **Figure 63B**. Bcl-xL abroge l'apoptose induite par E2F1 et sa forme mitochondriale, mais cette action anti-apoptotique est annihilée par le Wehi-539. Nous noterons que le traitement accentue légèrement la mort induite par E2F1 et E2F1-OTC. Ces résultats confirment ceux obtenus avec le mutant présenté ci-dessus, à savoir que Bcl-xL protège la mort induite par E2F1 et E2F1 mitochondrial en interférant avec les protéines pro-apoptotiques BH3-Only ou effectrices grâce à son sillon hydrophobe.

c. L'interaction E2F1 – Bcl-xL est-elle semblable à celle entre p53 et Bcl-xL ?

De nombreuses similarités se révèlent au cours de notre étude entre le facteur de transcription p53 et le facteur de transcription E2F1. En effet, tout deux dotés d'un potentiel pro-apoptotique transcriptionnel, ils agissent en parallèle directement aux mitochondries afin de promouvoir l'apoptose indépendamment de la transactivation de cibles pro-apoptotiques. De plus, ils sont tous deux capables d'interagir avec des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. C'est d'ailleurs par sa capacité à interférer dans le réseau d'interaction pro – anti-apoptotiques que p53 est en mesure d'effectuer son rôle apoptotique aux mitochondries. De ce fait, de nombreuses études ont été menées afin de caractériser les dessous moléculaires de l'interaction p53 – Bcl-xL. A l'instar de ce que nous observons avec E2F1, l'interaction p53 – Bcl-xL ne s'effectue pas selon un modèle « poche – domaine BH3-Like ». D'ailleurs Bcl-xL peut à la fois interagir avec p53 et des partenaires pro-apoptotiques simultanément (Follis et al., 2013). L'implication de différentes zones de Bcl-xL a été mise en évidence, où se trouvent certains résidus du domaine BH3 et une région plutôt N-terminale comprenant le domaine BH4 et l'hélice α 1 (Hagn et al., 2010). Une étude remarquable de (Follis et al., 2014), a présenté un gros travail de caractérisation des résidus impliqués dans cette interaction et a identifié des mutants de Bcl-xL ayant perdu leur capacité à lier p53. Ces mutations sont les suivantes : H113A, I114A, E158K, K20A.

Nous avons souhaité déterminer si certaines de ces mutations sont capables de perturber l'interaction d'E2F1 avec Bcl-xL. C'est pourquoi, une mesure des interactions entre RLucE2F1 et YFPBcl-xL ou ses mutants H113A et E158K a été réalisée par une approche BRET dans la lignée MCF-7 (**Figure 64A**). Une interaction est observée entre E2F1 et les deux mutants de Bcl-xL. Aucune variation significative des paramètres Bmax et Bret50 n'est détectée. Ces données suggèrent donc que ces deux résidus sont optionnels pour l'interaction entre E2F1 et Bcl-xL tandis qu'ils sont décrits comme critique pour l'interaction p53 – Bcl-xL. Néanmoins seules deux mutations ponctuelles ont fait l'objet d'une analyse, il serait donc intéressant d'approfondir l'analyse à l'ensemble des résidus identifiés de Bcl-xL pour interagir avec p53.

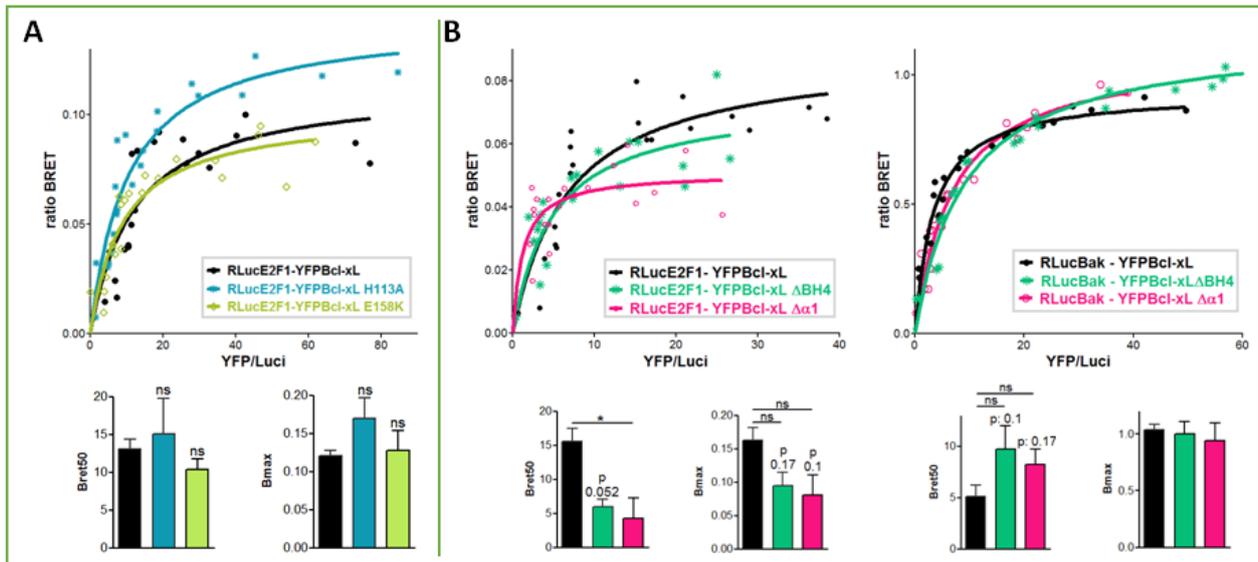


Figure 64 | **L'interaction E2F1-Bcl-xL semble différente de celle entre p53 et Bcl-xL**

(A). Mesure BRET des interactions protéiques dans la lignée MCF-7 co-transfectée avec 50ng de plasmide codant RLucE2F1 et des quantités croissantes de plasmides eYFPBcl-xL WT ou Mutants H113A, E158K. **(B).** Mesure BRET des interactions protéiques dans la lignée MCF-7 co-transfectée avec 50ng ou 100ng de plasmides codant RLucE2F1 ou Bak respectivement et des quantités croissantes de plasmides eYFPBcl-xL WT ou Mutants Δ BH4 ou $\Delta\alpha$ 1. **(A, B).** Les paramètres BRET max (Bmax) et BRET50 présentés sur les histogrammes proviennent d'au moins deux expériences indépendantes. Les courbes de saturation sont représentatives de l'une d'elle.

d. Rôle de la région N-terminale de Bcl-xL dans son interaction à E2F1

La région N-terminale de Bcl-xL comprend son hélice α 1 dans laquelle se trouve son domaine BH4 (**Figure 62B**). Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, cette région présente une importance clé dans l'interaction entre p53 et Bcl-xL. Il se trouve que le domaine BH4 de Bcl-2 et Bcl-xL représente un site d'interaction pour de nombreux partenaires n'appartenant pas à la famille Bcl-2 et dont la liste ne cesse de croître (Liu et al., 2016). Cela confère aux anti-apoptotiques des fonctions diverses comme le contrôle de la réparation des dommages à l'ADN (Interaction BH4 Bcl-2 avec c-Myc ou hMSH6), la régulation de l'homéostasie calcique (Interaction BH4 Bcl-2 avec IP3R et BH4 Bcl-xL avec les récepteurs Ryanodine (RyR) ou VDAC1), la promotion de l'angiogénèse (rôle du BH4 Bcl-2 sur l'expression VEGF HIF-1 dépendante) ou de la néphrogénèse (Interaction BH4 Bcl-2 avec la Paxillin). Par ailleurs le domaine BH4 seul de Bcl-xL suffit à inhiber l'apoptose des cellules *in vitro* comme *in vivo* (Sugioka et al., 2003).

Etant donné que l'interaction E2F1 – Bcl-xL n'engage pas le sillon hydrophobe, la possibilité qu'elle implique en revanche le domaine BH4 a été prise en compte. Pour rappel, E2F1 s'associe à Bcl-xL mais pas à Bcl-2, or des différences structurales existent entre leurs domaines BH4 respectifs, notamment tenues responsables d'une régulation différentielle de l'IP3R (Monaco et al., 2013). C'est pourquoi nous avons évalué la capacité de mutants de Bcl-xL au niveau de sa région N-terminale à interagir avec E2F1. La lignée cellulaire MCF-7 a été transfectée avec des quantités fixes de RLucE2F1 ou RLucBak et des quantités croissantes de plasmides codant YFPBcl-xL, délété de son

hélice $\alpha 1$ (délétion des résidus 8-18) : YFPBcl-xL $\Delta\alpha 1$ ou de son domaine BH4 (délétion des résidus 2-24) : YFPBcl-xL $\Delta BH4$, afin d'analyser l'interaction de ces différents couples protéiques par BRET (**Figure 64B**). Les couples RLucBak – YFPBcl-xL $\Delta\alpha 1$ ou $\Delta BH4$ conduisent à l'obtention de courbes de saturation similaires à celle issue de l'interaction entre RLucBak et YFPBcl-xL. En effet, les niveaux de Bmax sont quasiment identiques entre ces conditions, et les variations de Bret50 ne sont pas significatives. Ces résultats indiquent que l'interaction entre Bak et Bcl-xL ne fait pas intervenir le domaine BH4 de Bcl-xL. Les couples RLucE2F1 – YFPBcl-xL mutants permettent également l'obtention de courbes de saturation mais différentes de celle provenant du couple RLucE2F1 – YFPBcl-xL. Et pour cause des variations du paramètre Bret50 sont détectées : celui-ci diminue en présence des délétions de la région N-terminale de Bcl-xL. E2F1 est donc encore capable de lier les mutants de Bcl-xL mais la diminution du Bret50 suggère que la protéine présente une meilleure affinité pour les deux mutants de Bcl-xL. Il est possible que la structure de Bcl-xL soit modifiée du fait des troncations et influe sur l'affinité des deux protéines l'une pour l'autre. Nos résultats indiquent donc que le domaine BH4 de Bcl-xL n'est pas requis dans son interaction avec E2F1.

4. Recherche des domaines protéiques d'E2F1 impliqués dans son association à Bcl-xL

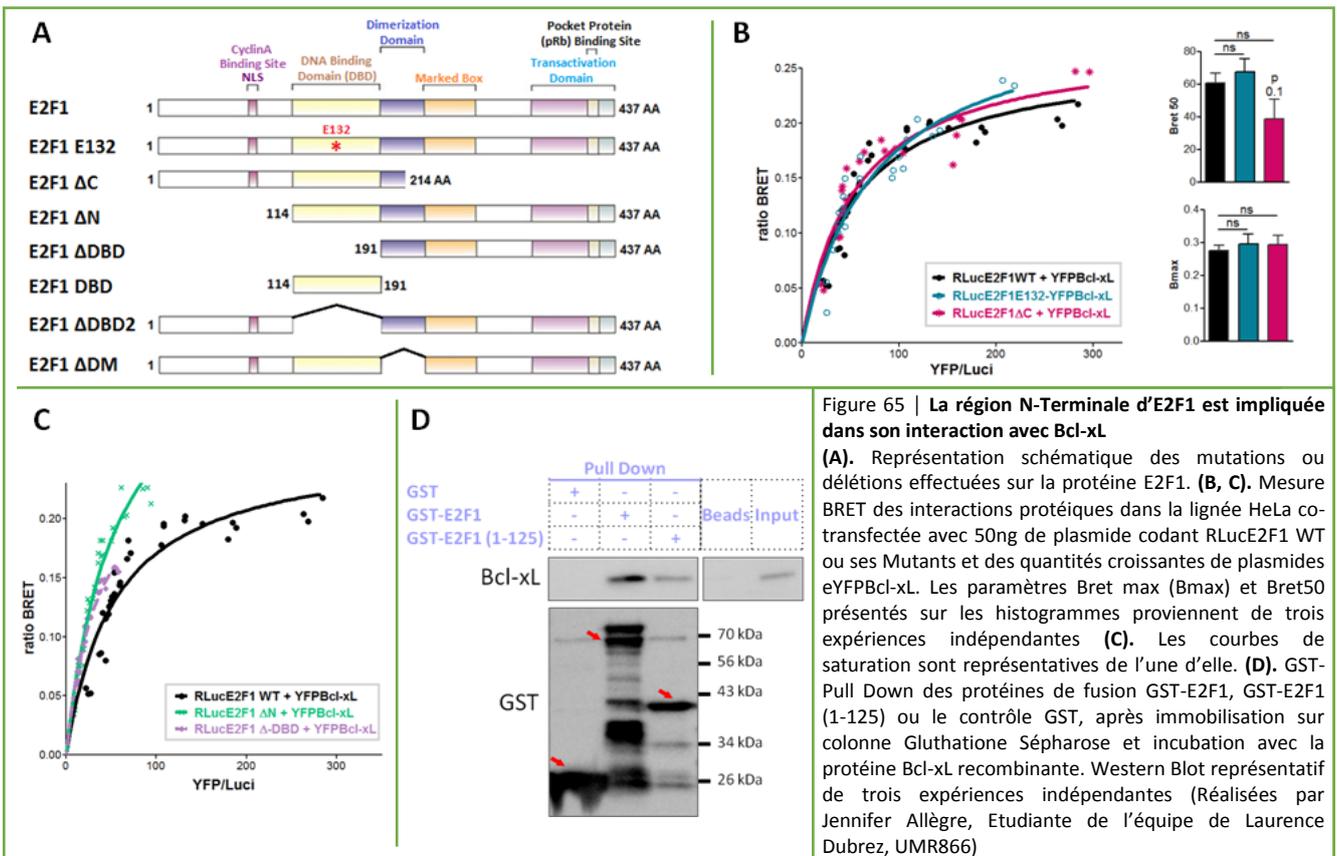
Dans le but de mieux comprendre les rouages de l'interaction d'E2F1 avec Bcl-xL, nous avons effectué dans un second temps une analyse structure-fonction où la capacité des différentes régions protéiques d'E2F1 à interagir avec Bcl-xL, induire la transcription de gènes cibles et promouvoir l'apoptose a été évaluée. La **Figure 65A** récapitule l'ensemble des mutants d'E2F1 utilisés pour cette étude.

a. L'interaction se fait au niveau de la région N-terminale d'E2F1 comprenant le DBD

Les protéines E2F1 ΔC , ΔN , ΔDBD et E132 ont été testées en BRET afin de déterminer leur capacité à lier la protéine Bcl-xL. Pour cela la lignée cellulaire MCF-7 a été transfectée avec des quantités fixes de RLuc E2F1 ou ses mutants avec des quantités croissantes de plasmides codant YFPBcl-xL.

Une courbe de saturation similaire à la condition : RLucE2F1 – YFPBcl-xL a été obtenue avec le couple RLucE2F1 ΔC – YFPBcl-xL (**Figure 65B**). Les paramètres Bmax et Bret50 sont d'ailleurs équivalents entre ces deux couples. Donc la région C-terminale d'E2F1 comprenant entre autre son domaine de transactivation, de liaison à pRb et la Marked Box n'est nullement requise dans l'association à Bcl-xL. Ce résultat est en accord avec nos observations d'immunoprécipitations dans

différentes lignées indiquant que pRB n'est pas requis pour que l'interaction E2F1 – Bcl-xL n'ait lieu (**Figure 60A**). Le mutant E2F1 E132 interagit également avec Bcl-xL comme le montre la courbe de saturation qui se superpose à celle du couple référent (**Figure 65B**). Le Bmax est en effet similaire, et la diminution du Bret50 observée n'est pas significative. Cela indique que la capacité d'E2F1 à lier l'ADN et celle à interagir avec Bcl-xL sont distinctes. En outre, si l'interaction se produit en partie ou au niveau du domaine de liaison à l'ADN (DBD), la mutation ponctuelle E132 est insuffisante pour l'affecter.



La troncation C-terminale d'E2F1 est relativement étendue et a pour mérite de fortement restreindre les domaines potentiels d'interaction. Nous avons donc effectué l'analyse complémentaire au niveau de la région N-terminale d'E2F1 (**Figure 65C**). Ni le couple RLucE2F1 ΔN – YFPBcl-xL ni celui RLucE2F1 ΔDBD – YFPBcl-xL n'ont été en mesure de fournir une courbe de saturation. En effet un signal linéaire est obtenu avec ces mutants ne permettant donc pas l'obtention de paramètres Bmax ou Bret50. Cela suggère que les domaines tronqués sur ces protéines seraient impliqués dans l'interaction avec Bcl-xL. Cela correspond donc à la région comprenant le domaine de liaison à la cycline A ainsi que la séquence d'import au noyau (NLS), et le domaine de liaison à l'ADN. Il faut savoir que l'interaction p53 – Bcl-xL implique le DBD de p53 en

engageant notamment des liaisons électrostatiques avec Bcl-xL (Follis et al., 2014). Or le DBD d'E2F1 est lui aussi enrichi en résidus hautement chargés, ce qui laisse entrevoir l'éventualité d'une interaction de Bcl-xL avec E2F1 par ce domaine.

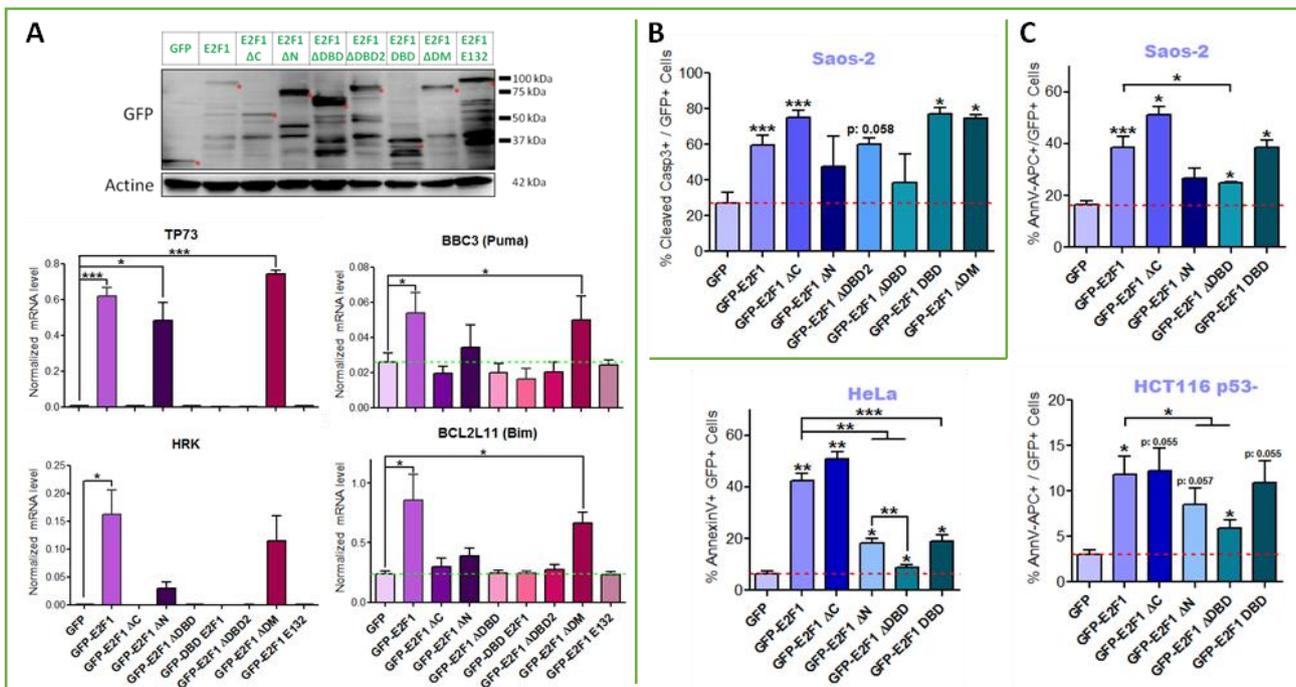
En collaboration avec l'équipe de Laurence Dubrez, une approche complémentaire de GST-PullDown a été réalisée par Jennifer Allègre. Les protéines GST-E2F1, GST-E2F1₁₋₁₂₅ ou le contrôle GST, protéines de fusion préalablement immobilisées sur colonne Glutathione Sépharose, ont été incubées avec du Bcl-xL recombinant. Les complexes formés dans la colonne ont été élués et les interactions analysées sur le Western Blot présenté **Figure 65D**. Aucune protéine Bcl-xL n'a été retenue dans la condition contrôle GST. Une interaction est détectée entre Bcl-xL et GST-E2F1 WT comme attendue en référence à la **Figure 60C**. Par ailleurs, les 125 premiers acides aminés d'E2F1 : GST-E2F1₁₋₁₂₅ interagissent avec Bcl-xL mais de façon plus faible que la forme sauvage d'E2F1. Cela conforte nos résultats de BRET indiquant que l'interaction se produit au niveau de la région N-terminale d'E2F1.

Etant donné que l'interaction n'est pas détectable en BRET entre E2F1 Δ N et Bcl-xL, des résidus présents dans les positions 1-114 doivent être requis. Cependant comme le montre les résultats de Pull-Down ils sont insuffisants car les acides aminés 1-125 ne permettent pas de restaurer une interaction semblable à celle obtenue avec la protéine entière. Or dans cette construction il manque les résidus 125 à 191 du domaine de liaison à l'ADN, qui pourraient intervenir dans la liaison d'E2F1 à Bcl-xL.

b. La région N-terminale d'E2F1 comporte des domaines responsables de la mort non transcriptionnelle

Nos analyses d'interaction nous renseignent en partie sur les domaines d'E2F1 nécessaires pour sa liaison à Bcl-xL. Nous avons donc cherché à déterminer leur implication dans la mort induite par E2F1 de façon non-transcriptionnelle. L'expression de toutes les constructions a été vérifiée par Western Blot (**Figure 66A, panel supérieur**). Une évaluation de leur activité transcriptionnelle a été réalisée sur la lignée Saos-2 24h après la surexpression des différents allèles d'E2F1 initialement présentés sur la **Figure 65A**, de la forme sauvage ou d'un contrôle négatif (GFP). L'expression de cibles transcriptionnelles d'E2F1 a été analysée par qPCR et est présentée sur la **Figure 66A, panel inférieur**. GFP-E2F1 induit une augmentation de la transcription des gènes codant p73 et les BH3-Only : Puma, Hrk et Bim. La protéine GFP-E2F1 Δ DM induit significativement l'expression de p73, Puma et Bim. Ainsi malgré l'absence de son domaine de dimérisation, E2F1 conserve une activité

transcriptionnelle fonctionnelle. Donc il semble que son hétérodimérisation avec le co-facteur DP ne soit pas indispensable à son rôle de facteur de transcription. Le mutant GFP-E2F1 Δ N induit également une augmentation significative de l'expression de p73 et une tendance similaire est observée sur les gènes codant Puma, Hrk et Bim. Bien que la protéine conserve une capacité à transcrire des gènes cibles, celle-ci se retrouve diminuée comparé à E2F1. L'absence de séquence d'import au noyau, présent dans la région délétée, est probablement en partie responsable de cette diminution de fonction transcriptionnelle. Aucun des autres mutants d'E2F1 testés n'est en mesure d'induire l'expression de gènes cibles, ce qui est attendu pour les protéines GFP-E2F1 Δ DBD et Δ DBD2 qui ne peuvent plus lier l'ADN et pour GFP-DBD E2F1 et Δ C qui ne possèdent plus de domaine de transactivation.



La capacité des protéines mutées d'E2F1 à induire l'activation de la caspase 3 a été analysée 48h après leur surexpression dans les lignées cellulaires Saos-2 grâce à un immunomarquage Caspase 3 clivée (**Figure 66B**). Environ 60% des cellules exprimant GFP-E2F1 présentent une activation de la caspase 3 comparées aux cellules contrôles GFP (27%). Comme observé précédemment GFP-E2F1 Δ C maintient cet effet et ce en absence de toute transcription de gènes

cibles. En effet une activation de la caspase 3 est détectée dans 75% des cellules l'exprimant. La délétion N-terminale affecte la capacité d'E2F1 à activer les caspases bien que ce mutant conserve une activité transcriptionnelle. En absence de DBD (GFP-E2F1 Δ DBD2), la cascade des caspases semble déclenchée. La troncation concomitante de la région N-terminale et du DBD : GFP-E2F1 Δ DBD diminue fortement cet effet indiquant que ces deux domaines joueraient un rôle dans l'activation des caspases. Cependant la surexpression seule du DBD suffit à restaurer le clivage de la caspase 3 initié par E2F1 de façon indépendante de toute activation transcriptionnelle de gènes cibles. Enfin le mutant GFP-E2F1 Δ DM induit de manière équivalente à GFP-E2F1 l'activation de la caspase 3, or ce dernier conserve ses fonctions transcriptionnelles, qui peuvent donc en partie intervenir dans l'effet observé. Ces résultats indiquent que la région N-terminale et le DBD d'E2F1 sont importants pour la capacité d'E2F1 à activer les caspases et plus particulièrement le DBD qui suffit à restaurer les effets observés avec la protéine sauvage.

En parallèle, la mort cellulaire a été mesurée dans les lignées cellulaires Saos-2, HeLa et HCT116 p53^{-/-}, 48h après surexpression de GFP-E2F1, ses mutants ou GFP comme indiqué sur la **Figure 66C**. En accord avec les données d'activité caspase 3 clivée, GFP-E2F1, Δ C et DBD seul induisent l'apoptose des Saos-2 tandis que les mutants Δ N et Δ DBD voient leur potentiel apoptotique fortement altéré par les troncations qu'ils portent. Les mêmes effets sont retrouvés dans les lignées HeLa et HCT116 p53^{-/-} avec une perte graduelle de l'activité pro-apoptotique du mutant Δ N par rapport à la double troncation Δ DBD. Le DBD induit une apoptose à un niveau similaire à celui obtenu avec E2F1. Dans la lignée HeLa l'activité apoptotique du DBD est relativement faible et se trouve au niveau de celle du mutant Δ N or pour rappel ce mutant conserve la capacité à transcrire des gènes cibles contrairement au DBD, faculté qui peut contribuer à la mort cellulaire observée.

L'ensemble de ces données indique que la partie N-terminale et le DBD sont requis pour induire la mort des cellules indépendamment de la transactivation de gènes cibles. Or ces deux mêmes domaines sont ceux identifiés comme impliqués dans l'interaction E2F1 – Bcl-xL. Il semble donc y avoir une corrélation entre le potentiel apoptotique non transcriptionnel d'E2F1 et sa capacité à lier Bcl-xL.

IX. Influence d'E2F1 et Bcl-xL sur leurs fonctions respectives

1. Bcl-xL ne modifie pas les fonctions nucléaires transcriptionnelles d'E2F1

a. Bcl-xL ralentit le transport nucléocytoplasmique d'E2F1

Nos données mettent en évidence une interaction entre E2F1 et Bcl-xL. La localisation de Bcl-xL est principalement mitochondriale et en partie cytoplasmique. Le facteur de transcription E2F1, quant à lui, est majoritairement localisé au noyau où il exerce ses fonctions transcriptionnelles et nos résultats indiquent une localisation au cytoplasme dont sa présence au compartiment mitochondrial. Au vu de la distribution cellulaire de ces protéines, il est fortement probable que leur interaction s'effectue au cytoplasme et/ou aux mitochondries. C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse que Bcl-xL en interagissant avec E2F1, perturberait son import au noyau.

Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons utilisé une approche de microscopie : FLIP pour Fluorescence Loss After Photobleaching, présentée **Figure 67**. Elle permet d'étudier le transport d'une protéine entre deux compartiments subcellulaires.

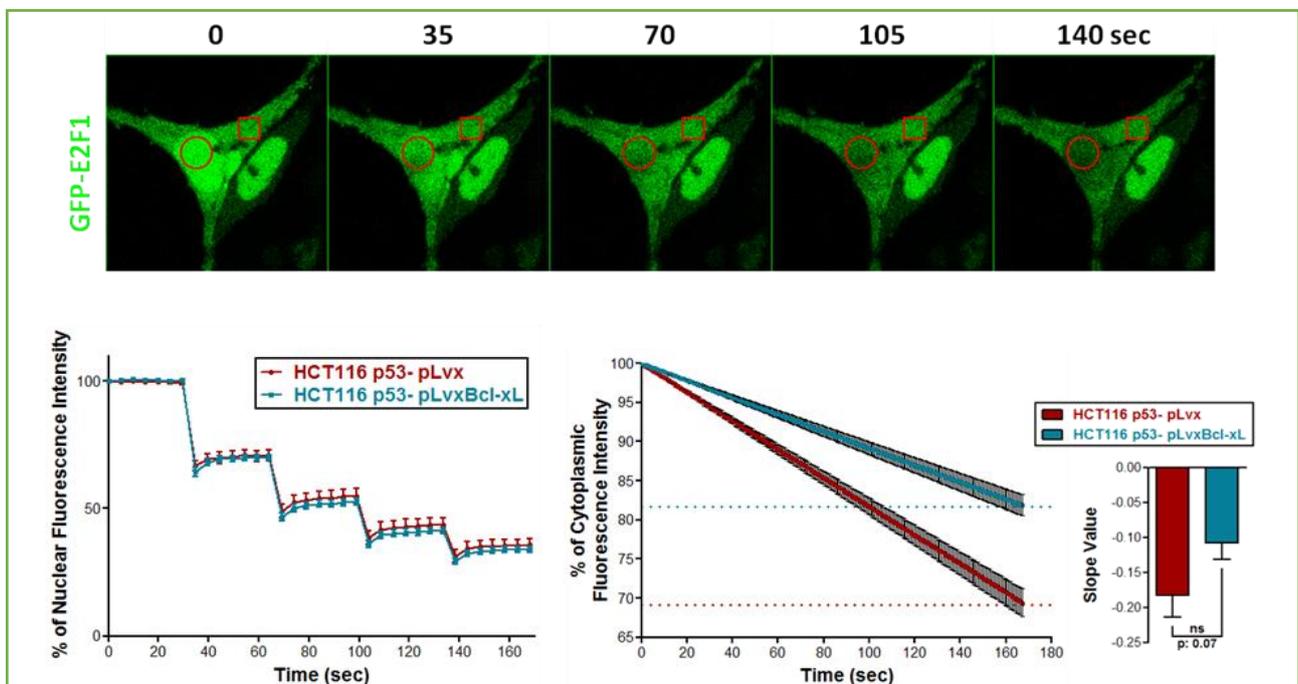


Figure 67 | **Bcl-xL ralentit le transport nucléocytoplasmique d'E2F1**

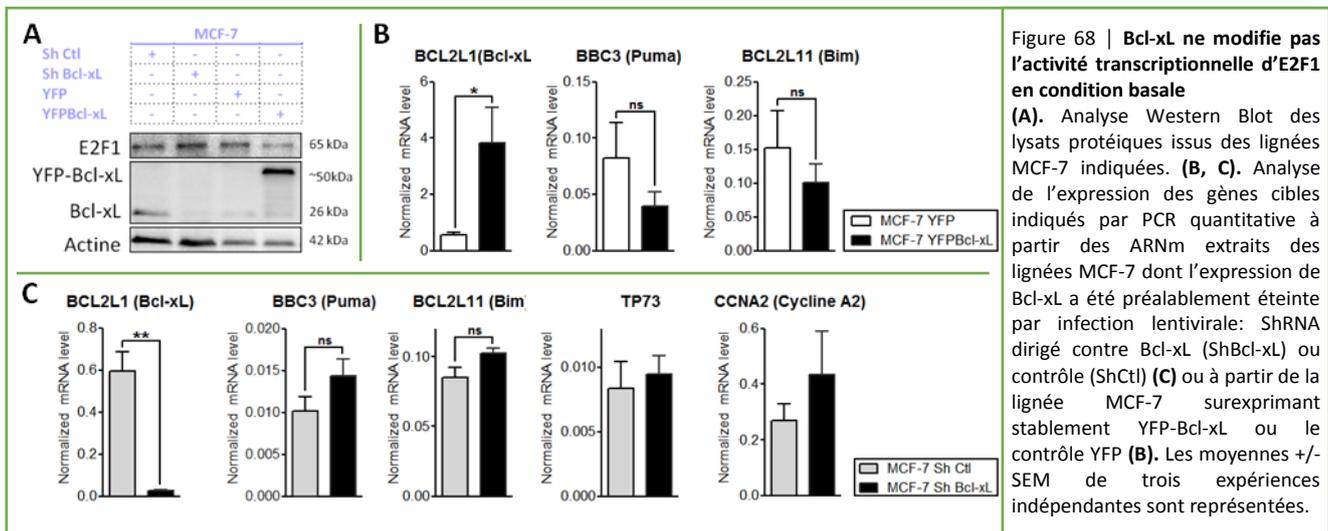
Analyse du transport nucléocytoplasmique d'E2F1 par FLIP dans les lignées HCT116 p53^{-/-} surexprimant stablement Bcl-xL (pLvxBcl-xL) ou non (pLvX), 48h après transfection de GFP-E2F1. Les cellules ont été photobleachées de façon répétée au niveau de la zone de FLIP rouge ciblée au noyau (indiquée par le cercle rouge). Une acquisition d'images, toutes les 5 sec au microscope confocal Nikon A1 RSI a été effectuée au niveau des zones rouges indiquées au noyau et cytoplasme. Traitement des images avec le logiciel FIJI. Les intensités de fluorescence dans les zones de mesures ont été normalisées à 100% par rapport à la fluorescence initiale obtenue au 1^{er} point d'acquisition. La fluorescence mesurée dans une cellule voisine permet d'appliquer une correction de la décroissance de fluorescence au cours du temps d'acquisition observée en absence de stimulation. Les graphiques représentent les moyennes de fluorescence en % +/-SEM d'une expérience représentative. A gauche : le profil de fluorescence obtenu lors du FLIP au noyau, à droite : le profil de fluorescence obtenu au cytoplasme. L'histogramme représente les valeurs de pente des droites de fluorescence cytoplasmique.

Pour cela, les lignées HCT116 p53^{-/-} pLvxBcl-xL et pLvX (contrôle), exprimant stablement ou non Bcl-xL, ont été transfectées avec GFP-E2F1. La protéine, comme mentionné ci-dessus, est retrouvée au noyau et au cytoplasme. La fluorescence verte correspondant à GFP-E2F1 est mesurée à la fois au niveau d'une zone nucléaire et d'une seconde zone au cytoplasme, pendant environ 3 minutes. Une stimulation répétée, au niveau de la zone ciblée au noyau, avec le laser à pleine puissance, permet d'éteindre progressivement la fluorescence présente dans ce compartiment. Plusieurs cellules sont soumises à cette expérience ce qui permet d'obtenir des courbes de fluorescences nucléaires (graphique de gauche) et cytoplasmiques (graphique de droite). Le profil de fluorescence nucléaire indique une chute de celle-ci après chaque stimulation par le laser et est similaire entre les deux lignées utilisées. Le profil de fluorescence cytoplasmique décroît de façon linéaire au cours du temps d'acquisition. La perte de fluorescence au cytoplasme reflète un transport de GFP-E2F1 cytoplasmique au noyau, dont la fluorescence s'est retrouvée éteinte lors des stimulations répétées. Les profils de fluorescence semblent différents entre les deux lignées. La valeur de pente de décroissance de fluorescence cytoplasmique obtenue dans la lignée HCT116 p53^{-/-} pLvxBcl-xL tend à être plus faible que celle mesurée dans la lignée contrôle. Des mesures supplémentaires sont requises pour définir si la différence est significative. Ces résultats sont en accord avec l'interaction E2F1 – Bcl-xL et suggèrent que Bcl-xL ralentit le transport nucléocytoplasmique d'E2F1.

b. Bcl-xL n'inhibe pas les fonctions transcriptionnelles d'E2F1

L'activité de certains facteurs de transcription peut être régulée négativement par le biais de leur séquestration en dehors du compartiment nucléaire par une tierce protéine. Un exemple bien connu est celui du facteur de transcription NFκB qui est retenu inactif au cytosol par la protéine IκB qui masque son domaine NLS. Ce n'est que lors d'un stimulus d'activation de la voie NFκB, que celui-ci rejoindra le noyau pour y transcrire ces gènes cibles, du fait d'une rupture de son complexe avec IκB, suite aux modifications post-traductionnelles qui ciblent IκB au protéasome pour y être dégradé (Dyson and Komives, 2012). Comme un ralentissement de l'import nucléaire d'E2F1 semble observé en présence de Bcl-xL, nous avons étudié l'hypothèse d'une éventuelle conséquence sur la capacité à réguler l'expression de ses gènes cibles. C'est pourquoi une analyse de l'expression des gènes cibles d'E2F1 a été réalisée dans différents modèles cellulaires en y modulant l'expression de Bcl-xL.

Dans un premier temps l'expression des cibles transcriptionnelles d'E2F1 a été mesurée en condition basale dans les lignées MCF-7 où l'expression de Bcl-xL a été mise sous silence par ARN interférence via des infections lentivirales ShBcl-xL et ShCtl (contrôle) ou dans celles surexprimant stablement YFPBcl-xL ou le contrôle YFP. Dans les deux cas, la modification d'expression de Bcl-xL a été contrôlée par Western Blot (**Figure 68A**). La surexpression de Bcl-xL n'affecte pas de manière significative la transcription basale des gènes codant Puma et Bim (**Figure 68B**). De même, malgré une mise sous silence efficace de l'expression de la protéine anti-apoptotique, aucun effet significatif n'a été observé sur la transcription des gènes codant Puma, Bim, p73 ou la cycline A2 (**Figure 68C**). Ainsi nos résultats indiquent qu'en condition basale Bcl-xL n'est pas capable de modifier l'expression, au niveau transcriptionnel, des cibles d'E2F1.



Notre analyse a été réalisée en absence de tout stimulus qu'il soit mitogénique ou apoptotique or l'activité transcriptionnelle d'E2F1 est finement régulée de la sorte. De plus la transcription des cibles étudiées ici n'est pas uniquement régulée par E2F1 mais est également dépendante de p53. Or la lignée MCF-7 possède une protéine p53 sauvage pouvant annihiler la détection d'un potentiel effet de Bcl-xL sur la transactivation de ces cibles par E2F1. De par ces différentes raisons, l'expérience a été reconduite dans les lignées HCT116 p53^{-/-} surexprimant stablement Bcl-xL (pLvxBcl-xL) ou non (contrôle pLvX) et dans les lignées Saos-2 dont l'expression de Bcl-xL a été mise ou non sous silence comme précédemment (ShBcl-xL ou ShCtl). Pour rappel, dans ces deux lignées, l'interaction E2F1 – Bcl-xL a été détectée (**Figure 61A et 62A**). Un traitement étoposide en cinétique a été utilisé en vue de stimuler l'activité transcriptionnelle d'E2F1 sur ces cibles pro-apoptotiques.

L'étude réalisée sur les lignées HCT116 p53^{-/-} pLvxBcl-xL et pLvxBcl-xL est présentée sur la **Figure 69A**. Une analyse par Western Blot de l'expression d'E2F1 et Bcl-xL dans ces lignées, traitées ou non pendant 24h avec l'étoposide ou la doxorubicine, a été réalisée. Elle confirme d'une part l'accumulation d'E2F1 sous stress dans ce fond cellulaire et d'autre part la surexpression stable de Bcl-xL. Les résultats de qPCR indiquent que l'étoposide induit une légère augmentation de l'expression des BH3-Only Bim et Noxa. Aucune induction de la transcription de p73 ou Msh2 n'est observée sous stress. Contre toute attente en revanche l'expression de la cycline A2 augmente en cours du traitement. La surexpression de Bcl-xL ne modifie en rien l'augmentation de Bim, Noxa ou de la cycline A2 dans ces modèles cellulaires.

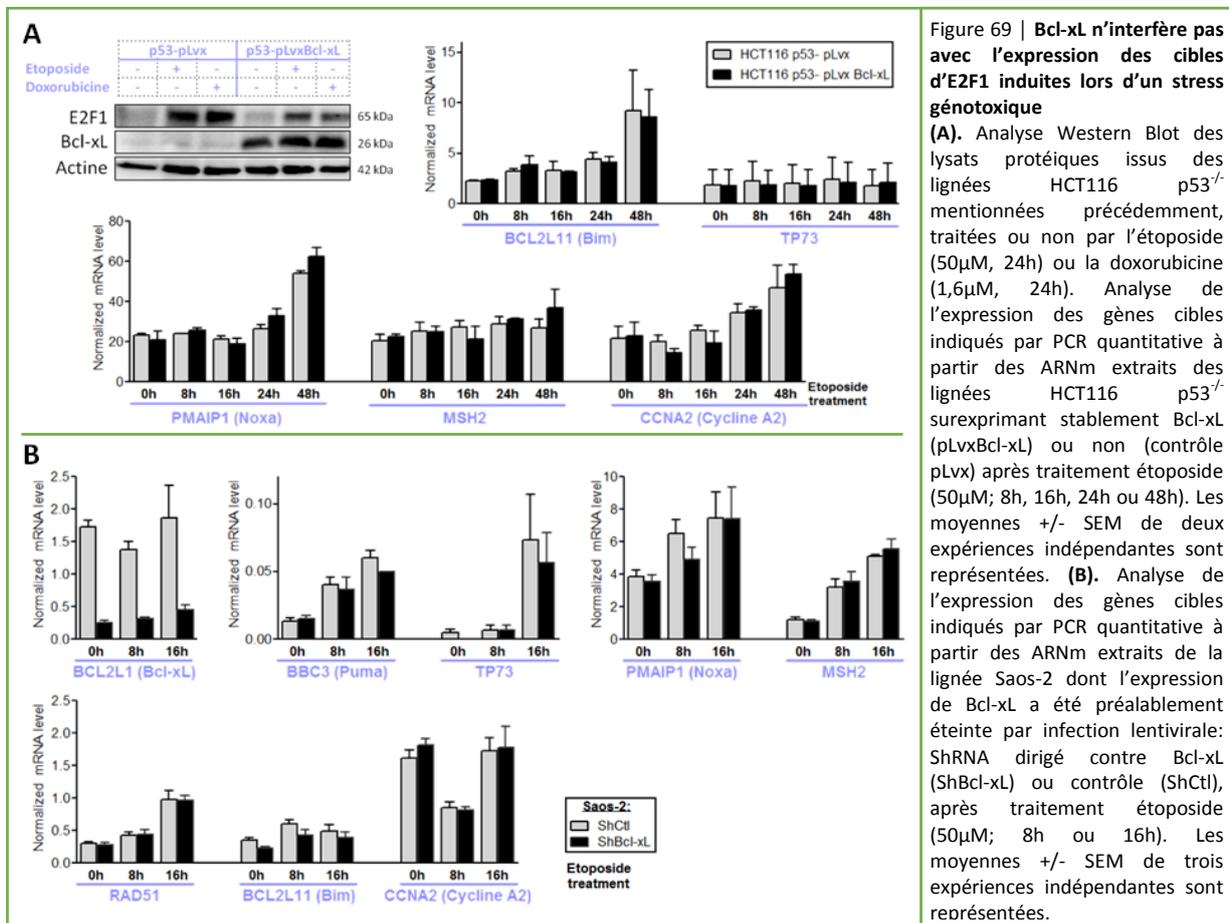


Figure 69 | Bcl-xL n'interfère pas avec l'expression des cibles d'E2F1 induites lors d'un stress génotoxique
(A) Analyse Western Blot des lysats protéiques issus des lignées HCT116 p53^{-/-} mentionnées précédemment, traitées ou non par l'étoposide (50µM, 24h) ou la doxorubicine (1,6µM, 24h). Les moyennes +/- SEM de deux expériences indépendantes sont représentées.
(B) Analyse de l'expression des gènes cibles indiqués par PCR quantitative à partir des ARNm extraits des lignées HCT116 p53^{-/-} surexprimant stablement Bcl-xL (pLvxBcl-xL) ou non (contrôle pLvxBcl-xL) après traitement étoposide (50µM; 8h, 16h, 24h ou 48h). Les moyennes +/- SEM de deux expériences indépendantes sont représentées.
(B) Analyse de l'expression des gènes cibles indiqués par PCR quantitative à partir des ARNm extraits de la lignée Saos-2 dont l'expression de Bcl-xL a été préalablement éteinte par infection lentivirale: ShRNA dirigé contre Bcl-xL (ShBcl-xL) ou contrôle (ShCtl), après traitement étoposide (50µM; 8h ou 16h). Les moyennes +/- SEM de trois expériences indépendantes sont représentées.

L'analyse inverse a été réalisée dans la lignée Saos-2 ShBcl-xL ou ShCtl, traitée ou non par l'étoposide en cinétique (**Figure 69B**). Une augmentation des cibles pro-apoptotiques d'E2F1 est visible dès 8h de traitement et s'accroît à 16h comme c'est le cas pour : Noxa, Puma et p73. Une induction transitoire de l'expression de Bim est observée à 8h de traitement. Les cibles Msh2 et Rad51, impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN, sont également induites de façon dépendante du temps de traitement. Enfin, une diminution transitoire de l'expression de la cycline

A2 est détectée à 8h de traitement probablement du fait d'un arrêt du cycle cellulaire. Bien que l'extinction de l'expression de Bcl-xL ait été efficace aucun effet n'est observé sur l'expression des différentes cibles mentionnées ci-dessus qu'elle soit basale ou induite par un stress génotoxique.

Nous n'avons pas été en mesure de détecter un effet régulateur de Bcl-xL sur l'activité transcriptionnelle d'E2F1. Ainsi si l'interaction de Bcl-xL avec E2F1 résulte effectivement en un ralentissement de son transport nucléocytoplasmique, il ne serait pas suffisant pour perturber son activité transcriptionnelle qu'elle soit basale ou induite par un stress génotoxique.

2. E2F1 module les fonctions mitochondriales de Bcl-xL

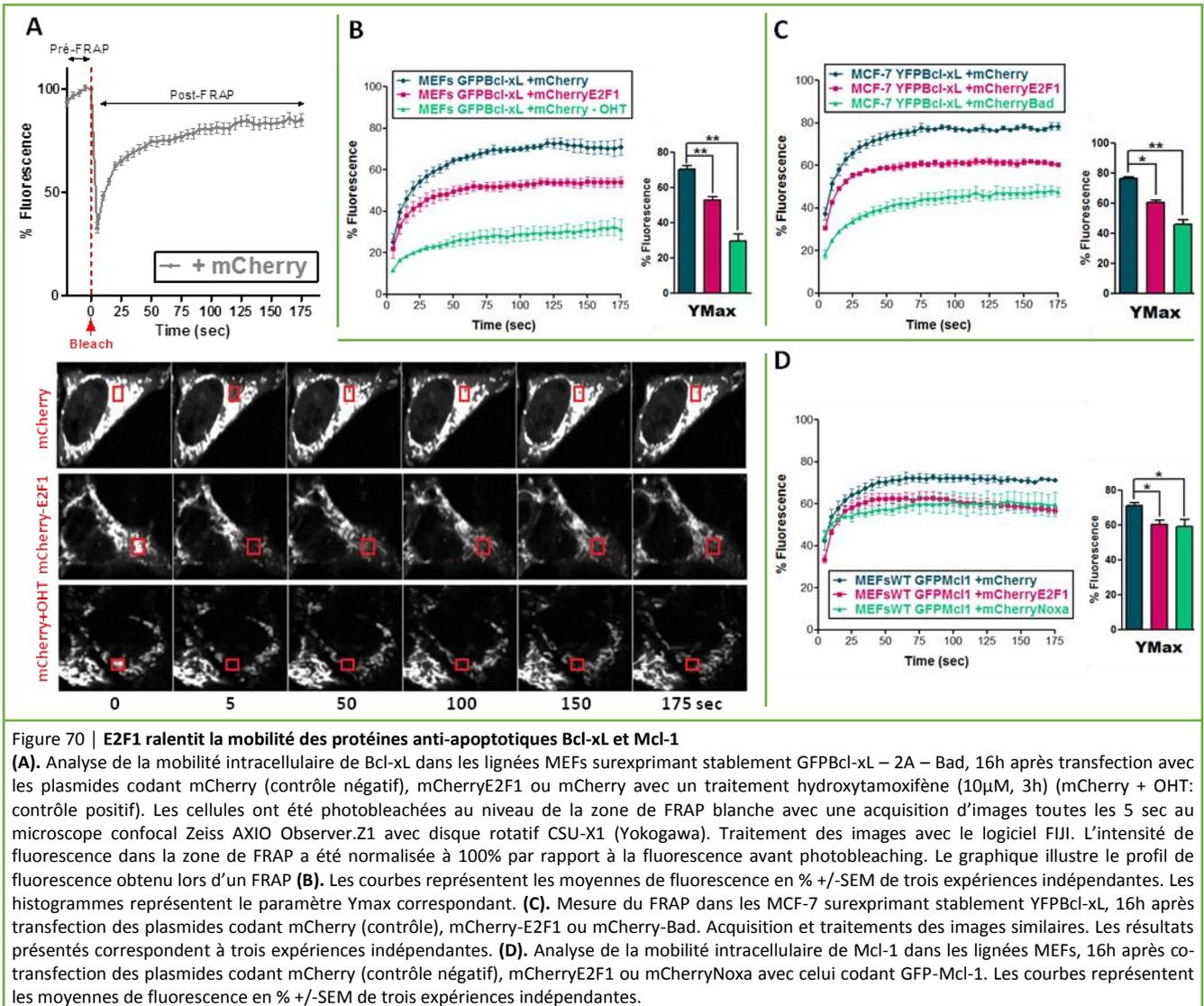
a. E2F1 ralentit la dynamique de Bcl-xL et Mcl-1 aux mitochondries

La mobilité des protéines de la famille Bcl-2 et la navette entre le cytosol et les mitochondries interviennent dans le contrôle de leurs fonctions pro ou anti-apoptotiques. Dans la continuité de notre démarche précédente, nous nous sommes proposés d'étudier l'influence d'E2F1 sur la mobilité des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 pour lesquelles nous avons identifié une interaction avec E2F1.

C'est au sein de la plateforme de microscopie confocale du laboratoire du Pr Andrew Gilmore à Manchester que j'ai réalisé des expériences de FRAP pour « *Fluorescence Recovery After Photobleaching* » afin de bénéficier de son expertise dans l'étude de la dynamique mitochondriale des membres de la famille Bcl-2 (Schellenberg et al., 2013). Dans un premier temps, les analyses ont été effectuées dans le modèle cellulaire utilisé en routine dans ce laboratoire pour ce type d'approche de microscopie. Il s'agit de fibroblastes embryonnaires murins (*MEFs* : *Mouse Embryonic Fibroblasts*) surexprimant stablement la construction GFPBcl-xL – 2A – Bad-ER. Cela permet l'expression équimolaire de Bcl-xL fusionné à la GFP avec la protéine BH3-Only Bad-ER qui ne se trouve active que lors de l'ajout d'un traitement 4-hydroxytamoxifène (4-OHT). Les cellules ont été transfectées avec les plasmides codant mCherry-E2F1 ou son contrôle mCherry, condition à laquelle, est ajouté ou non l'OHT. La mesure de la mobilité mitochondriale de Bcl-xL a été effectuée par imagerie sur les cellules vivantes ayant reçues les plasmides mCherry ou mCherry-E2F1 (**Figure 70A**). Une zone de FRAP a été placée au niveau d'une région enrichie en Bcl-xL et a été soumise pour une durée de 10 msec à une exposition avec le laser à puissance maximale. Cela permet de « bleacher », c'est-à-dire d'éteindre la fluorescence verte de GFP-Bcl-xL contenue dans la zone de FRAP. Une acquisition d'images toutes les 5 sec pendant 3 minutes a été ensuite réalisée sur

chaque cellule ainsi « bleachée ». Un traitement des images effectué sur le logiciel FIJI permet de récupérer à chaque temps de mesure l'intensité de fluorescence présente dans la zone de FRAP. L'intensité de fluorescence mesurée avant FRAP constitue le niveau 100% de fluorescence dans une cellule donnée et l'ensemble des valeurs de fluorescence aux autres temps de mesure est normalisé par rapport à celle-ci. Le profil classique de fluorescence ainsi obtenu correspond à une intensité initiale de fluorescence à 100% qui chute brutalement au moment du « bleaching » à des valeurs d'environ 15~30% puis ré-augmente au cours du temps d'acquisition. Ce recouvrement de la fluorescence au sein de la zone de FRAP correspond à la présence de nouvelles molécules GFP-Bcl-xL qui se sont déplacées d'une zone adjacente à la zone de mesure. Cela reflète donc directement la mobilité de Bcl-xL dans les cellules. Des images représentatives de l'expérience décrite ci-dessus sont visibles sur la **Figure 70A**. Les MEFs transfectés avec mCherry, constituent notre condition de référence pour la mobilité de Bcl-xL. La première image représente le niveau maximal de fluorescence GFP avant « bleach ». L'image qui suit à 5 secondes d'intervalle correspond à la fluorescence extrêmement faible restante après « bleach » dans la zone de FRAP. Néanmoins un recouvrement très rapide et très important de la fluorescence est observé pour cette condition référence car à 50 sec (3^{ème} image), la fluorescence semble avoir rejoint des intensités semblables à celles précédentes le FRAP. La condition mCherry + OHT nous sert de point de comparaison avec E2F1 afin d'évaluer si un interactant de forte affinité de Bcl-xL peut moduler sa mobilité intracellulaire. Comme l'indique les images, le recouvrement de fluorescence semble fortement diminué pour ces deux conditions. Afin d'extraire des informations quantitatives, entre 10 et 40 cellules sont ainsi analysées dans chaque condition et l'expérience a été reconduite à trois reprises de façon indépendante ce qui permet d'obtenir des courbes de recouvrement de fluorescence à partir du moment de « bleaching ». Le paramètre YMax issus des courbes est présenté sur les histogrammes associés ; il correspond à l'intensité maximale de fluorescence mesurée au niveau du plateau des courbes de recouvrement de fluorescence (**Figure 70B**). Dans la condition référence mCherry, environ 70% de la fluorescence sont retrouvés tandis que la condition mCherry-E2F1 ne permet de retrouver que 50% de la fluorescence initiale dans la zone de FRAP. Enfin mCherry + OHT, induisant la stabilisation de Bad, présente un effet plus drastique sur le niveau de fluorescence recouvert car ce dernier n'excède pas 30%. Premièrement, nous remarquerons que dans la condition contrôle les niveaux de fluorescence ne regagnent pas les valeurs initiales à 100%. Cela s'explique du fait que la protéine Bcl-xL présente au sein des cellules une fraction dite immobile. Ainsi environ 30% de fraction immobile sont mesurés correspondant à un pool de

protéine Bcl-xL intracellulaire non mobile. Deuxièmement, la présence en excès d'E2F1 ou Bad dans les cellules diminue le niveau de fluorescence recouvré, c'est-à-dire augmente la fraction de protéine Bcl-xL immobile. Ces résultats suggèrent que les interactions de Bcl-xL avec E2F1 ou Bad interfèrent avec la mobilité de Bcl-xL. L'effet de Bad sur la mobilité de Bcl-xL fait actuellement l'objet d'une publication en préparation dans l'équipe d'Andrew Gilmore.



La lignée MCF-7, dans laquelle il a notamment été mis en évidence l'interaction E2F1 – Bcl-xL ainsi que la localisation mitochondriale d'E2F1 a été utilisée pour reconduire les expériences de FRAP décrites ci-dessus. Notre laboratoire disposait d'un modèle d'expression stable de YFPBcl-xL dans cette lignée tumorale. Ces cellules ont donc été transfectées avec les plasmides codant mCherry-E2F1, mCherry-Bad ou le contrôle mCherry et soumises 16h après à l'expérience de FRAP (**Figure 70C**). Les courbes de fluorescence post-FRAP présentent un profil semblable à celles

obtenues dans les MEFs. Un recouvrement de fluorescence atteignant les 76% est détecté dans la condition contrôle mCherry tandis qu'il est de 60% avec mCherry-E2F1 et ne dépasse pas les 45% dans la condition mCherry-Bad. Dans cette lignée, la fraction immobile de Bcl-xL est donc de 24%. E2F1 est responsable d'une augmentation de la fraction immobile car 40% des protéines Bcl-xL ne semblent plus en mesure de se déplacer librement. Le BH3-Only Bad présente un effet similaire à E2F1 mais davantage accentué car ce sont là 55% des protéines Bcl-xL qui ne sont plus mobiles. L'ensemble de ces données indique qu'E2F1 comme Bad sont tous deux en mesure de diminuer la mobilité de Bcl-xL. Ainsi l'interaction de Bcl-xL avec ces partenaires restreint sa mobilité augmentant donc la fraction de protéine Bcl-xL immobile au sein des cellules.

Etant donné qu'E2F1 altère la capacité de Bcl-xL à naviguer librement au sein des cellules, la question s'est posée de savoir si un tel effet pouvait également être observé avec la protéine anti-apoptotique Mcl-1 car des complexes avec E2F1 ont été détectés au sein des cellules (**Figure 59**). La lignée MEFs parentale a été co-transfectée avec les plasmides codant mCherry-E2F1, mCherry-Noxa ou le contrôle mCherry avec celui codant GFP-Mcl-1 à un ratio équimolaire. L'expérience de FRAP a été réalisée selon la même procédure que celle mentionnée précédemment, 16h après transfection (**Figure 70D**). De façon similaire à Bcl-xL, un recouvrement de fluorescence à des valeurs de 70% est observé dans la condition contrôle. Dans une démarche identique à celle effectuée pour Bcl-xL, la protéine BH3-Only Noxa nous sert ici de contrôle positif d'interaction avec Mcl-1 afin de déterminer ses effets sur sa mobilité et de les comparer à ceux obtenus en présence d'E2F1. Comme l'indique le graphique, les courbes de recouvrement de fluorescence pour ces deux conditions se superposent en partie, ce qui se reflète sur les valeurs de YMax correspondantes. En effet, les protéines E2F1 et Noxa induisent toutes deux une diminution de la YMax à des valeurs d'environ 60% chacune. C'est-à-dire que la fraction immobile de protéines Mcl-1, initialement de 30%, se retrouve augmentée à 40%. Ces résultats indiquent, qu'à l'instar de l'action qu'E2F1 exerce sur Bcl-xL, un effet semblable est visible avec la protéine anti-apoptotique Mcl-1. Ici également, une protéine BH3-Only : Noxa module la mobilité de sa contrepartie anti-apoptotique.

Les données produites par ces différentes expériences de FRAP indiquent d'une part que des partenaires connus de Bcl-xL et Mcl-1 modifient la capacité des protéines anti-apoptotiques à se mouvoir dans les cellules. D'autre part, ces effets ne s'appliquent pas uniquement à des interactions entre membres anti-apoptotiques et BH3-Only pro-apoptotiques car E2F1 est

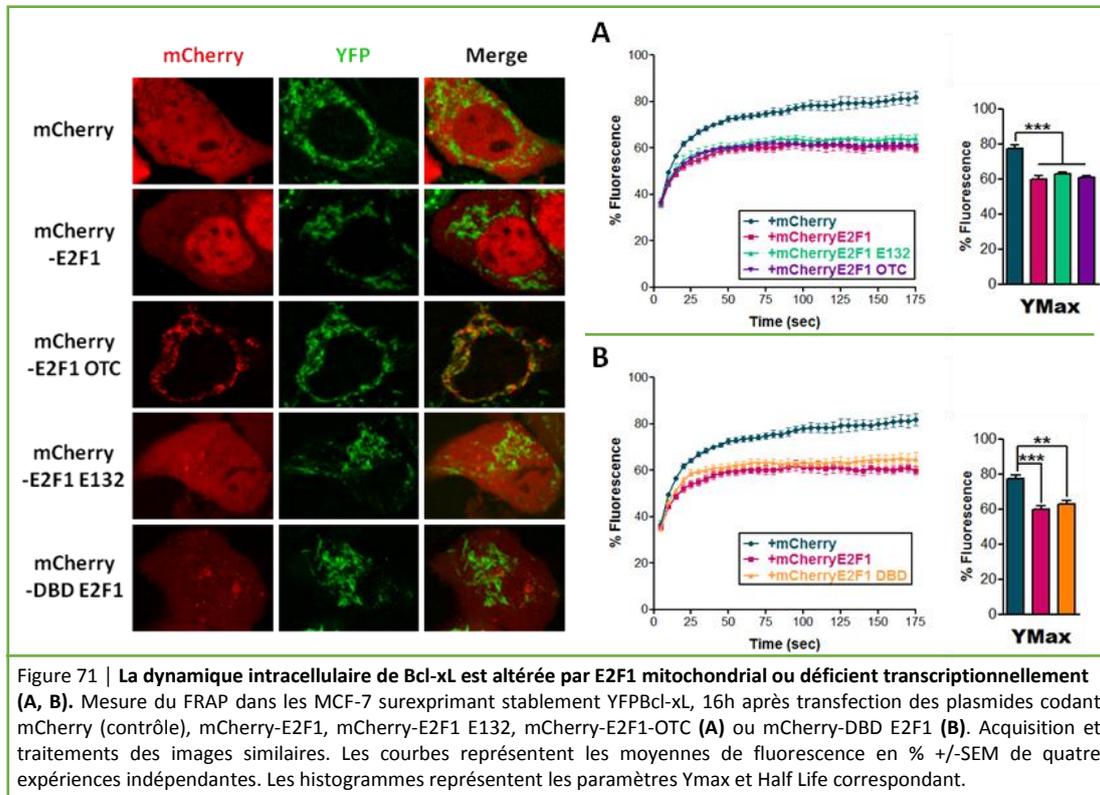
également en mesure de moduler la mobilité des protéines Bcl-xL comme Mcl-1. Ainsi, cela ne se restreint à un mécanisme d'interaction « poche hydrophobe – domaine BH3 ».

b. La régulation de la mobilité de Bcl-xL par E2F1 se fait indépendamment de ses fonctions transcriptionnelles

Nos expériences précédentes indiquent qu'E2F1 mais également les protéines BH3-Only peuvent réguler négativement la mobilité des protéines anti-apoptotiques. Or nous avons utilisé en première intention la forme sauvage d'E2F1 qui possède l'intégralité de ses fonctions transcriptionnelles. Il ne peut donc être exclu un effet indirect d'E2F1 sur la mobilité de Bcl-xL, suite à son activation transcriptionnelle de gènes codant les protéines BH3-Only. Afin d'éclaircir ce point, des expériences semblables à celles décrites ci-dessus ont été reconduites avec différentes protéines d'E2F1 dépourvues de toute activité transcriptionnelle fonctionnelle.

Dans un premier temps, nous avons analysé le comportement de la forme mitochondriale d'E2F1 sur la mobilité de Bcl-xL. La lignée MCF-7, surexprimant stablement YFPBcl-xL, a été soumise à un FRAP, 16h après transfection des plasmides codant mCherry-E2F1, mCherry-E2F1-OTC, mCherry-E2F1 E132 ou le contrôle mCherry. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 71A**. Dans la condition contrôle, 77% de la fluorescence « pré-bleach » sont restaurés ce qui équivaut à une fraction immobile basale de protéines Bcl-xL de 23% dans les cellules. Comme attendu, la protéine E2F1 réduit significativement la fraction mobile à des valeurs proches de 60%. La fraction immobile de protéine Bcl-xL est donc augmentée passant de 23% à 40% environ. Le ciblage mitochondrial d'E2F1 donne lieu à une courbe de recouvrement de fluorescence similaire en très grande partie à celle obtenue avec E2F1 sauvage. En effet les valeurs de YMax sont quasiment identiques entre ces deux conditions : 61% pour E2F1-OTC vs 60% pour E2F1. Nos résultats indiquent donc qu'E2F1, même ciblé aux mitochondries et dont les fonctions transcriptionnelles sont presque inexistantes régule négativement la mobilité de Bcl-xL. En revanche le ciblage directement aux mitochondries n'augmente pas davantage l'effet d'E2F1 sur la mobilité de Bcl-xL. Il est possible que cela soit dû à une différence d'expression entre les deux protéines E2F1 et E2F1-OTC comme nous l'avons précédemment observé (**Figure 50A**) ou à l'absence d'induction transcriptionnelle des BH3-Only. La courbe de recouvrement d'E2F1 E132 est relativement proche de celle d'E2F1. Une diminution de l'intensité maximale de fluorescence recouvrée est observée avec ce mutant d'E2F1. En effet, la valeur de YMax est de 63% comparée au contrôle mCherry (77%). Par conséquent la fraction immobile de protéine Bcl-xL est également augmentée avec la protéine E2F1 E132 passant de 23%

en condition basale à environ 37%. Ainsi nos données indiquent qu'E2F1 ne requiert pas une activité transcriptionnelle fonctionnelle pour moduler la mobilité de Bcl-xL.



Enfin pour clore notre étude de la régulation de la mobilité de Bcl-xL par E2F1, nous avons souhaité déterminer au regard de nos travaux, si le domaine de liaison à l'ADN d'E2F1 était suffisant pour reproduire ses effets. Pour cela les MCF-7 YFPBcl-xL ont été transfectedées avec mCherry-DBD E2F1 et analysées 16h après par imagerie lors de l'expérience de FRAP. Les résultats ainsi obtenus sont comparés à la condition contrôle mCherry et à la forme entière d'E2F1 (Figure 71B). La courbe de recouvrement de fluorescence de la condition mCherry-DBD E2F1 est similaire à celle d'E2F1. En effet, les valeurs de YMax sont extrêmement proches car mCherry-DBD E2F1 induit 63% de recouvrement de fluorescence contre 60% pour mCherry-E2F1, comparé au contrôle mCherry à 77%. Ainsi mCherry-DBD E2F1 diminue significativement le taux de recouvrement de fluorescence comparé à la condition contrôle. Cela signifie que le DBD seul d'E2F1 est suffisant pour augmenter de façon conséquente la fraction immobile de Bcl-xL au même titre que ne le fait la forme entière d'E2F1.

L'ensemble de nos résultats indique qu'E2F1 régule la mobilité des protéines anti-apoptiques Bcl-xL et Mcl-1, sans que cela ne requiert ses fonctions transcriptionnelles. Les BH3-Only Bad et Noxa exercent également cette régulation de la mobilité de Bcl-xL et Mcl-1, respectivement.

c. Localisation, mobilité et fonction anti-apoptotique de Bcl-xL sont autant de paramètres étroitement liés

Nos travaux mettent en évidence une régulation de la mobilité des protéines anti-apoptotiques par le facteur de transcription E2F1 et ce même en absence de toute activité transcriptionnelle fonctionnelle. Les travaux actuels du Pr Andrew Gilmore mettent en évidence des effets semblables avec les protéines BH3-Only (communication personnelle), comme nous l'avons également observé avec Bad et Noxa. La question se pose de savoir si ces effets, *a priori* conséquence de l'interaction avec les protéines anti-apoptotiques, perturbent leurs fonctions et constituerait donc un mécanisme à part entière régulant leur fonction et permettant de promouvoir la mort des cellules. A quel point la mobilité des protéines anti-apoptotiques et leurs localisations sont-elles importantes pour leurs fonctions inhibitrices de la MOMP ? Afin d'investiguer cette nouvelle interrogation, différents mutants de Bcl-xL dont la mobilité ou la localisation est modifiée ont été utilisés pour évaluer leurs potentiels anti-apoptotiques et/ou leurs capacités à interagir avec les protéines Bak ou E2F1.

En premier lieu, une mesure de la capacité de Bcl-xL à interagir avec E2F1 ou Bak lorsque sa localisation est modifiée a été réalisée par BRET dans les lignées HeLa ou MCF-7 respectivement. Une quantité fixe de plasmides codant RLucE2F1 ou RLuc Bak a été transfectée dans les cellules simultanément à des quantités croissantes de plasmides codant YFPBcl-xL ou YFPBcl-xL A221R. Cette mutation ponctuelle, située au sein du domaine transmembranaire de Bcl-xL, suffit à abroger sa localisation mitochondriale et à le rendre exclusivement cytoplasmique (communication personnelle de Stéphen Manon). Les résultats sont présentés **Figure 72A**. Des courbes de saturation sont obtenues avec les deux couples RLucE2F1 – YFPBcl-xL ou RLucE2F1 – YFPBcl-xL A221R indiquant que la modification de localisation de Bcl-xL n'affecte aucunement la capacité d'E2F1 et Bcl-xL à interagir ensemble. D'ailleurs, les paramètres Bmax ou Bret50 ne semblent pas varier entre les deux conditions étudiées. Ces données indiquent qu'E2F1 peut former des complexes avec Bcl-xL au cytoplasme. Cela contraste avec l'effecteur Bak car, bien qu'une courbe de saturation soit obtenue entre RLucBak et YFPBcl-xL A221R, le niveau de saturation diffère grandement de la condition contrôle RLucBak – YFPBcl-xL, ce qui se traduit par une différence significative du Bmax sans pour autant qu'il n'y ait de variation du Bret50. Il est possible que la localisation cytoplasmique

de Bcl-xL limite le nombre de complexes Bak – Bcl-xL se formant sans modifier l’affinité des deux partenaires ou que le transfert d’énergie s’effectue mieux aux membranes. Ces données suggèrent que la capacité de Bcl-xL à lier des protéines pro-apoptotiques mitochondriales peut différer selon sa localisation, ce qui est d’ailleurs retrouvé dans l’étude de Jessie Pécot et d’Andrews (Pécot et al., *in press* ; Aranovich et al., 2012).

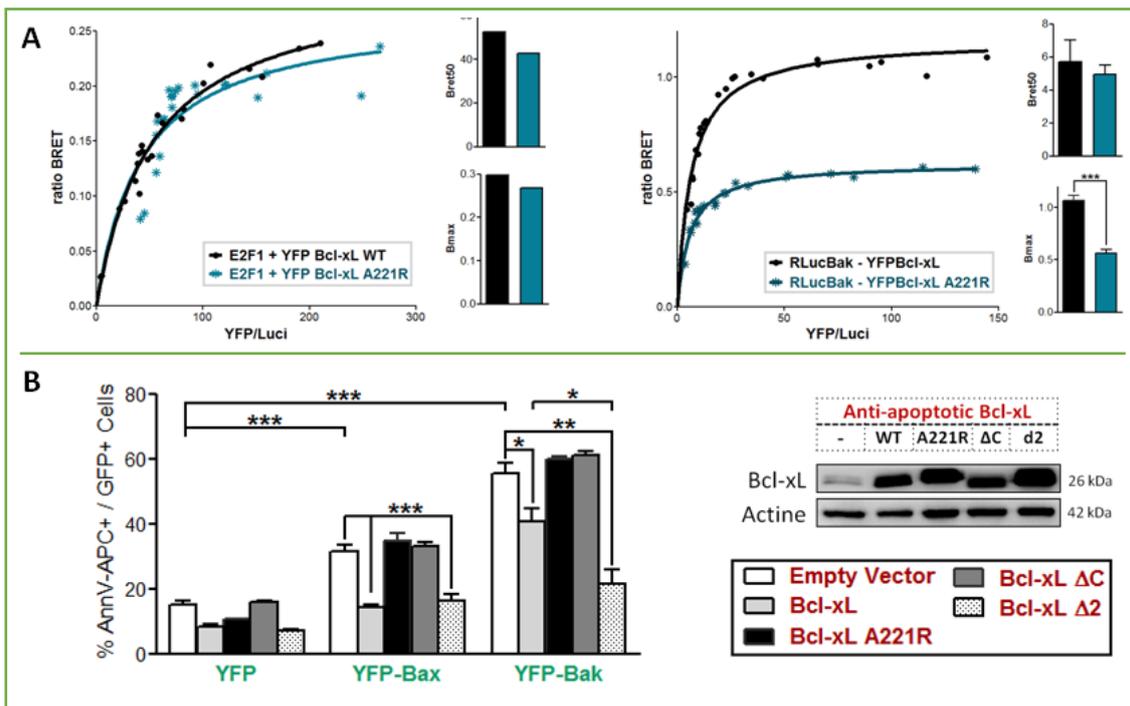


Figure 72 | **La mobilité et la localisation de Bcl-xL jouent un rôle clé dans son potentiel anti-apoptotique**
(A). Mesure BRET des interactions protéiques dans les lignées HeLa (gauche) ou MCF-7 (droite) co-transfectées avec 50ng ou 100ng de plasmides codant RLucE2F1 ou RLucBak respectivement et des quantités croissantes de plasmides eYFPBcl-xL WT ou sa forme cytosolique eYFPBcl-xL A221R. Les paramètres BRET max (Bmax) et BRET50 présentés sur les histogrammes proviennent d’une (gauche) ou trois (droite) expériences indépendantes. Les courbes de saturation sont représentatives de l’une d’elles. **(B).** Analyse de la mort cellulaire par marquage AnnexinV-APC en cytométrie en flux, 48h après co-transfection de la lignée Saos-2 avec les plasmides codant YFP-Bax, YFP-Bak ou le contrôle YFP et ceux codant Bcl-xL WT ou ses mutants: Bcl-xL A221R, Bcl-xL ΔC ou Bcl-xL Δ2 (ratio 1:3). Les moyennes +/-SEM issues d’au moins quatre expériences indépendantes sont représentées. Analyse Western Blot des Saos-2, 24h après transfection des plasmides codant Bcl-xL ou ses mutants.

Dans la poursuite de notre démarche, l’évaluation du potentiel anti-apoptotique de Bcl-xL selon sa localisation ou mobilité a été réalisée comme suit. La lignée Saos-2 a été co-transfectée avec les plasmides codant les effecteurs Bax et Bak fusionnés à la YFP, ou le contrôle YFP lui-même avec ceux codant Bcl-xL ou ses mutants. Deux protéines de Bcl-xL, présentant une localisation cytoplasmique, ont été utilisées dans ce test de mort : Bcl-xL A221R et Bcl-xL ΔC₍₁₋₂₁₂₎, ce dernier étant délété de l’ensemble du domaine transmembranaire et décrit comme déficient pour retro-transloquer Bax (Todt et al., 2013). La délétion des deux derniers acides aminés de Bcl-xL (Bcl-xL Δ2₍₁₋₂₃₁₎) entraîne une augmentation de sa mobilité cellulaire (Todt et al., 2013). L’apoptose a été analysée dans les cellules YFP+, 48h après la surexpression conjointe des effecteurs avec ou non les

protéines Bcl-xL mentionnées ci-dessus (**Figure 72B**). L'analyse Western Blot indique que l'expression des différentes protéines Bcl-xL est similaire. Les effecteurs Bax et Bak induisent l'apoptose des cellules avec des niveaux de 32% et 55%, respectivement. La protéine Bcl-xL sauvage abroge la mort cellulaire initiée par Bax et diminue celle induite par Bak mais de façon moins efficace. Ni Bcl-xL A221R, ni Bcl-xL ΔC ne sont en mesure d'inhiber la mort induite par les deux effecteurs. En revanche, la protéine Bcl-xL $\Delta 2$ protège les cellules de la mort induite par Bax ou Bak. De manière intéressante, son effet anti-apoptotique sur la mort dépendante de Bak est nettement plus important que celui de Bcl-xL. Ces résultats indiquent, d'une part, que la localisation mitochondriale de Bcl-xL est nécessaire à ses fonctions anti-apoptotiques pour contrecarrer l'apoptose induite directement par la surexpression de Bax ou Bak. Cela est en accord avec les données de BRET obtenues précédemment indiquant une capacité réduite de Bcl-xL à interagir avec Bak lorsqu'il est cytoplasmique. D'autre part, la mobilité augmentée de Bcl-xL semble accroître sa faculté à inhiber la mort induite par Bak, soulignant son importance dans les fonctions anti-apoptotiques de la protéine. La localisation comme la mobilité de Bcl-xL sont donc des paramètres essentiels à son potentiel anti-apoptotique. Ainsi la modulation de ces deux propriétés constitue un moyen de régulation des fonctions anti-apoptotiques de Bcl-xL.

Selon le stimulus apoptotique, la localisation et la mobilité de Bcl-xL peuvent intervenir dans ses fonctions anti-apoptotiques. La modulation de ces propriétés peut être déterminante notamment pour inhiber les effecteurs Bax et Bak. Etant donné, que nos précédents résultats indiquent qu'E2F1 induit une mort dépendante de Bak et régule négativement la mobilité de Bcl-xL (et Mcl-1), nous émettons l'hypothèse qu'E2F1 exercerait son action pro-apoptotique non transcriptionnelle en diminuant la mobilité de Bcl-xL, l'empêchant de bloquer l'activation de Bak, la MOMP sub-séquent et l'apoptose qui en découle.

Discussion

I. Régulation de l'apoptose par E2F1 en réponse à un stress génotoxique

Lorsque les cellules sont soumises à un stress génotoxique, des dommages à l'ADN surviennent, conduisant à l'activation de kinases de stress telles que ATM, ATR ou Chk2. Par leur action ces enzymes participent à stabiliser le facteur de transcription E2F1 en induisant notamment des phosphorylations sur les résidus sérine 31 et 364 de la protéine (Carcagno et al., 2009; Stevens et al., 2003). De plus, les acétylations sur les résidus lysines 117, 120 et 125 par les enzymes p300 et PCAF participent à augmenter le niveau intracellulaire de protéine E2F1 (Galbiati et al., 2005; Ianari et al., 2004). En accord avec ces données, nous observons une accumulation d'E2F1 en réponse à un traitement étoposide. Une fois stabilisé dans les cellules, E2F1 peut induire une réponse apoptotique et/ou la réparation de dommages à l'ADN. La majorité des études décrivant ces fonctions indiquent une induction de gènes cibles intervenant directement dans ces voies de signalisation (Stevens et La Thangue, 2004). Nous observons en effet une élévation de l'expression des gènes codant les protéines BH3-Only : Bim, Puma, Noxa ainsi que des protéines des machineries de réparation MMR (*Mismatch Repair*) : Msh2 ou impliquées dans l'action du système MRN (*Mre11-Rad50-NBS1*) : Rad51. Par ailleurs, E2F1 induit l'expression du facteur de transcription p73, homologue de p53, capable de stimuler de nombreux gènes cibles de p53 (Irwin et al., 2000; Jost et al., 1997). Notre analyse des gènes cibles pouvant être induits par E2F1 en réponse à un stress génotoxique est loin d'être exhaustive, il est donc très probable que d'autres cibles soient induites. Il est actuellement bien décrit qu'E2F1 est susceptible de promouvoir l'apoptose des cellules par une voie dépendante de p53 et une qui ne l'est pas. Etant donné qu'E2F1 partage un certains nombres de gènes cibles avec p53, nous avons choisi un modèle cellulaire déficient pour ce facteur de transcription afin d'éviter les confusions quant aux effets observés, pour savoir s'ils sont dus à E2F1 ou p53. C'est pourquoi nous avons utilisé la lignée d'ostéosarcome : Saos-2, déficiente pour p53, dans notre étude. Bien sûr il ne peut être exclu qu'un autre facteur de transcription soit induit en réponse à un stress et stimule une partie des cibles d'E2F1. Les gènes codant Bax, Noxa et Bim sont notamment sujets à une régulation par le facteur de transcription c-Myc (Campane et al., 2011; Mitchell et al., 2000; Nikiforov et al., 2007; Wirth et al., 2014). Il a d'ailleurs été observé une apoptose induite par c-Myc dans la lignée Saos-2, qui implique une induction du gène codant p73 (Zaika et al., 2001). Cependant, nos données indiquent que la mort induite par l'étoposide dans notre modèle cellulaire requiert la protéine E2F1.

II. Régulation de l'apoptose par surexpression d'E2F1 en absence de stress génotoxique

1. Modèle d'étude de la mort induite par E2F1

Il est à présent bien admis que les niveaux intracellulaires d'E2F1 sont déterminants pour définir son action dans les cellules. L'une des principales conséquences d'un stress génotoxique et des modifications post-traductionnelles subséquentes consiste en une stabilisation du facteur de transcription. Il apparaît donc que le dépassement d'un certain seuil de protéine E2F1 dans les cellules provoque une réponse pro-apoptotique. C'est pourquoi la majorité des études analysant les fonctions pro-apoptotiques d'E2F1 a fait usage de système de surexpression de la protéine. Quelques exemples peuvent être cités comme la transfection transitoire de plasmides codant E2F1 (Bell et al., 2006; Hsieh et al., 1997; Phillips et al., 1997) ou l'utilisation d'adénovirus exprimant E2F1 (Hallstrom and Nevins, 2006; Hao et al., 2012; Zhao et al., 2005), notamment dans la lignée Saos-2. Des systèmes de surexpression stable sont également retrouvés, comme l'utilisation d'un système Tet-On, permettant une expression inductible d'E2F1 après ajout de doxycycline (Merdzhanova et al., 2008) ou le modèle de surexpression stable de la protéine E2F1-ER, qui reste à ce jour le système le plus fréquemment utilisé. Dans ce cas la protéine E2F1 est fusionnée au récepteur des oestrogènes, se traduisant par une localisation cytoplasmique ; l'ajout de 4-hydroxytamoxifène (4-OHT) permet sa localisation au noyau et ainsi l'induction de gènes pro-apoptotiques (Stanelle et al., 2002). Dans notre étude nous avons choisi d'utiliser un système de transfection transitoire de la protéine E2F1 fusionnée à la GFP, permettant un suivi des cellules transfectées par cytométrie en flux.

2. Implication de l'activité transcriptionnelle d'E2F1 dans la mort cellulaire

a. E2F1 induit la transcription de gènes cibles pro-apoptotiques

Nos données indiquent que la protéine de fusion : GFP-E2F1 conserve sa fonctionnalité transcriptionnelle, car une induction des gènes codant les BH3-Only : Puma, Bim et Hrk ainsi que la protéine p73 est observée. Dans la lignée Saos-2, la surexpression de GFP-E2F1 ne permet pas d'augmenter l'expression de l'ARNm Noxa. La régulation de la transcription du gène codant Noxa par E2F1 a été initialement décrite par des approches de gènes rapporteurs ou RT-PCR dans d'autres lignées (NIH3T3 et MEFs) (Hershko et Ginsberg, 2004), mais n'a à ce jour jamais été démontrée dans la lignée Saos-2. Par ailleurs, aucune variation d'expression de Bid et Bak n'a été

observée, bien qu'une induction (faible) ait été décrite par une approche semi-quantitative de RT-PCR dans un modèle d'expression stable d'E2F1-ER dans les Saos-2 (Stanelle et al., 2002). Dans cette étude, l'ensemble des cellules analysées exprime E2F1, contrairement à notre analyse de qPCR qui est réalisée sur l'ensemble de la population cellulaire, incluant les cellules non transfectées, ce qui pourrait expliquer ces différences. L'expression de GFP-E2F1 conduit à une faible induction de la cycline A2, contrairement à ce que nous observions sous stress génotoxique. Dans notre modèle, les éventuelles modifications post-traductionnelles d'E2F1 pouvant s'être produites suite au traitement étoposide ne sont reproduites. Or ces dernières favorisent la spécificité d'E2F1 envers ses gènes cibles pro-apoptotiques, ce qui pourrait expliquer ces différences (Pediconi et al., 2003; Real et al., 2010). L'expression de Bcl-2 est induite par GFP-E2F1. La modulation de l'expression de cet anti-apoptotique par E2F1 a déjà été observée mais les effets sont assez controversés. En effet, certains décrivent une diminution de l'expression de Bcl-2 au niveau protéique (Western Blot) et/ou ARNm (Northern Blot) lors de la surexpression d'E2F1 dans des lignées myéloïdes ou infection par un adénovirus exprimant E2F1 (Ad-E2F1) dans des lignées de cancer de l'œsophage (Eischen et al., 2001; Yang et al., 2000). A l'inverse, d'autres observent une induction de Bcl-2 (au niveau protéique et ARNm, par les mêmes approches), retrouvée en gène rapporteur dans des lignées de glioblastome infectées par Ad-E2F1 ou de cancer de la prostate transfectées avec E2F1 (Gomez-Manzano et al., 2001; Huang et al., 2004). Il semble donc que, selon le contexte cellulaire, les effets d'E2F1 sur l'expression de Bcl-2 divergent. Par ailleurs, aucune variation de l'expression des ARNm codant Mcl-1 ou Bcl-xL n'est observée dans notre modèle d'étude. Une diminution du niveau protéique de ces deux anti-apoptotiques a été observée dans différents types de cellules infectées par Ad-E2F1 (Croxtton et al., 2002; Dong et al., 1999; Yang et al., 2000). De façon plus précise, une diminution des niveaux d'ARNm de Mcl-1 a été détectée dans les NIH3T3 infectés par Ad-E2F1 et un mécanisme de répression transcriptionnelle du promoteur du gène codant Mcl-1 par E2F1 a été démontré par une approche de gène rapporteur (Croxtton et al., 2002). Le système de surexpression, les contextes cellulaires et approches utilisées sont différents de notre modèle ce qui pourrait expliquer ces résultats divergents. Parmi les gènes cibles analysés, il en ressort principalement qu'une induction des cibles pro-apoptotiques se produit lors de l'expression de la protéine GFP-E2F1 dans la lignée Saos-2.

b. E2F1 induit une apoptose dépendante des caspases associée à la MOMP

En accord avec d'autres études utilisant un système de surexpression transitoire d'E2F1 dans les Saos-2, nos résultats indiquent que la protéine exerce une action pro-apoptotique. En revanche, les niveaux de mort détectés dans notre étude sont supérieurs à ceux décrits dans la littérature (50% versus 15 à 25%) (Bell et al., 2006; Hsieh et al., 1997; Phillips et al., 1997). Ces différences peuvent être dues à des approches d'analyses distinctes. En effet, dans notre étude, la mort cellulaire est évaluée par le pourcentage de cellules marquées par l'AnnexinV-APC au sein de la population de cellules transfectées par GFP-E2F1. Les précédents travaux auxquels nous nous référons utilisent un marquage à l'iodure de propidium pour mesurer le pourcentage de cellules en Sub-G₁ parmi les cellules transfectées par le CD-20, marqueur utilisé comme contrôle d'efficacité de transfection. Par ailleurs, les niveaux d'expression de protéine E2F1 en transfection transitoire peuvent être variables selon les quantités de plasmides et agents de transfection utilisés. Nos données mettent en évidence un clivage de la caspase 3 dans les cellules exprimant GFP-E2F1. De plus, l'activité des caspases s'avère indispensable dans la mort induite par E2F1, car celle-ci est abrogée par un traitement avec l'inhibiteur de caspase : Q-VD-OPh. Grâce à la lignée MDA-MB-231, également sensible à l'apoptose induite par E2F1, nous avons pu mettre en évidence le déclenchement d'une MOMP dans une partie des cellules exprimant GFP-E2F1, en utilisant le système Omi-mCherry en microscopie. Ainsi même en absence de stress génotoxique, l'expression d'E2F1 suffit à induire l'apoptose des cellules tumorales Saos-2 et MDA-MB-231.

c. E2F1 induit une apoptose en absence de ses fonctions transcriptionnelles

E2F1 est une protéine versatile dont les fonctions transcriptionnelles lui permettent de réguler la progression du cycle cellulaire comme d'induire l'apoptose. L'étude de Phillips a été la première à mettre en évidence des distinctions entre ces fonctions. Pour cela, une comparaison des effets d'E2F1 à ceux de trois mutants déficients pour la transcription : E2F1₍₁₋₃₇₄₎, E2F1₍₁₋₂₈₄₎ et E2F1 E132, a été effectuée sur des tests de mesure du cycle cellulaire ou de mort cellulaire. Tandis que l'activité transcriptionnelle d'E2F1 est requise dans la progression du cycle cellulaire, la voie d'apoptose induite par E2F1 peut se déclencher en absence de la transactivation de gènes cibles, mais requiert une activité de liaison à l'ADN dont est dépourvu E2F1 E132 (Phillips et al., 1997). Ces résultats ont été confirmés dans l'étude de (Hsieh et al., 1997). Dans notre étude, nous faisons également usage d'une protéine E2F1 tronquée dans sa région C-terminale : E2F1 Δ C₍₁₋₂₁₄₎. En accord avec les données de Phillips et Hsieh, nous observons une apoptose induite par la protéine E2F1 Δ C₍₁₋₂₁₄₎ dans la lignée Saos-2 ainsi que dans d'autres lignées tumorales (MDA-MB-231, HeLa et

HCT116p53^{-/-}). En revanche, contrairement aux études précédentes, nos résultats indiquent qu'E2F1 E132 présente également un potentiel pro-apoptotique dans nos lignées, plus faible que pour E2F1 ou E2F1 $\Delta C_{(1-214)}$. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les niveaux de mort détectés, après surexpression d'E2F1 dans les Saos-2, sont extrêmement faibles lorsqu'ils sont évalués par le contenu en ADN, comme présenté dans ces études. Il est donc très probable, que par cette approche, les effets apoptotiques d'E2F1 E132 se trouvent en dessous du seuil de détection. En outre, bien qu'E2F1₍₁₋₃₇₄₎ soit dépourvu de son domaine de transactivation, il conserve la capacité de moduler la transactivation de promoteurs cibles, car des quantités croissantes de la protéine inhibe la transactivation d'un gène rapporteur induite par la surexpression d'E2F1 (Phillips et al., 1997). Une activité de répression transcriptionnelle de ce mutant a été observée au niveau du promoteur du gène codant Mcl-1 par gène rapporteur (Croxtton et al., 2002). De plus, une activité de dérégulation transcriptionnelle du gène codant Hrk a également été décrite par RT-qPCR et Western Blot, notamment dans la lignée Saos-2. Elle implique une diminution de la liaison du complexe répresseur DREAM au promoteur du gène concerné et semble en partie responsable du potentiel pro-apoptotique d'E2F1₍₁₋₃₇₄₎ (Hao et al., 2012). Dans notre modèle, aucune variation du niveau d'ARNm Mcl-1 n'a été observée lors de la surexpression d'E2F1 $\Delta C_{(1-214)}$ (données non présentées). De plus, l'expression du gène codant Hrk n'est pas induite par ce mutant. Ainsi dans notre modèle d'étude, le mécanisme d'action pro-apoptotique d'E2F1 $\Delta C_{(1-214)}$ est indépendant d'une répression de Mcl-1 ou d'une dérégulation de Hrk. Néanmoins, il ne peut être exclu que le mutant exerce ces mécanismes d'action au niveau d'autres cibles qui n'ont pas été analysées ici. Par ailleurs, les protéines E2F1 $\Delta C_{(1-214)}$ et E2F1 E132 conservent un potentiel pro-apoptotique dans la lignée MDA-MB-231, et sont responsables de la survenue d'une MOMP dans le modèle Omi-mCherry. Nos résultats mettent en évidence un clivage de la caspase 3 ainsi que la nécessité de l'activité des caspases dans la mort induite par ces deux mutants. Ainsi l'ensemble de nos données indique qu'E2F1 conserve ses fonctions pro-apoptotiques en absence de son domaine de transactivation ou de la Marked Box, ainsi qu'en absence de sa capacité à lier l'ADN. En accord avec les travaux cités ci-dessus, E2F1 régule donc en partie l'apoptose par une voie non transcriptionnelle. Il est à noter que l'existence de fonctions pro-apoptotiques non transcriptionnelles de p53 ont également été mises en évidence par des approches similaires. En effet, une induction de l'apoptose a été observée après surexpression transitoire de protéines p53 inactives pour la transcription, tronquées ou présentant des mutations ponctuelles (Chipuk et al., 2003; Haupt et al., 1995).

III. Localisation mitochondriale d'E2F1 et fonctions apoptotiques associées

1. Identification d'une fraction de protéines E2F1 aux mitochondries

Au vu des fonctions apoptotiques non transcriptionnelles d'E2F1, la question d'un rôle exercé hors du compartiment nucléaire a été étudiée. La présence d'E2F1 au cytosol a déjà été reportée à plusieurs reprises, notamment par des approches de microscopie, mais s'avère plus faible que la localisation de la protéine au noyau (Ivanova et Dagnino, 2007; Ivanova et al., 2007). En accord avec ces travaux, nos données de microscopie et fractionnement cellulaire indiquent une localisation cytoplasmique d'E2F1. De façon plus spécifique, nous détectons la présence d'E2F1 au niveau du réseau mitochondrial, ce qui à ce jour n'a jamais été mis en évidence. L'étude de Hao n'a pas observé de colocalisation d'E2F1 aux mitochondries lors d'une analyse confocale dans une lignée de mélanome (Hao et al., 2012). Il est possible que le contexte cellulaire influe sur la localisation d'E2F1, car nous distinguons plus aisément une fluorescence cytoplasmique ponctuée de GFP-E2F1, semblant colocaliser avec le marquage mitotracker, dans la lignée HCT116 p53^{-/-} comparée à la lignée Saos-2. De plus, la localisation majoritairement nucléaire de la protéine E2F1 peut rendre difficile sa détection au cytoplasme et aux mitochondries par des approches de microscopie, du fait d'une trop forte fluorescence au noyau. Afin de palier à ce problème, nous avons analysé la localisation subcellulaire de la protéine endogène par des approches de fractionnement cellulaire. Nous avons observé une localisation constitutive d'E2F1 dans la fraction comprenant les mitochondries dans différentes lignées tumorales (Saos-2, HCT116 WT, MCF-7 et HeLa). Nos données font écho aux travaux mettant en évidence la présence des protéines nucléaires pRB et p53 aux mitochondries, également par le biais d'approches de fractionnement cellulaire (Hilgendorf et al., 2013; Marchenko et al., 2000). De plus, plusieurs autres cas de protéines nucléaires présentes au cytoplasme et/ou aux mitochondries ont été décrits dans la littérature, tels que Nur77, la nucléophosmine, les prohibitines ou la protéine FLASH. La présence de ces protéines en dehors du noyau implique un transport actif faisant appel à l'exportine Crm-1 (Lindenboim et al., 2011). Les travaux d'Ivanova décrivent un transport nucléocytoplasmique constitutif d'E2F1 dépendant de cette même protéine Crm-1 (Ivanova et al., 2007), qui a également été mis en évidence dans le cas de pRB (Jiao et al., 2006, 2008) et p53 (Freedman et Levine, 1998). Etant donné que les deux protéines E2F1 et pRB sont en trafic entre le noyau et le cytoplasme, une possibilité aurait été que la localisation mitochondriale d'E2F1 soit due à une interaction avec pRB. Cependant, nous observons la présence d'E2F1 aux fractions mitochondriales des lignées Saos-2 et

HeLa (pourvues d'une protéine pRB inactive et déficientes (Saos-2) ou presque (HeLa) pour p53) indiquant que pRB et p53 ne sont pas requis pour la présence d'E2F1 à ce compartiment.

La plupart des protéines nucléaires retrouvées aux mitochondries ne possèdent pas de séquence d'adressage classique à ce compartiment. Leur localisation mitochondriale peut être due à des interactions engagées avec des protéines mitochondriales ou résulter de modifications post-traductionnelles (Lindenboim et al., 2011). Par exemple, les interactions entre CREB et la protéine chaperonne mtHSP70 ainsi qu'entre Nur77 et Bcl-2 semblent responsables de leur présence aux mitochondries (Lee et al., 2005; Lin et al., 2004). Par ailleurs, la phosphorylation de Nur77 comme la mono-ubiquitination de p53 sont des exemples de modifications post-traductionnelles contribuant à l'adressage mitochondrial de ces protéines (Marchenko et al., 2007; Wang et al., 2009). Au niveau de nos fractionnements cellulaires, nous observons une bande de plus haut poids moléculaire au niveau des fractions mitochondriales soulevant la question d'une forme d'E2F1 modifiée post-traductionnellement. Il se trouve que l'export nucléaire d'E2F1 est sujet à des régulations par la kinase p38 β . En effet, des phosphorylations des résidus sérine 403 et thréonine 433 par cette kinase contribuent à la localisation cytoplasmique d'E2F1 (Ivanova et Dagnino, 2007; Ivanova et al., 2009). Il est donc possible que des phosphorylations et/ou d'autres modifications interviennent dans le ciblage mitochondrial d'E2F1. Un traitement phosphatase des fractions mitochondriales pourrait mettre en évidence d'éventuelles phosphorylations. Une approche par spectrométrie de masse permettrait une analyse plus large en vue de détecter d'éventuelles formes modifiées d'E2F1.

2. Régulation de l'apoptose par E2F1, directement ciblé aux mitochondries

Afin d'étudier le rôle exercé par E2F1 aux mitochondries, nous avons généré la protéine de fusion E2F1 OTC, où la séquence d'adressage de l'ornithine transcarbamylase permet un ciblage efficace de la protéine E2F1 aux mitochondries. Ce modèle d'étude a été sélectionné en nous inspirant des travaux réalisés sur l'analyse des fonctions mitochondriales de p53 et pRB (Hilgendorf et al., 2013; Marchenko et al., 2000). Une méthode alternative de ciblage de p53 grâce au domaine transmembranaire de Bcl-2 a également été utilisée par le groupe de Moll et conduit à des résultats similaires (Mihara et al., 2003). Cependant cette approche s'est avérée insuffisante pour cibler efficacement pRB aux mitochondries. Nous avons donc privilégié l'utilisation de la séquence d'adressage mitochondrial de l'OTC dans notre modèle. Parallèlement à la fusion de la séquence d'adressage de l'OTC, des mutations des séquences NLS d'import au noyau ont été effectuées pour les protéines p53 et pRB. Nous n'avons pas eu besoin de recourir à l'ajout de mutation dans le NLS

d'E2F1 OTC car nos données indiquent une localisation mitochondriale efficace de la protéine accompagnée d'une perte de sa capacité à transactiver des gènes cibles. A l'instar de p53 et pRB, le ciblage mitochondrial d'E2F1 est suffisant pour induire l'apoptose de différentes lignées tumorales (Saos-2, MDA-MB-231, HeLa et HCT116 p53^{-/-}), ainsi que le déclenchement de la MOMP et l'activation de la cascade des caspases. Nos travaux mettent donc en évidence un mécanisme inédit par lequel E2F1 effectue une régulation non transcriptionnelle de l'apoptose, notamment en exerçant directement ses fonctions pro-apoptotiques aux mitochondries.

Notre caractérisation de la mort induite par E2F1, ciblé ou non aux mitochondries, dans notre modèle cellulaire, indique une implication de la protéine effectrice Bak, *a contrario* de Bax. L'intervention simultanée des deux effecteurs n'est pas toujours patente, et peut varier selon les stimuli apoptotiques et les protéines intervenant en amont de l'activation de Bax et Bak. Un exemple d'apoptose dépendante de Bak fait intervenir la protéine Bcl-xS, qui permet une rupture des complexes Bak – VDAC2 qui maintiennent Bak inactif (Lindenboim et al., 2005; Plötz et al., 2012). Il se trouve que l'un des mécanismes par lequel E2F1 régule l'apoptose implique l'épissage alternatif de différentes protéines dont Bcl-xL, conduisant à la production de variants pro-apoptotiques tels que Bcl-xS. Cependant, les fonctions transcriptionnelles d'E2F1 sont requises pour induire l'expression du facteur d'épissage SC-35, responsable de cet effet (Merdzhanova et al., 2008). Ce mécanisme ne peut donc s'appliquer qu'à l'apoptose induite par E2F1 et non par sa forme ciblée aux mitochondries. Une mort dépendante de Bak est souvent observée suite à la dégradation de Mcl-1 pouvant être induite par des thérapies anti-tumorales (témozolomide, paclitaxel, resveratrol) (Gratas et al., 2014; Miller et al., 2013; Zhang et al., 2012). Cependant, nous n'observons aucune variation d'expression de Mcl-1 après surexpression d'E2F1, que ce soit au niveau ARNm comme indiqué par nos données de qPCR ou au niveau protéique (données non présentées). Donc la voie d'apoptose dépendante de Bak, induite par E2F1, ne met pas en jeu un mécanisme de dégradation de la protéine Mcl-1. Selon les BH3-Only impliqués dans l'initiation de la MOMP induite par E2F1 ou E2F1 mitochondrial, il peut y avoir une activation préférentielle de l'un des effecteurs. Par exemple, Bak est préférentiellement activé par les BH3-Only activateurs Puma et tBid (Lopez et al., 2016; Sarosiek et al., 2013a). Par ailleurs, seuls Bcl-xL et Mcl-1 inhibent Bak, ainsi l'intervention de Noxa peut favoriser l'activation de Bak grâce à la neutralisation spécifique de Mcl-1. Cependant, aucune variation de la mort induite par E2F1 aux mitochondries n'a été observée après déplétion de Puma ou Noxa (ainsi que Bim), suggérant soit une action redondante de plusieurs BH3-Only, soit l'absence d'implication de ces protéines. Il serait intéressant d'analyser

quels seraient les effets d'une déplétion de Bid sur l'apoptose induite par E2F1 car des stimuli générant une activation et un clivage de Bid sont particulièrement propices à la survenue d'une apoptose dépendante de Bak (Cartron et al., 2003; Guo et al., 2015).

IV. Enjeux de l'apoptose régulée par E2F1 directement aux mitochondries

1. Variation du pool E2F1 mitochondrial en réponse à un stress génotoxique

Nos données mettent en évidence d'une part la présence constitutive d'E2F1 aux mitochondries et d'autre part son action pro-apoptotique directement à ce compartiment. Etant donné que les fonctions apoptotiques d'E2F1 sont activées en réponse à un stress génotoxique, il nous a paru intéressant d'étudier les effets de tels stimuli sur la localisation mitochondriale d'E2F1. Suite à un stress génotoxique, la protéine E2F1 s'accumule au noyau et au cytoplasme. Nos analyses semi-quantitatives indiquent que la protéine semble également s'accumuler au niveau des mitochondries des cellules traitées. Nos résultats suggèrent qu'en réponse à des dommages à l'ADN, la voie d'apoptose non transcriptionnelle régulée par E2F1 directement aux mitochondries est stimulée, en parallèle de la voie d'apoptose transcriptionnelle régulée par E2F1 au noyau.

Par ailleurs, nous observons, une perte de la bande de plus haut poids moléculaire sous traitement dans la lignée Saos-2. Nous avons émis précédemment l'hypothèse que cette bande de plus haut poids moléculaire correspondrait à une forme d'E2F1 modifiée post-traductionnellement. En suivant ce raisonnement, l'apparition d'un stress génotoxique serait responsable du retrait de ses modifications post-traductionnelles. Tandis que plusieurs modifications post-traductionnelles d'E2F1 sont décrites pour favoriser ses fonctions apoptotiques certaines en revanche exercent une action inhibitrice et sont supprimées lors d'un stimulus apoptotique. C'est notamment le cas des méthylation ou NEDDylation du résidu lysine 185 de la protéine (Aoki et al., 2013; Kontaki et Talianidis, 2010). Dans le cas de p53, la déNEDDylation de la protéine favorise sa localisation cytoplasmique (Liu et Xirodimas, 2010). En accord avec cette étude, la protéine Jab-1, qui possède une activité de dé-NEDDylation, favorise la localisation cytoplasmique de p53 (Oh et al., 2006). Or Jab-1 est l'un des co-facteurs d'E2F1 décrit comme nécessaire pour ses fonctions apoptotiques (Hallstrom et Nevins, 2006). Il peut être envisagé que Jab-1 favorise la localisation cytoplasmique d'E2F1 lors d'un stress en déNEDDylant la protéine. Par ailleurs, il a été observé une déubiquitination d'E2F1 par la déubiquitinase UCH37 lors de dommages à l'ADN, favorisant ses fonctions apoptotiques (Mahanic et al., 2015). La mono-ubiquitination de p53 est décrite comme

responsable de son ciblage mitochondrial et le retrait de celle-ci est requis pour promouvoir les fonctions pro-apoptotiques de la protéine (Marchenko et al., 2007). A l'instar de p53, il peut être envisagé un mécanisme similaire de débubiquitination de la protéine E2F1 favorisant son rôle apoptotique aux mitochondries. Nos données soulèvent la question d'un rôle des modifications post-traductionnelles d'E2F1 pour son ciblage aux mitochondries et l'activation de ses fonctions pro-apoptotiques à ce compartiment lors d'un stress. Des travaux plus approfondis devront être menés à l'avenir afin d'éclaircir ce point.

2. L'augmentation du pool d'E2F1 mitochondrial accroît la sensibilité des cellules à l'apoptose

Nos travaux semblent indiquer une augmentation du pool de protéines E2F1 localisées aux mitochondries lors d'un stress génotoxique. Nous avons alors analysé les conséquences d'une augmentation d'E2F1 aux mitochondries sur la réponse à un stimulus apoptotique. La surexpression d'E2F1, ciblé ou non à ce compartiment, favorise la réponse apoptotique induite par un traitement étoposide dans la lignée Saos-2. Comme l'ont indiqué nos résultats précédents, E2F1 est en mesure d'agir sur l'apoptose intrinsèque par une voie dépendante de la transcription et une autre qui ne l'est pas. Le traitement génotoxique provoque à la fois l'accumulation d'E2F1 au sein du noyau mais *a priori* également au niveau du cytoplasme et des mitochondries, il pourrait donc permettre la mise en place de ses deux mécanismes d'induction de l'apoptose par E2F1. Ici nos données indiquent que promouvoir la voie non transcriptionnelle d'E2F1 aux mitochondries, permet une réponse optimale du traitement génotoxique. Cela suggère un effet coopératif entre les deux voies sur lesquelles E2F1 exerce son action pro-apoptotique. Nos travaux mettent donc en évidence l'importance que peut avoir le pool d'E2F1 localisé aux mitochondries dans la réponse des cellules tumorales à une chimiothérapie.

Ces résultats font écho à l'étude de Janic Le Pen (**Annexe 1**) indiquant d'une part que la réponse aux BH3-mimétiques requiert les fonctions non transcriptionnelles de p53 et d'autre part que ce facteur de transcription augmente de façon globale le priming mitochondrial. En effet, les lignées déplétées en protéine p53 sont moins sensibles à l'ajout de différents peptides BH3 dans le test de profilage BH3, indiquant une baisse générale de l'état de priming des mitochondries dans ces cellules (Le Pen et al., 2016). Les peptides BH3 sont des outils utilisés pour mimer les protéines BH3-Only. Dans notre étude, nous avons directement étudié l'action de ces protéines sur l'apoptose. Nous observons une meilleure réponse à la mort cellulaire induite par les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, lors de la surexpression concomitante d'E2F1, ciblé ou non aux

mitochondries. Ainsi la protéine E2F1, notamment par son action aux mitochondries, contribue à celle des protéines effectrices et BH3-Only. Nos travaux mettent donc en évidence une augmentation du priming mitochondrial induit par E2F1. De par ses fonctions non transcriptionnelles, E2F1 peut modifier le priming des mitochondries ; de par ses fonctions transcriptionnelles E2F1 augmente le niveau de protéines pro-apoptotiques telles que les BH3-Only. L'afflux de ces dernières au niveau des mitochondries déjà primées pourrait donc déclencher une MOMP et conduire à une réponse apoptotique efficace et rapide.

V. Lien direct entre E2F1 et la famille Bcl-2

1. E2F1 interagit avec les protéines anti-apoptotiques

Au cours de notre étude, nous avons d'abord mis en évidence l'existence d'une localisation mitochondriale constitutive d'E2F1 puis démontré une action pro-apoptotique non transcriptionnelle de la protéine ciblée à ce compartiment. Afin de comprendre comment E2F1 ciblé aux mitochondries est en mesure de réguler l'apoptose, nous avons étayé plusieurs hypothèses, dont l'une d'elle serait une intervention directe d'E2F1 au niveau du réseau de protéine de la famille Bcl-2. Plusieurs protéines nucléaires exercent comme E2F1, un rôle pro-apoptotique directement aux mitochondries comme c'est le cas pour p53, pRB ou Nur77. Or il se trouve que ces protéines interagissent avec certains membres de la famille Bcl-2 afin de réguler leur fonction. Des interactions entre p53 et les anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL conduisent à la libération des effecteurs ou BH3-Only activateurs (Bim/Bid), favorisant l'activation de Bax et/ou Bak (Chipuk et al., 2004; Han et al., 2010; Leu et al., 2004). L'interaction de p53 avec Bak a également été reportée contribuant là aussi à l'activation de l'effecteur (Leu et al., 2004; Sot et al., 2007). Une interaction avec Bax semble également se produire suite à une cis-trans isomérisation de la proline 47 de p53 (Follis et al., 2015). La protéine pRB interagit avec Bax et l'active directement (Hilgendorf et al., 2013). Dans le cas de Nur77, l'interaction avec Bcl-2 provoque un changement conformationnel de l'anti-apoptotique et sa conversion en une forme pro-apoptotique (Kolluri et al., 2008; Lin et al., 2004; Liu et al., 2008b).

L'utilisation de la technique de Bret, nous a permis de mettre en évidence, pour la première fois, en cellules entières, des interactions entre E2F1 et les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1. Ces résultats ont été confirmés par des approches d'immunoprécipitation sur protéines endogènes dans différentes lignées tumorales. En revanche, nous n'avons pas été en mesure de

détecter une interaction entre E2F1 et la protéine Bcl-2. L'interaction d'E2F1 avec Bcl-xL et Mcl-1, mais pas Bcl-2, peut être un mécanisme d'induction d'une mort dépendante de Bak, si E2F1 contrecarre les fonctions anti-apoptotiques de ces protéines. En accord avec cette hypothèse, seuls Bcl-xL et Mcl-1 protègent la lignée Saos-2 de l'apoptose induite par E2F1, ciblé ou non aux mitochondries. De façon surprenante, nous observons une augmentation de la mort induite par E2F1 ciblé aux mitochondries lors de la surexpression de Bcl-2. En référence au mécanisme d'action de Nur77, ce résultat soulève la question d'un effet d'E2F1 mitochondrial sur la conversion de Bcl-2 en une forme pro-apoptotique.

Les données d'interaction issues des approches d'immunoprécipitation ne permettent pas de déterminer si celle-ci est directe ou implique des partenaires supplémentaires. La détection d'interaction spécifique en BRET implique un transfert d'énergie entre la Renilla luciférase et la eYFP fusionnées aux protéines d'intérêt, sous réserve que le donneur et l'accepteur d'énergie se trouvent à une distance inférieure à 10 Å. Cela s'avère peu propice à la présence d'autres protéines, mais celle-ci ne peut être totalement exclue par cette approche. Une collaboration avec l'équipe de Laurence Dubrez a confirmé l'interaction entre E2F1 et Bcl-xL par une 3^{ème} approche de GST Pull Down. De plus, grâce à l'utilisation de protéines recombinantes, nous sommes à présent en mesure d'affirmer que l'interaction entre E2F1 et Bcl-xL est directe et ne requiert aucune autre protéine.

Nos premières données de caractérisation de l'interaction entre ces deux protéines indiquent que celle-ci s'effectue indépendamment de la poche hydrophobe de Bcl-xL, ce qui est en accord avec l'absence de domaine BH3 putatif au niveau de la protéine E2F1. En effet, l'interaction s'avère insensible à l'inhibition de la poche hydrophobe de Bcl-xL par le BH3-mimétique Wehi-539. Cependant, les travaux de Jessie Pécot indiquent que certaines interactions impliquant le sillon hydrophobe de Bcl-xL, telles que Puma – Bcl-xL ou Bim – Bcl-xL, peuvent résister à l'action du traitement. Nos données indiquent une persistance de l'interaction entre E2F1 et les mutants de Bcl-xL R139D et GRI (G138E R139L I140N), contrairement à ce qui est observé avec Bak ou Puma (Pécot et al., *in press*). Cela nous permet d'exclure définitivement un rôle de la poche hydrophobe de Bcl-xL dans l'interaction. En revanche, l'effet protecteur de Bcl-xL sur la mort induite par E2F1, ciblé ou non aux mitochondries, requiert son sillon hydrophobe fonctionnel. En effet, nous observons encore l'apoptose en présence de Bcl-xL R139D ou de Bcl-xL + Wehi-539. Etant donné que dans ces conditions les deux protéines E2F1 et Bcl-xL interagissent encore ensemble, l'inhibition de la mort dépendante d'E2F1 nécessite des interactions canoniques probablement avec les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que Bak. A l'instar d'E2F1, l'interaction entre

le facteur de transcription p53 et Bcl-xL est également indépendante de la poche hydrophobe. Plus précisément, elle fait intervenir la région N-terminale de Bcl-xL avec son hélice- $\alpha 1$ comprenant le domaine BH4, et les boucles entre les hélices- $\alpha 3$ / $\alpha 4$ et $\alpha 5$ / $\alpha 6$, situées approximativement entre les domaines BH3/BH1 et BH1/BH2. Les résidus H113 et E158 sont déterminants pour leur interaction (Follis et al., 2014). Nos résultats indiquent que la mutation de ces deux résidus n'affecte pas l'interaction entre E2F1 et Bcl-xL mesurée par BRET. Nous n'avons pas été en mesure de détecter l'interaction entre p53 et Bcl-xL par BRET, c'est pourquoi il nous manque un contrôle de l'efficacité de ces mutations à perturber des interactions analysées en BRET. Cependant, en nous appuyant sur les travaux de Follis, qui indiquent une incapacité de p53 à interagir avec ces mutants de Bcl-xL, nos résultats suggèrent, *a contrario*, que ces résidus ne sont pas requis dans l'interaction entre E2F1 et Bcl-xL. Le domaine BH4 de Bcl-xL est impliqué dans les interactions engagées avec des partenaires non canoniques dont p53 ainsi que VDAC-1 ou RyR (Liu et al., 2016). Il représente donc un domaine candidat pour l'interaction avec E2F1. Cependant, nous détectons des interactions entre E2F1 et Bcl-xL délété de son hélice- $\alpha 1$ ou de son domaine BH4, suggérant que ces domaines ne sont pas indispensables pour que l'interaction n'ait lieu. Nos données ne nous ont pas permis de déterminer le site d'interaction de Bcl-xL requis pour son association à E2F1. Une analyse des sites d'interaction *in silico* sur les structures tertiaires d'E2F1 et Bcl-xL pourrait être utile en vue de localiser des résidus impliqués.

En revanche, nos travaux indiquent l'implication de la région N-terminale d'E2F1 dans l'interaction avec Bcl-xL. En effet, nous ne sommes plus en mesure de détecter des interactions par BRET entre Bcl-xL et E2F1 déplété de sa région N-terminale : $\Delta N_{(\Delta 1-114)}$ et $\Delta DBD_{(\Delta 1-191)}$. De plus, nous observons une interaction entre les protéines recombinantes Bcl-xL et GST-E2F1₍₁₋₁₂₅₎ par GST Pull Down et entre Bcl-xL et E2F1 $\Delta C_{(1-214)}$ par BRET. La région N-terminale, telle que nous la définissons, comprend le site de liaison à la cycline A et le signal d'import nucléaire dans l'extrémité N-terminale ainsi que le domaine de liaison à l'ADN au niveau des résidus 114 à 191. L'interaction décrite entre p53 et Bcl-xL implique le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription, qui engage des interactions électrostatiques avec certains résidus chargés de Bcl-xL (Hagn et al., 2010). Au regard de nos résultats, il est possible qu'un modèle semblable d'interaction s'applique dans le cas d'E2F1, aussi il serait intéressant d'affiner la caractérisation de l'interaction pour éclaircir ce point.

2. La capacité d'E2F1 à interagir avec Bcl-xL semble requise pour ses fonctions apoptotiques

Nos travaux décrivent une régulation de l'apoptose par des fonctions non transcriptionnelles d'E2F1. La présence d'E2F1 au noyau n'est pas indispensable à ses fonctions pro-apoptotiques car la protéine directement ciblée aux mitochondries conserve son potentiel à induire l'apoptose mitochondriale. Par ailleurs, nous sommes à ce jour, les premiers à identifier une interaction entre E2F1 et certains des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Nos premières données de caractérisation de l'interaction avec Bcl-xL indiquent que la région N-terminale d'E2F1 est impliquée dans leur interaction. De manière intéressante, nos données suggèrent que le potentiel apoptotique d'E2F1 est relié à sa capacité à interagir avec Bcl-xL. En effet, nous observons une diminution importante voire une absence de potentiel apoptotique des protéines E2F1 déplétées de leur région N-terminale : $\Delta N_{(\Delta 1-114)}$ et $\Delta DBD_{(\Delta 1-191)}$, dont l'interaction avec Bcl-xL n'a pu être mise en évidence. *A contrario*, E2F1 $\Delta C_{(1-214)}$ conserve son potentiel apoptotique et interagit toujours avec Bcl-xL. En accord avec nos données, il a été observé une mort cellulaire de la lignée Saos-2 lors de l'expression transitoire des protéines E2F1 tronquées : E2F1₍₁₋₂₄₅₎ et E2F1₍₁₋₁₉₁₎. Dans cette même étude, l'expression du DBD d'E2F1₍₁₁₇₋₁₉₁₎ est suffisante pour induire la mort des cellules tumorales (Bell et al., 2006), ce que nous observons également lors de la surexpression du DBD d'E2F1₍₁₁₄₋₁₉₁₎ dans différentes lignées tumorales. Nos données suggèrent que la capacité d'E2F1 à lier Bcl-xL serait un élément déterminant pour ses fonctions apoptotiques. La démonstration formelle d'une interaction entre le DBD d'E2F1 et Bcl-xL conforterait ce raisonnement.

La protéine E2F1 est localisée aux mitochondries et nos données suggèrent que sa capacité à lier Bcl-xL influe sur son potentiel apoptotique. Nous avons alors formulé l'hypothèse que l'interaction entre ces deux partenaires pourrait modifier la capacité de Bcl-xL à lier ses contreparties pro-apoptotiques. Un mécanisme compétitif pour la liaison à Bcl-xL semble peu probable étant donné que l'interaction E2F1 – Bcl-xL n'implique pas la poche hydrophobe de l'anti-apoptotique, contrairement à celle avec les BH3-Only ou effecteurs. Une étude de Follis a mis en évidence un changement conformationnel partiel de Bcl-xL suite à l'interaction de Puma, provoquant une libération de p53 (Follis et al., 2013). En se basant sur ces travaux, il pourrait être envisagé qu'E2F1 agisse par un mécanisme semblable. Grâce à une collaboration avec Jean-Claude Martinou, nous avons évalué la capacité de Bcl-xL à inhiber l'activation de Bak et la MOMP subséquente en présence ou non d'E2F1 (données non présentées). La protéine recombinante Bcl-xL inhibe le relargage du cytochrome C, induit par l'activation de Bak suite à l'ajout de tBid

recombinant sur les mitochondries isolées. L'ajout supplémentaire de protéine E2F1 recombinante n'abroge pas cet effet. Par ailleurs, l'incubation de la protéine E2F1, seule sur les mitochondries, n'induit pas de relargage du cytochrome C et sa présence ne favorise pas non plus l'action de tBid. Au vu de ces données, E2F1 ne semble pas inhiber directement les interactions Bcl-xL – pro-apoptotiques, ni même interagir et activer directement l'effecteur Bak. Son rôle pro-apoptotique aux mitochondries implique donc un mécanisme distinct.

3. Bcl-xL régule la dynamique d'E2F1 sans perturber ses fonctions transcriptionnelles

L'interaction de Bcl-xL avec E2F1 implique sa région N-terminale ; il est donc possible que la séquence d'import au noyau d'E2F1 se retrouve masquée par l'interaction. Nos données de FLIP supportent cette hypothèse car nous observons un ralentissement du transport nucléocytoplasmique d'E2F1 en présence de Bcl-xL (lignée HCT116 p53^{-/-} pLvxBcl-xL vs pLvX). Par ailleurs, nous avons mis en évidence une augmentation du recrutement d'E2F1 aux mitochondries en présence de l'anti-apoptotique (lignée HCT116 WT pLvxBcl-xL vs pLvX). Nos travaux indiquent que Bcl-xL contribue à maintenir E2F1 au cytoplasme et de façon plus spécifique au niveau des mitochondries. Les immunoprécipitations réalisées dans les lignées HCT116 WT et p53^{-/-} utilisées ci-dessus, indiquent une augmentation des complexes E2F1 – Bcl-xL dans les lignées pLvxBcl-xL, suggérant que l'accumulation d'E2F1 au cytoplasme et/ou aux mitochondries serait due à son interaction avec Bcl-xL. Des interactions entre les protéines anti-apoptotiques et des facteurs de transcription ont été mises en évidence, résultant en une régulation de leur fonction transcriptionnelle. C'est notamment le cas du facteur de transcription NFκB dont l'interaction avec Bcl-2 retarde la libération et dégradation de IκB (régulateur de NFκB) dans les cellules en apoptose, maintenant le facteur de transcription dans un complexe inactif au cytoplasme (Hour et al., 2000). Bcl-xL, comme Bcl-2 diminue l'activité transcriptionnelle de NFκB mais leur interaction reste à prouver (Grimm et al., 1996). Une interaction a également été identifiée entre Bcl-2 et c-Myc, impliquant le domaine BH4 de la protéine anti-apoptotique. Dans ce cas, il a été reporté une stabilisation du facteur de transcription et une augmentation de son activité transcriptionnelle (Jin et al., 2006; Lu et Hong, 2009). Contrairement à ces études, nous n'observons pas de régulation de l'activité transcriptionnelle d'E2F1 par Bcl-xL. En effet, ni la surexpression de Bcl-xL, ni sa déplétion par ARN interférence ne modifie l'expression des gènes cibles d'E2F1 en condition basale ou en réponse à un stress génotoxique. Nos travaux indiquent donc que Bcl-xL affecte la dynamique intracellulaire d'E2F1 sans que cela n'ait de conséquence sur ses fonctions transcriptionnelles.

4. E2F1 régule la dynamique des protéines anti-apoptotiques

Comme E2F1, les protéines de la famille Bcl-2 sont sujettes à une dynamique intracellulaire contrôlant notamment leur localisation aux membranes et leurs fonctions. Cette dynamique résulte principalement de la mobilité des membres de cette famille entre le cytosol et les mitochondries. Il est probable que les effets de Bcl-xL sur la dynamique d'E2F1 soient dus à leur interaction. Nous nous sommes alors demandé si l'interaction entre E2F1 et Bcl-xL pourrait également moduler la dynamique de la protéine anti-apoptotique. En accord avec cette hypothèse, nos travaux mettent en évidence une régulation négative de la mobilité des protéines Bcl-xL et Mcl-1 par E2F1. En effet, nous observons une augmentation de la fraction immobile de ces protéines anti-apoptotiques, dans différents types cellulaires surexprimant E2F1 (MEFs et MCF-7). A notre connaissance, E2F1 est à ce jour, la première protéine n'appartenant pas à la famille Bcl-2, décrite pour sa capacité à moduler la dynamique des membres anti-apoptotiques de cette famille. Les travaux d'Andrew Gilmore indiquent une régulation similaire de la mobilité des protéines anti-apoptotiques par les BH3-Only (communication personnelle). La protéine Bad a d'ailleurs fait office de contrôle positif dans nos expériences de FRAP. Ainsi les BH3-Only, en interagissant avec leurs contreparties anti-apoptotiques, réduisent leur mobilité. Ayant connaissance de ce rôle des BH3-Only, nous avons agrémenté notre étude avec les protéines E2F1 OTC et E2F1 E132 afin d'exclure la possibilité d'un effet transcriptionnel indirect d'E2F1 sur la mobilité de Bcl-xL. Nos données indiquent qu'E2F1, qu'il soit déficient pour la transcription et/ou ciblé aux mitochondries exerce la même action que la protéine sauvage, suggérant que l'effet observé dépend directement de l'interaction entre ces protéines E2F1 et Bcl-xL.

Par ailleurs, l'unique domaine de liaison à l'ADN d'E2F1 suffit à contrôler la mobilité de la protéine Bcl-xL. Pour rappel, nos données d'interaction indiquent que la région N-terminale d'E2F1, comprenant le DBD, représente le site d'interaction de Bcl-xL. Or cette même région constitue un élément critique pour les fonctions pro-apoptotiques d'E2F1. Nous identifions à présent le DBD comme un régulateur négatif de la mobilité de Bcl-xL. Il apparaît donc que le domaine de liaison à l'ADN d'E2F1 joue un rôle central dans ses fonctions pro-apoptotiques non transcriptionnelles. Au regard de nos travaux, il est probable que l'interaction avec Bcl-xL, comme la régulation de sa mobilité, constitue au moins en partie le mécanisme d'action par lequel E2F1 régule l'apoptose, par une voie non transcriptionnelle, en agissant directement aux mitochondries.

5. Les fonctions anti-apoptotiques de Bcl-xL dépendent de sa dynamique

La mobilité et la localisation des protéines de la famille Bcl-2 sont deux propriétés étroitement liées. La mobilité des protéines anti-apoptotiques intervient dans le processus dit de « rétro-translocation » des effecteurs. En interagissant avec les protéines effectrices aux mitochondries, les anti-apoptotiques induisent un changement de localisation de ces derniers, en les redirigeant vers le cytoplasme (Edlich et al., 2011). Une modification de la localisation de Bcl-xL peut avoir des conséquences dramatiques sur sa capacité à retro-transloquer les effecteurs. En effet, la protéine Bcl-xL ΔC , majoritairement cytoplasmique, est dépourvue de la capacité à retro-transloquer Bax, ce qui altère ses fonctions anti-apoptotiques (Todt et al., 2013). L'absence d'ancrage aux membranes résulte en une diminution de la stabilité des complexes avec Bax, ne permettant plus la rétro-translocation de l'effecteur (Renault et al., 2015).

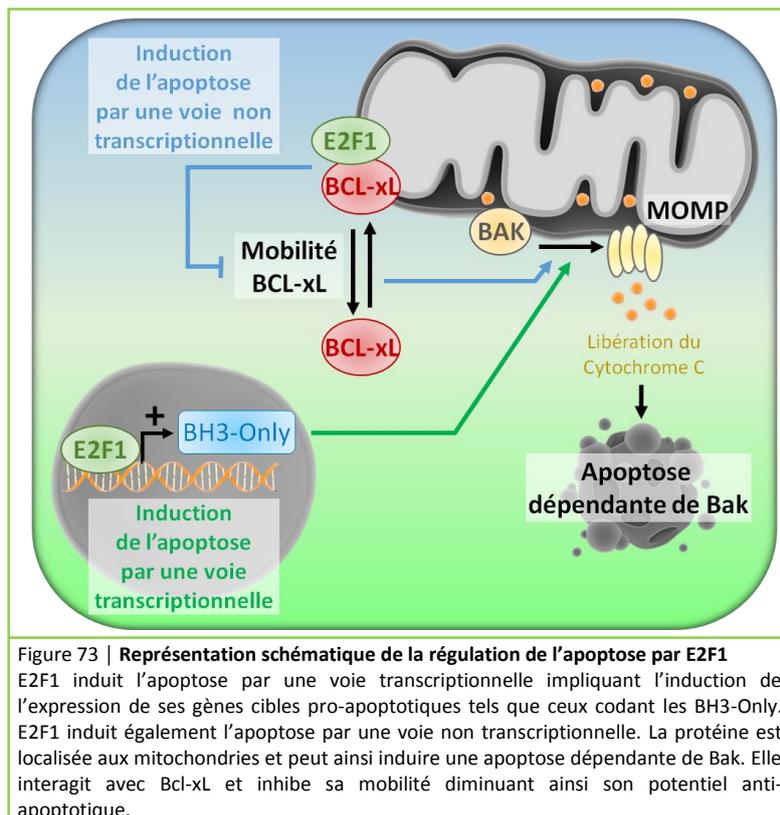
En accord avec les travaux de Renault, nos données indiquent que l'interaction Bak – Bcl-xL est perturbée par la localisation cytoplasmique de la protéine anti-apoptotique, induite par la mutation A221R. Par analogie aux travaux publiés sur Bcl-xL ΔC , il est donc très probable que Bcl-xL A221R ne soit plus en mesure de retro-transloquer Bak. De manière intéressante, nous n'observons plus aucune protection de la mort induite par surexpression de Bax ou Bak avec ces deux protéines Bcl-xL cytoplasmiques. Nos travaux, en accord avec ceux précédemment publiés, indiquent que la localisation cytoplasmique de Bcl-xL perturbe les interactions engagées avec les effecteurs, défavorisant probablement la rétro-translocation de ces derniers, résultant en une diminution de l'activité anti-apoptotique de Bcl-xL. A l'inverse, nous observons une meilleure protection de la mort induite par Bak avec la protéine Bcl-xL $\Delta 2$, décrite comme plus mobile que Bcl-xL dans les travaux d'Edlich (Todt et al., 2013). Il est possible que cette protéine présente une capacité de rétro-translocation de Bak supérieure à Bcl-xL, expliquant l'effet observé. L'ensemble de nos données indique que la localisation et la mobilité de Bcl-xL sont des propriétés actrices de ses fonctions anti-apoptotiques.

Leur modulation interfère directement avec la capacité de Bcl-xL à promouvoir la survie des cellules en présence d'un stimulus apoptotique. Il est intéressant de noter que seule l'apoptose induite par Bak est sensible à l'augmentation de mobilité de Bcl-xL. En effet, tandis que l'apoptose induite par Bax est inhibée de façon équivalente par Bcl-xL et Bcl-xL $\Delta 2$, celle induite par Bak ne semble que partiellement inhibée par Bcl-xL et l'est bien plus par Bcl-xL $\Delta 2$. Ces données indiquent qu'une mobilité accrue de Bcl-xL est requise pour que la protéine soit en mesure de contrecarrer

efficacement une mort dépendante de Bak dans notre modèle d'étude. Ayant connaissance du rôle de la mobilité dans les fonctions anti-apoptotiques de Bcl-xL, il est très probable qu'une relation de cause à effet existe entre : la régulation négative de la mobilité de Bcl-xL par E2F1 et ses fonctions apoptotiques non transcriptionnelles exercées aux mitochondries. La diminution de la mobilité de Bcl-xL induite par E2F1 pourrait donc rendre compte de la dépendance des effets apoptotiques d'E2F1 à la protéine effectrice Bak.

VI. Conclusions générales

La très grande majorité des tumeurs présente une inactivation de la voie de régulation pRB résultant en une activité dérégulée du facteur de transcription E2F1. Cette protéine versatile est connue pour ses effets oncogéniques ou suppresseurs de tumeur selon le contexte cellulaire. Notre étude s'est axée sur la caractérisation de la mort induite par E2F1. Nos travaux nous ont permis de distinguer deux voies de régulation de l'apoptose orchestrées par la protéine E2F1. En accord avec les données actuelles de la littérature, nous observons la mise en place d'une voie dépendante des fonctions transcriptionnelles d'E2F1 avec la transcription de gènes cibles pro-apoptotiques tels que p73 ou les BH3-Only, ainsi que d'une voie indépendante de la transcription de ces gènes cibles. Un schéma récapitulatif de nos résultats est présenté **Figure 73**.



Nous nous sommes attardés sur la compréhension des mécanismes mis en jeu dans la mort cellulaire induite par E2F1 en absence de ses fonctions transcriptionnelles. Nos travaux mettent en évidence, pour la première fois, la présence constitutive de ce facteur de transcription aux mitochondries. En réponse à un stress génotoxique, il semble se produire une accumulation de protéines E2F1 à ce compartiment. Nos données soulèvent la question de formes d'E2F1 modifiées post-traductionnellement à ce compartiment, qui varieraient lors d'un stimulus apoptotique. Au vu du rôle déterminant des modifications post-traductionnelles d'E2F1 dans le contrôle de ses fonctions apoptotiques, il serait pertinent de poursuivre les investigations à ce sujet. Nous avons identifié un rôle pro-apoptotique de la protéine E2F1, directement ciblée aux mitochondries. De plus, nos données suggèrent l'importance de la présence d'E2F1 à ce compartiment, pour qu'une réponse apoptotique optimale à des agents chimiothérapeutiques se produise. En effet, nous avons mis en évidence que la protéine E2F1, par son action directe aux mitochondries, augmente le priming mitochondrial.

La poursuite de notre étude, nous a permis d'identifier des interactions entre E2F1 et les membres anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1. L'interaction engagée avec la protéine Bcl-xL est directe et se fait indépendamment du sillon hydrophobe, rendant peu probable une action d'E2F1 aux mitochondries de type « BH3-Like ». En revanche, nous mettons en évidence une régulation de la mobilité des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 par E2F1. En effet, nous observons une augmentation de la fraction immobile de ces protéines en présence d'E2F1. Afin de comprendre si cet effet pouvait en partie rendre compte de l'action pro-apoptotique d'E2F1 aux mitochondries, nous avons analysé l'importance de la localisation et mobilité de Bcl-xL sur ses fonctions anti-apoptotiques. Nous observons que la modulation de ces deux propriétés influe directement sur sa capacité à inhiber l'apoptose. La localisation au cytoplasme restreint son potentiel anti-apoptotique, à l'inverse une plus grande mobilité le favorise. Nos données indiquent qu'une apoptose dépendante de Bak est particulièrement sensible au degré de mobilité de Bcl-xL. Au regard de nos travaux, nous proposons un mécanisme d'action non transcriptionnel d'E2F1 directement au niveau des mitochondries, où la protéine par ses interactions avec Bcl-xL, diminue sa mobilité et restreint ainsi son potentiel anti-apoptotique. Il en résulte une augmentation générale du priming mitochondrial et le déclenchement d'une apoptose dépendante de la protéine effectrice Bak. Nos données suggèrent que ce mécanisme pourrait intervenir lors de réponse à des chimiothérapies et participerait à potentialiser la mort cellulaire qui en découle.

A ce jour, E2F1 est la seule protéine n'appartenant pas à la famille Bcl-2 identifiée comme responsable d'une régulation de la mobilité des membres anti-apoptotiques. En revanche, les travaux d'Andrew Gilmore mettent en évidence une pareille action par les BH3-Only. Il serait intéressant de déterminer si d'autres interactants des protéines anti-apoptotiques exercent également une action similaire. La protéine p53 serait un bon candidat étant donné ses fonctions pro-apoptotiques non transcriptionnelles aux mitochondries, sa capacité à lier les membres de la famille Bcl-2 et à modifier le priming mitochondrial.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes exclusivement focalisé sur les fonctions apoptotiques de la protéine E2F1. Cependant, la présence constitutive d'E2F1 aux mitochondries soulève la question d'un rôle à ce compartiment en absence de signaux apoptotiques. Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre la biogénèse et/ou le métabolisme mitochondrial et la voie pRB/E2F1. Une régulation négative des gènes cibles, impliqués dans le métabolisme oxydatif, est effectuée par E2F1 en absence de stress car son extinction par ARN interférence provoque une élévation de leur expression (Blanchet et al., 2011). A l'inverse, certains autres gènes relatifs aux mitochondries, identifiés comme cible transcriptionnelle directe d'E2F1 (approches de CHIP), sont induits par le facteur de transcription. En son absence, des défauts mitochondriaux importants sont détectés (Ambrus et al., 2013). La plupart des protéines/facteurs impliqués dans les fonctions mitochondriales, sont issus d'une expression par des gènes nucléaires car la capacité codante du génome mitochondrial est relativement restreinte. Ce dernier code uniquement pour les 13 sous-unités de la chaîne respiratoire. Il se trouve qu'une élévation de l'expression de 7 de ces gènes est détectée dans la lignée HeLa en absence d'E2F1 (ARN interférence). La régulation de la transcription des gènes mitochondriaux dépend principalement de la protéine TFAM, du facteur de transcription NRF1 et du co-activateur nucléaire PGC1, or leur expression n'apparaît pas régulée par E2F1 dans cette étude (Goto et al., 2006). Différents travaux mentionnent une régulation directe de l'expression des gènes mitochondriaux par des facteurs de transcription, comme c'est le cas pour p43 et CREB. Il a également été observé une interaction de p53 avec TFAM, la polymérase γ ainsi qu'avec l'ADN mitochondrial (Leigh-Brown et al., 2010). Il serait intéressant d'évaluer la capacité d'E2F1, ciblé aux mitochondries, à réguler l'expression des gènes mitochondriaux. Cela pourrait expliquer sa présence constitutive aux mitochondries en absence de stress.

Matériels et

Méthodes

I. Lignées cellulaires

Les lignées utilisées dans cette étude sont des cellules adhérentes, cultivées en monocouche dans un milieu complet adéquat, à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂.

La lignée tumorale d'ostéosarcome Saos-2 (HTB-85) provient de la société ATCC (American Type Culture Collection). Ces cellules sont cultivées dans un milieu complet Mc Coy's 5A (Life Technologies), supplémenté de 20% de sérum de veau foetal (SVF) et de 100 unités/mL de pénicilline/streptomycine (Invitrogène). Lors des expérimentations, le milieu est remplacé par un milieu complet Mc Coy's 5A, supplémenté de 10% de sérum de veau foetal (SVF) et de 100 unités/mL de pénicilline/streptomycine.

Les lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 (HTB-22), BT-549 (HTB-122) et MDA-MB-231 (HTB-26) proviennent également de la société ATCC. Les lignées MCF-7 et BT-549 sont cultivées dans un milieu complet : RPMI₁₆₄₀ (Life Technologies), supplémenté de 10% de SVF, 100 unités/mL de Glutamine (Invitrogène) et 100 unités/mL de pénicilline/streptomycine. La lignée MDA-MB-231 est cultivée dans un milieu complet DMEM (Gibco), supplémenté de 5% de SVF, 100 unités/mL de Glutamine et 100 unités/mL de pénicilline/streptomycine.

La lignée de glioblastome U251 et de cancer du col de l'utérus HeLa (CCL-2), en provenance de l'ATCC, sont cultivées dans un milieu complet : DMEM ou RPMI₁₆₄₀, respectivement, supplémenté de 5% de SVF, auquel sont ajoutés 100 unités/mL de Glutamine et 100 unités/mL de pénicilline/streptomycine.

Les différentes lignées de cancer colorectal HCT116 utilisées dans notre étude ont été fournies par le Dr Volgenstein (John Hopkins Kimmel Cancer Center, Baltimore, MD, USA). Les lignées isogéniques HCT116 parentale, HCT116 p21^{-/-}, déficiente pour p21 et HCT116 p53^{-/-} déficiente pour p53 sont cultivées en milieu complet Mc Coy's 5A, supplémenté de 10% de (SVF) et de 100 unités/mL de pénicilline/streptomycine.

Les lignées surexprimant Bcl-xL ont été générées comme suit. Les lignées MCF-7 YFPBcl-xL et YFP (contrôle), surexprimant stablement YFPBcl-xL et YFP, respectivement sont issues de la lignée MCF-7 transfectée par les vecteurs peYFP-C1 (Clontech) ou peYFP-C1Bcl-xL comportant la séquence codante de Bcl-xL humain. Les cellules transfectées stablement ont été sélectionnées 48h après, grâce au gène de résistance à la néomycine par l'antibiotique G418, utilisé à 1 mg/mL sur plusieurs

semaines. Les lignées HCT116 pLv_x (contrôle)/pLv_xBcl-xL et HCT116 p53^{-/-} pLv_x/pLv_xBcl-xL proviennent des lignées HCT116 et HCT116 p53^{-/-} infectées par des lentivirus contenant le vecteur d'expression pLv_x-Puro (Clontech) comprenant ou non la séquence codante de Bcl-xL humain (fournis par le Dr O. Micheau). Une sélection des cellules exprimant stablement les vecteurs pLv_x et pLv_xBcl-xL a été réalisée 48h après infection par traitement puromycine à 1 µg/mL pendant une semaine.

La lignée MDA-MB-231 Omi-mCherry est issue de la lignée MDA-MB-231 infectée par un rétrovirus (*Multiplicity Of Infection* : MOI=3) contenant le plasmide codant pour la protéine de fusion Omi-mCherry, et sélectionnée grâce au gène de résistance puromycine par l'antibiotique correspondant : puromycine à 1,5 µg/mL. Une analyse de la fluorescence mCherry et un tri des cellules Omi-mCherry selon l'intensité de fluorescence ont été effectués sur le cytomètre trieur ARIA III/BD FACS Diva Software (BD Biosciences) avec une excitation du fluorochrome mCherry à 561nm. Le modèle utilisé dans notre étude correspond à la population de cellules Omi-mCherry présentant une intensité de fluorescence moyenne avec une différence de deux log₁₀ par rapport aux cellules MDA-MB-231.

Sauf indications contraires les traitements sont réalisés en milieu complet aux concentrations suivantes : 2µM d'ABT-737 (Abbott, Selleckchem), 2µM de Wehi-539 (ApexBio), 50µM d'étoposide (Sigma), 2µM de Staurosporine (Sigma), 5µM de Q-VD-OPh (R&D System), 50 µM de mDIVI-1 (Sigma), 6µM de Chloroquine (Sigma) et 10µM de 4-hydroxytamoxifène (4-OHT).

II. Transfections de plasmides / siRNAs et infections lentivirales

Les siRNAs sont transfectés à une concentration de 80nM en utilisant l'agent transfectant : Lipofectamine® RNAiMax (Invitrogen). Les siRNAs sont incubés avec la Lipofectamine® RNAiMax dans du milieu Opti-MEM (Life Technologies) pendant 15 minutes puis ajoutés à la lignée Saos-2 placée dans du milieu de culture Mc Coy's 5A, supplémenté de 1% de SVF. Le milieu de transfection est remplacé 5h après par du milieu Mc Coy's 5A, supplémenté de 10% de SVF et de 100 unités/mL de pénicilline/streptomycine.

SiRNA	Référence	Fournisseur
Control	ON-TARGETplus Non-targeting pool D-001810-10-20	Dharmacon
E2F1	HSC.RNAI.N005225.10.3	IDT
Bax	ON-TARGETplus BAX siRNA smart pool L-003308-01	Dharmacon
Bak	ON-TARGETplus BAK1 siRNA smart pool L-003305-00	Dharmacon
Puma	ON-TARGETplus BBC3 siRNA smart pool t-004380-00-0005	Dharmacon
Bim	ON-TARGETplus BCL2L11 siRNA smart pool L-004383-00	Dharmacon
Noxa	AM16104	AMBION

Les plasmides sont transfectés dans les différentes lignées en utilisant l'agent de transfection Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) incubés ensemble dans du milieu Opti-MEM pendant 15 minutes. Ce mélange est ajouté aux cellules placées dans un milieu de culture adéquat (Mc Coy's 5A, supplémenté de 1% de SVF pour les Saos-2, Opti-MEM pour les autres lignées) et est remplacé 5h après par le milieu de culture correspondant à la lignée concernée. L'ensemble des plasmides utilisés est listé dans le tableau qui suit.

Plasmides	Vecteurs sources	Origine
YFP	peYFP-C1	BD Bioscience
YFP-Bax	peYFP-C1	Insert séquence codante de Bax humain
YFP-Bak	peYFP-C1	Insert séquence codante de Bak humain
YFP-TMBcl-xL	peYFP-C1	Insert séquence codante TM de Bcl-xL ₍₂₀₉₋₂₃₃₎
YFPBcl-xL	peYFP-C1	Insert séquence codante de Bcl-xL
YFPBcl-xL R139D	peYFP-Bcl-xL	Mutagenèse dirigée
YFPBcl-xL GRI	peYFP-C1	Insert séquence codante de Bcl-xL G138E, R139L, I140N
YFPBcl-xL H113A	peYFP-Bcl-xL	Mutagenèse dirigée
YFPBcl-xL E158K	peYFP-Bcl-xL	Mutagenèse dirigée
YFPBcl-xL ΔBH4	peYFP-Bcl-xL	Délétion : Bcl-xL Δ8-18
YFPBcl-xL Δα1	peYFP-Bcl-xL	Délétion : Bcl-xL Δ2-24
YFPBcl-2	peYFP-C1	Insert séquence codante de Bcl-2 humain
YFPMcl-1	peYFP-C1	Insert séquence codante de Mcl-1 humain

Plasmides	Vecteurs sources	Origine
GFP	pCDNA™ 6.2/C-EmGFP-GW/TOPO®	Life Technologies
GFP-E2F1	pCDNA3.1 Flag-E2F1	Remplacement Flag par emGFP
GFP-E2F1 E132	pCDNA3.1 emGFP-E2F1	Mutagenèse dirigée: L132E N133F
GFP-E2F1 ΔC	pCDNA3.1 Flag-E2F1 ΔC ₍₁₋₂₁₄₎	Remplacement Flag par emGFP
GFP-E2F1 ΔN	pCDNA3.1 emGFP-E2F1	Remplacement E2F1 par insert d'E2F1 ΔN ₍₁₁₄₋₄₃₇₎
GFP-E2F1 ΔDBD	pCDNA3.1 emGFP-E2F1	Remplacement E2F1 par insert d'E2F1 ΔDBD ₍₁₉₁₋₄₃₇₎
GFP-E2F1 ΔDBD2	pCDNA3.1 emGFP-E2F1	Délétion par mutagenèse dirigée : E2F1 _(1-119;192-437)
GFP-E2F1 ΔDM	pCDNA3.1 emGFP-E2F1	Délétion par mutagenèse dirigée : E2F1 _(1-191;285-437)
GFP-E2F1-OTC	pCDNA3.1 emGFP-E2F1	Insert séquence codante d'adressage mito OTC
GFP-E2F1 E132-OTC	pCDNA3.1 emGFP-E2F1	Insert séquence codante d'adressage mito OTC
Empty Vector	pCDNA3.1	Invitrogen V790-20
Puma	pCDNA3.1	Insert séquence codante de Puma humain
Puma3A	pCDNA3.1	Insert séquence codante de Puma L141A D146A L148A
Bim	pCDNA3.1	Insert séquence codante de Bim humain
tBid	pCDNA3.1	Insert séquence codante de tBid humain
Bad	pCDNA3.1	Insert séquence codante de Bad humain
Noxa	pCDNA3.1	Servier
Bax	pCDNA3.1	Insert séquence codante de Bax humain
Bak	pCDNA3.1	Insert séquence codante de Bak humain
Bcl-xL	pCDNA3.1	Remplacement E2F1 par insert E2F1 ΔN ₍₁₁₄₋₄₃₇₎
Bcl-xL R139D	pCDNA3.1	Insert séquence codante de Bcl-xL R139D (mutagenèse dirigée)
Bcl-xL ΔC	pCDNA3.1	Insert séquence codante de Bcl-xL ΔC ₍₁₋₂₁₂₎
Bcl-xL A221R	pCDNA3.1	Insert séquence codante de Bcl-xL A221R (donné par S.Manon)
Bcl-xL Δ2	pCDNA3.1	Insert séquence codante de Bcl-xL ΔC ₍₁₋₂₃₁₎ (donné par F.Edlich)
Bcl-2	pCDNA3.1	Insert séquence codante de Bcl-2 humain
Mcl-1	pCDNA3.1	Insert séquence codante de Mcl-1 humain
mCherry	pmCherry-C1	Clontech
mCherry-E2F1	pmCherry-C1	Insert séquence codante d'E2F1 humain
mCherry-E2F1 E132	pmCherry-E2F1	Mutagenèse dirigée L132E N133F
mCherry-E2F1-OTC	pCDNA3.1 emGFP-E2F1-OTC	Remplacement GFP par mCherry
mCherry-DBD E2F1	pCDNA3.1 emGFP-DBD E2F1	Remplacement GFP par mCherry
mCherry-Bad	pmCherry	Insert séquence codante de Bad humain
mCherry-Noxa	pmCherry	Insert séquence codante de Noxa humain
RLuc	pRLuc-C1	BioSignal Packard
RLuc-E2F1	pRLuc-C1	Insert séquence codante d'E2F1 humain
RLuc-E2F1 E132	pRLuc-E2F1	Remplacement E2F1 par séquence codante d'E2F1
RLuc-E2F1 ΔC	pRLuc-E2F1	Remplacement E2F1 par séquence codante d'E2F1 ΔC
RLuc-E2F1 ΔN	pRLuc-C2	Insert séquence codante d'E2F1 ΔN ₍₁₁₄₋₄₃₇₎
RLuc-E2F1 ΔDBD	pRLuc-C2	Insert séquence codante d'E2F1 ΔDBD ₍₁₉₁₋₄₃₇₎
RLuc-Bak	pRLuc-C3	Insert séquence codante de Bak humain

Les extinctions de protéines par ShRNA sont réalisées par infection des cellules avec des particules lentivirales produites au laboratoire à une MOI de 3. Elles contiennent des vecteurs ShContrôle ou ShBcl-xL dont les séquences d'oligonucléotides ne ciblent aucun ARNm humain ou celui de Bcl-xL.

ShRNA	Vecteur lentiviral	Séquences
ShCtl	pFG12 ShScramble dirigé contre le gene LacZ	GTGACCAGCGAATACCTGT
ShBcl-xL	pFG12 ShBCL2L1	AGGATACAGCTGGAGTCAG
ShCtl	pGIPZ vide	Dharmacon
ShBcl-xL	pGIPZ ShBCL2L1	Dharmacon (Clone V3LS_413478)

Le système pFG12 a été utilisé dans le cadre des expériences de qPCR réalisées sur la lignée MCF-7 ShCtl/ShBcl-xL, en absence de traitement. Le milieu contenant les particules virales est retiré 24h après infection. Plusieurs lavages au PBS (*Phosphate Buffered Saline*) sont réalisés, suivis de l'ajout de milieu de culture RPMI₁₆₄₀ frais, supplémenté de 10% de SVF, 100 unités/mL de Glutamine et 100 unités/mL de pénicilline/streptomycine. Les cellules sont récupérées 48h après infection et sont sujettes au protocole d'extraction des ARNm en vue de l'expérience de qPCR qui suit (détaillée par la suite).

Le système pGIPZ a été utilisé dans le cadre des expériences de fractionnement sur les lignées MCF-7 ShCtl/ShBcl-xL et lors des expériences de qPCR sur la lignée Saos-2 ShCtl/ShBcl-xL. Dans ce cas-ci, 24h après infection, les milieux sont remplacés, comme mentionné ci-dessus, par du milieu frais RPMI₁₆₄₀ ou Mc Coy's 5A, respectivement, supplémenté de 10% de SVF, (100 unités/mL de Glutamine pour le RPMI₁₆₄₀), 100 unités/mL de pénicilline/streptomycine. A ces milieux est ajouté 1µg/mL de puromycine pour sélectionner les cellules exprimant stablement les vecteurs lentiviraux, qui sont utilisées lors des expériences de fractionnement ou qPCR.

III. Extraction d'ARN et RT-qPCR (Real Time quantitative Polymerization Chain Reaction)

Protocole expérimental

Les ARNs totaux ont été extraits à partir de 150 000 cellules avec le kit Nucleospin® RNA (Macherey Nagel), puis dosés au NanoDrop₁₀₀₀. S'en suit une étape de rétro-transcription de 500ng d'ARNs en ADNc en utilisant le kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for qPCR (Thermo Scientific) avec le programme suivant : 5 min à 25°C, 15 min à 50°C, 5 min à 85°C. La qPCR est

réalisée avec le kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) ROX (Thermo Scientific). Le mélange réactionnel comprend 4µl d'échantillons d'ADNc dilués au 1/25^{ème}, 1µl d'un mix comprenant les amorces sens et anti-sens à 1,5µM (concentration finale à 150nM) et 5µl de solution Maxima SYBR Green qPCR. La solution fournie par le kit contient la Hot Start Taq Polymerase, des dNTPs ainsi que du KCl, (NH₄)₂SO₄ et du MgCl₂, servant à optimiser l'activité de l'enzyme. Tous ces réactifs interviennent dans la réaction de qPCR. Celle-ci est quantifiée grâce au SYBR et au ROX. De l'eau RNase-free est utilisée comme contrôle négatif. La qPCR est effectuée dans le thermocycleur Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) en suivant le programme : 1 cycle de 10min 95°C, 40 cycles de 30 sec à 95°C / 1 min à 60°C et 1 cycle de 1 min à 95°C / 30 sec à 60°C / 30 sec à 95°C. Le 1^{er} cycle est une étape de dénaturation et d'activation de la polymérase. Les 40 cycles suivants sont une succession d'étape de dénaturation suivie d'étape d'hybridation des amorces et d'amplification. Le dernier cycle permet d'obtenir une courbe de dissociation.

Méthode d'analyse

La qPCR permet une quantification de l'amplification des ADNc reflétant le niveau d'expression de l'ARNm correspondant dans l'échantillon analysé. Le SYBR Green est un agent intercalant de l'ADN qui devient fluorescent lorsqu'il est complexé à ce dernier. Sa fluorescence est normalisée par rapport à celle de référence du ROX. Au fur et à mesure des cycles, il y a une augmentation de la fluorescence. Dans un premier temps, il est nécessaire de définir le seuil de fluorescence pour lequel l'ensemble des échantillons se trouve dans la phase exponentielle d'amplification. L'intersection entre le seuil défini et la courbe permet d'obtenir une valeur de Ct en abscisse pour chaque échantillon. Il est indispensable de contrôler que la fluorescence détectée ne provient pas de l'amplification d'un produit aspécifique. Lors du dernier cycle de PCR, l'ADN amplifié présent dans l'échantillon passe de la forme double brin à simple brin avec une température de dénaturation (T_m) qui lui est propre et de ce fait, un seul pic au niveau de la courbe de dissociation doit être observé. Les valeurs de Ct sont ensuite converties en quantité relative de chaque échantillon les uns par rapport aux autres pour un gène donné. Les données sont traitées selon la méthode de calcul de Pfaffl : $Ratio = \frac{(E_{cible})^{\Delta Ct, cible (Calibration-Test)}}{(E_{ref})^{\Delta Ct, ref (Calibration-Test)}}$. Une normalisation quantitative des ADNc de chaque échantillon est effectuée en utilisant ceux de gènes de ménage comme contrôle interne : GAPDH, β2-microglobulin, RPS18, HPRT-1, Actin-β, RPLP0. Une sélection des gènes de ménage, dont l'expression varie le moins entre les différents échantillons, a été

réalisée grâce à l'application geNorm VBA, qui permet également de déterminer le nombre de gènes de ménage à conserver pour que la normalisation soit la plus exacte possible.

Les amorces utilisées dans notre étude sont les suivantes :

Gène	Protéine	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille amplicon
GAPDH	GAPDH	CAAAAGGGTCATCATCTCTGC	AGTTGTCATGGATGACCTTGG	155
ACTB	Actin- β	AGAAATCTGGCACCACACC	CAGAGGCGTACAGGGATAGC	189
RPS18	RPS18	ATCCCTGAAAAGTTCCAGCA	CCCTCTGGTGAGGTCAATG	154
RPLP0	RPLP0	AACCCAGCTCTGGAGAACT	CCCCTGGAGATTTTAGTGGT	236
B2m	β 2-microglobulin	CGTGGCCTTAGCTGTGC	AATGTCGGATGGATGAAACC	154
HPRT1	HPRT1	ATGCTGAGGATTTGGAAAGG	GATGTAATCCAGCAGGTCAGC	164
E2F1	E2F1	AGTCCAAGAACCACATCCAGT	GCAGCTGCGTAGTACAGATA	147
TP73	p73	CTTCAACGAAGGACAGTCTG	AAGTTGTACAGGATGGTGGT	161
HRK	Harakiri	CAGGCGGAACCTTGTAGGAAC	AGGACACAGGGTTTTACCA	94
BCL2L11	Bim	GCCTTCAACCACTATCTCAG	TAAGCGTTAAACTCGTCTCC	118
BBC3	Puma	ACCTCAACGCACAGTACGA	GCACCTAATTGGGCTCCATC	147
PMAIP1	Noxa	CTCTGTAGCTGAGTGGGCG	CGGAAGTTCAGTTTGTCTCCA	150
BID	Bid	GAAGCGGGTAGTCGACCG	GGAACCGTTGTTGACCTCAC	168
BAK	Bak	GCCCACGGCAGAGAATGCCT	AGGGCCAGACGGTAGCCGAA	117
BAX	Bax	ACCGTGACCATCTTTGTG	AAAACACAGTCCAAGGCA	94
BCL2L1	Bcl-xL	TTCAGTGACCTGACATCCCA	TCCACAAAAGTATCCCAGCC	266
BCL2	Bcl-2	CCTTCTTTGAGTTCGGTGGG	TCTTCAGAGACAGCCAGGAG	210
MCL1	Mcl-1	TCGGTACCTTCGGGAGCAGGC	CCCAGTTTGTACGCCGTCGCT	236
CCNA2	Cyclin A2	TGGATCAATTTGCTGACTTGG	ATTTGCATATAAGCTTCCCACC	182
MSH2	Msh2	ACCGTTGTTGAAAGGCAAA	ACCGCAGACAGTGATGAAAC	94
RAD51	Rad51	TGGCCACAACCCATTTACGG	GCGCATAGGCAACAGCCTCCA	107

IV. Western blot (WB)

Les cellules sont soumises à une lyse par le tampon CHIP (SDS 1%, EDTA 10nM, Tris-HCl [pH 8,1] 50nM et cocktails d'inhibiteurs de protéases/phosphatases Pierce®). Les lysats protéiques ainsi obtenus sont soniqués (3 cycles de 15 minutes) sur glace puis dosés au spectrophotomètre à 570 nm grâce au kit BC Assay (Uptima). Entre 5 et 50 μ g de protéines, selon les expériences, sont dénaturés à 95°C 5 minutes puis déposés sur un gel de polyacrylamide de pourcentage variable selon les poids moléculaires des protéines étudiées. Celles-ci sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par SDS-PAGE puis transférées sur une membrane PVDF (Immobilon-P Membrane, IPVH00010). Les sites de liaisons aspécifiques sont bloqués par incubation de la membrane 1h à température ambiante avec une solution de TBS-T (Tris Buffered Saline Tween : 25mM Tris, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20, PH 8,0) contenant 5% de réactif de blocage (Western

blocking reagent, Roche®). L'anticorps primaire est incubé sur la nuit à 4°C. Après 3 lavages TBS-T, l'anticorps secondaire couplé à la HRP (*Horse Radish Peroxydase*) est incubé 1h à température ambiante, suivi de 3 autres lavages TBS-T. La révélation s'effectue avec le kit Clarity™ western ECL (Biorad®) et l'acquisition des signaux de chimioluminescence se fait au bio-imager Chemidoc™ (Biorad®).

Les anticorps utilisés pour les analyses Western blot sont listés ci-dessous :

Anticorps	Caractéristique	Référence	Fournisseur	Poids apparent
Actine	Anticorps monoclonal de souris	MAB1501R	Millipore	42 kDa
E2F1	Anticorps polyclonal de lapin	#3742	Cell Signaling	65 kDa
Parp-1	Anticorps monoclonal de souris	#AM30	Calbiochem	116-89 kDa
GFP	Anticorps polyclonal de lapin	Ab290	Abcam	27 kDa
Lamin A/C	Anticorps monoclonal de souris	sc-376248	Santa Cruz	62-69 kDa
CoxIV	Anticorps monoclonal de lapin	4850	Cell Signaling	17 kDa
Bcl-xL	Anticorps monoclonal de lapin	[E18] Ab32370	Abcam	26 kDa
Puma	Anticorps polyclonal de lapin	#4976	Cell Signaling	23 kDa
Bim	Anticorps polyclonal de lapin	#AB17003	Millipore	23 kDa
Noxa	Anticorps monoclonal de souris	Ab13654	Abcam	11 kDa
Bax	Anticorps polyclonal de lapin	A3533	Dako	21 kDa
Bak	Anticorps monoclonal de lapin	#3814	Cell Signaling	25 kDa
Bid	Anticorps polyclonal de lapin	#2002S	Cell Signaling	22-15 kDa
p62/SQMTM1	Anticorps monoclonal de souris	Sc-28359	Santa Cruz	62 kDa
LC3	Anticorps de lapin	L75431	Sigma	16-18 kDa
Bcl-2	Anticorps monoclonal de souris	M0887	Dako	26 kDa
Mcl-1	Anticorps polyclonal de lapin	sc-819	Santa Cruz	37 kDa
Souris HRP	Anticorps de chèvre couplé à la HRP	115-001	Jackson ImmunoR	
Lapin HRP	Anticorps de chèvre couplé à la HRP	111-001	Jackson ImmunoR	
Clean Blot IP HRP	Réactif de détection des IgG natives couplé à la HRP	21230	Pierce	

V. Immunoprécipitation (IP)

Les cellules sont soumises à une lyse par du tampon CHAPS 1% contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases/phosphatases (Pierce®). Les lysats protéiques sont soniqués à trois reprises sur glace pendant 15 minutes puis clarifiés par centrifugation à 13000g pendant 15 minutes. Les surnageants contenant les protéines sont dosés avec le kit BC Assay (Uptima). L'immunoprécipitation s'effectue en incubant 500µg de protéines dans du tampon CHAPS avec 2µg de l'anticorps primaire dirigé contre E2F1 ou Bcl-xL, sur la nuit à 4°C sous agitation. Les échantillons sont ensuite incubés avec les billes magnétiques associées à la protéine A/G (PureProteome™ Millipore®) 1h30 à température ambiante puis sont élués dans du tampon CHAPS supplémenté avec du tampon de charge de Laemli 1X final, 5 minutes à 95°C. Une analyse par Western blot est

réalisée afin de visualiser les complexes protéiques retenus. L'anticorps Clean Blot est utilisé comme un anticorps secondaire afin de ne révéler que les IgG sous conformation native et non celles utilisées lors de l'immunoprécipitation, qui ont été dénaturées.

VI. Fractionnement cellulaire

Les fractionnements réalisés sur les lignées MCF-7 et HeLa, en absence de stress ont été réalisés comme suit : Les cellules sont amplifiées en culture dans une quinzaine de boîtes de pétri 10cm. A 80% de confluence, elles sont récupérées mécaniquement dans le milieu de culture. Un échantillon de fraction totale est prélevé et est lysé par tampon CHIP, tandis que le reste de la suspension cellulaire est centrifugée 5 min à 2000 rpm. Le culot de cellules est resuspendu dans une solution dans un tampon d'extraction cellulaire (CEB : 250mM sucrose, 50mM HEPES [Ph7,4], 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, 10M cytochalasin B, 1mM EGTA et un cocktail d'inhibiteurs de protéases/phosphatases, Pierce®) et incubé 30 min sur glace. Les cellules sont broyées au Potter et la lyse cellulaire est contrôlée au bleu de trypan. Une 1^{ère} centrifugation, à 750g 10 min à 4°C, permet de séparer la fraction nucléaire. Le surnageant est centrifugé à 13000g 20 min à 4°C, ce qui permet l'obtention de la fraction mitochondriale présente dans le culot. Enfin une dernière étape de centrifugation du surnageant, à 100 000g 30 min à 4°C, permet de purifier la fraction cytoplasmique. Les culots protéiques des fractions nucléaires et mitochondriales sont lysés en tampon CHIP et les échantillons sont soniqués et dosés comme indiqué précédemment.

Les fractionnements réalisés sur les lignées Saos-2 et MCF-7 sous stress génotoxique, ainsi que ceux effectués sur les lignées HCT116 pLvX/pLvXBcl-xL ou MCF-7 ShCtl/ShBcl-xL ont été effectués en utilisant le kit : Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Thermo Scientific®). Le protocole relatif au kit a été appliqué. Cependant, l'étape de centrifugation à 700g 10 min à 4°C, a été modifiée par 3 centrifugations à 700g 5min à 4°C permettant une meilleure purification des fractions mitochondriales et diminuant le risque de contaminations avec des constituants nucléaires.

VII. BRET Assay (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)

Principe de la technique de BRET :

Afin d'analyser l'interaction entre deux protéines en BRET, celles-ci doivent être respectivement fusionnées à un donneur d'énergie la Rénilla luciférase (RLuc) et un accepteur d'énergie : la YFP. La RLuc est responsable d'une réaction de bioluminescence après ajout de son substrat : la coelenterazine h et génère un signal lumineux dont le pic maximal d'émission se trouve à 480nm. Si les deux protéines de fusion interagissent ensemble et que le donneur et l'accepteur d'énergie se trouvent à moins de 10nm, dans une orientation adéquate l'un par rapport à l'autre, il peut y avoir un transfert d'énergie par résonance de la RLuc à la YFP. Celle-ci se retrouve alors excitée et émettra un signal à 530nm. Le spectre d'émission de la RLuc chevauche légèrement avec celui de la YFP à 530nm ; la mesure du signal à 530nm généré par la RLuc seule permet de soustraire ce signal bruit de fond à celui détecté lorsque le donneur et l'accepteur d'énergie sont coexprimés, et d'obtenir le signal BRET.

Calcul du signal BRET :

1. Co-expression du donneur et accepteur d'énergie

$$\text{Ratio Bret} = \frac{\text{Lumière émise à 530nm } (\lambda \text{ accepteur})}{\text{Lumière émise à 480nm } (\lambda \text{ donneur})}$$

2. Expression du donneur sans accepteur d'énergie

$$\text{Ratio Bret Bruit de Fond} = \frac{\text{Lumière émise à 530nm } (\lambda \text{ accepteur})}{\text{Lumière émise à 480nm } (\lambda \text{ donneur})}$$

3. **Signal BRET = Ratio Bret – Ratio Bret Bruit de Fond**

Le protocole de BRET s'effectue comme suit :

Les cellules MCF-7 ou HeLa sontensemencées en plaque 12 puits. Lorsque 80% de confluence sont atteints, celles-ci sont transfectées avec 50ng et 100ng de vecteurs codant RLucE2F1 ou RLucBak, respectivement, et des quantités croissantes de vecteurs codant YFP-Bcl-xL sauvage/muté, YFP-Bcl-2 ou YFP-Mcl-1. La gamme de vecteur YFP est répartie sur 11 points allant de 50 à 1500ng. Le 1^{er} point de la gamme ne comprend pas de vecteur YFP, en revanche il correspond à la transfection de 50ng de vecteur pRLucE2F1 ou Bak avec 1000 ng de vecteurs pcDNA3.1-Bcl-xL sauvage/muté, Bcl-2 ou Mcl-1, ce qui permet la mesure du Bret Bruit de fond. Pour les expériences de Bret, la transfection est réalisée sur la nuit. A J+1, 16h après transfection, les

cellules sont transférées en plaque blanche opaque 96 puits. Lors de traitement BH3-mimétique, celui-ci est pratiqué environ 8h après ensemencement pendant 16h sur la nuit. Dans tous les cas (traitement ou non), la lecture Bret s'effectue à J+2 sur l'appareil Mithras LB940 (Berthold®). Pour cela, il y a retrait du milieu de culture, suivi d'un lavage PBS et les cellules sont placées dans ce tampon pour la lecture. L'appareil injecte dans chaque puits le substrat de la Renilla luciférase (fusionnée aux protéines E2F1 ou Bak), à savoir la coelenterazine h (Uptima®) à 5µM final. Une mesure des signaux lumineux émis à 480 nm et 530 nm est effectuée par l'appareil et une mesure de la fluorescence totale présente dans chaque puits est pratiquée par excitation des molécules de YFP avec la lampe halogène du Mithras. Les données sont obtenues sur le logiciel MicroWin 2000 puis exportées vers Microsoft Office Excel afin d'être analysées et de calculer le signal BRET. Les courbes de saturation présentées sont issues d'une analyse de régression non linéaire sur le logiciel GraphPad Prism 5.0® en appliquant un modèle d'équation d'interaction saturable à un site de liaison spécifique.

VIII. Pull Down

Les protéines recombinantes GST, GST-E2F1 ou GST-E2F1₍₁₋₁₂₅₎ sont produites en bactéries *Escherichia Coli* puis immobilisées sur colonne de glutathionne-sépharose (Amersham Biosciences). Selon les expériences des lysats protéiques de cellules HeLa ou 100ng de protéine recombinante Bcl-xL (Biorbyt) sont incubés avec les protéines taguées GST présentes sur la colonne. Les interactions sont évaluées par Western Blot en immunoblottant les anticorps anti-Bcl-xL ([E18] Ab32370) ou anti-GST (Rockland).

IX. Microscopie

1. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Les lignées MEFs GFP-Bcl-xL – 2A – Bad-ER ou MCF-7 YFPBcl-xL sont ensemencées sur boîte de pétri 10mm à fond en verre (MatTek Corporation). A 60% de confluence, les cellules sont transfectées sur la nuit avec 1500ng de plasmide codant mCherry, mCherry-E2F1 sauvage/muté, mCherry-Bad ou mCherry-Noxa en utilisant la lipofectamine 2000. A J+1, soit 16h après, le milieu de transfection est remplacé par un milieu complet F12 Ham, NaHCO₃ et L-glutamine (Sigma), supplémenté avec 10% de SVF, 25mM de tampon HEPES et 1% de pénicilline/streptomycine,

adéquat pour la microscopie. En cas de traitement OHT, la molécule est ajoutée à ce milieu à une concentration finale de 10 μ M, 3h avant la photomanipulation. L'imagerie des cellules vivantes est effectuée sur le microscope confocal Zeiss Axio Observer.Z1 comportant un disque rotatif CSU-X1 (Yokogawa) et muni d'une platine motorisée pour les déplacements XYZ (Applied Scientific Instrumentation). L'imagerie s'est faite en utilisant l'objectif plan apochromatique 633/1.40, la caméra EMCCD (Photometrics) et le logiciel Slidebook 5.1 (Intelligent Imaging Innovations). La fluorescence mCherry est détectée à 561nm et celle de la YFP à 488nm. La photomanipulation requiert une zone de FRAP placée sur une région enrichie en fluorescence YFP. Une acquisition d'image est effectuée toutes les 5sec sur 40 points de mesure. Au 5^{ème} point de mesure, la zone de FRAP est soumise à une stimulation par le laser à 100% pendant 10 ms provoquant une extinction momentanée de la fluorescence YFP qui s'y trouve (« beaching »). L'acquisition d'image après « beaching » permet d'analyser le taux de recouvrement de la fluorescence YFP. Une quantification de la fluorescence YFP présente de la zone de FRAP est effectuée en utilisant le logiciel de traitement d'images FIJI via le plugin ROI Manager. Au préalable la fluorescence bruit de fond est soustraite des images. Les données d'intensité de fluorescence YFP sont normalisées à 100% par rapport à la fluorescence mesurée juste avant « bleaching » (au 4^{ème} point de mesure). Les courbes de FRAP sont obtenues sur GraphPad Prism 5.0 par régression non linéaire en utilisant les équations d'association en phase exponentielle.

2. FLIP (Fluorescence Loss After Photobleaching)

Les lignées HCT116 p53^{-/-} pLvX/pLvXBcl-xL sont ensemencées sur lamelles IBIDI 8 puits à fond en verre. A 60% de confluence, les cellules sont transfectées sur la journée avec le plasmide codant GFP-E2F1. Environ 5h après, les milieux de transfections sont remplacés par du milieu de culture frais. A J+2, soit 48h après, les cellules sont placées dans du milieu Opti-MEM, adéquat pour la microscopie. L'imagerie des cellules vivantes est effectuée sur le microscope confocal Nikon A1 RSI. La photomanipulation est réalisée comme suit. Une zone de FLIP est placée au niveau du noyau et une 2^{nde} zone de mesure est positionnée sur une région du cytoplasme. Une acquisition d'images s'effectue toutes les 5 secondes sur 35 points de mesure. Les cellules sont « photobleachées » à quatre reprises au niveau de la zone de FLIP ciblée au noyau au point de mesure 8, 15, 22 et 29. Il en découle une extinction progressive de la fluorescence GFP dans la zone de FLIP au noyau. Le traitement des images s'effectue avec le logiciel FIJI. Les intensités de fluorescence dans les zones de mesures ont été normalisées à 100% par rapport à la fluorescence initiale obtenue au 1^{er} point

d'acquisition. La fluorescence mesurée dans une cellule voisine permet d'appliquer une correction de la décroissance de fluorescence au cours du temps d'acquisition observée en absence de stimulation. Les courbes de décroissance de fluorescence GFP au cytoplasme sont obtenues sur le logiciel GraphPad Prism 5.0 par régression linéaire.

3. Marquage du noyau et des mitochondries

Selon les expériences, différentes lignées ont été transfectées ou traitées puis soumises à un marquage du réseau mitochondrial par incubation avec 50 ou 100nM de Mitotracker® Red CMXRos (Life Technologies, M7512) pendant 20 minutes à 37°C. Conjointement, un marquage Hoescht est réalisé à raison de 1µg/mL. La fluorescence est directement analysée sur cellules vivantes au microscope Zeiss Axio Observer.Z1 dans les expériences avec la lignée Saos-2 transfectées avec GFP-E2F1 ou GFP-E2F1-OTC. Excepté ce cas-ci, la fluorescence est analysée sur cellules fixées au PBS – Paraformaldéhyde 1% au microscope Zeiss Axiovert200 – Apotome.1 pour la lignée HCT116 p53^{-/-} ou au HCS Array Scan Thermo pour les expériences d'analyse de MOMP dans la lignée MDA-MB-231 omi-mCherry. Précisons que pour cette lignée, aucun marquage Mitotracker® Red n'a été effectué.

X. Cytométrie en flux

1. Analyse du cycle cellulaire

La lignée Saos-2 estensemencée en plaque 6 puits. A 80% de confluence, les cellules sont transfectées avec 2µg de plasmides codant GFP ou GFP-E2F1 sauvage/muté. Un marquage au iodure de propidium est réalisé 24h après transfection. Pour cela, les cellules sont trypsinées à 37°C, centrifugées à 1500rpm pendant 5 minutes, reprises dans 300µl d'une solution de PBS à 25% SVF puis fixées par ajout de 450µl d'éthanol 70%. Les cellules sont incubées à 4°C pendant 2 heures minimum. Après centrifugation pour éliminer la solution de fixation, les cellules sont lavées par du PBS à deux reprises puis incubées avec la solution de marquage : PBS / iodure de propidium (2µg, Invitrogen™) / RNase pendant 30 min à 37°C. Les échantillons sont analysés par cytométrie en flux sur l'appareil FACSCalibur® (BD Biosciences®). Une acquisition de 10 000 cellules GFP positives est effectuée, au sein de laquelle sera évalué le cycle cellulaire.

2. Analyse de l'activation de la caspase 3

La lignée Saos-2 estensemencée en plaque 6 puits. A 80% de confluence, les cellules sont transfectées avec 2µg de plasmides codant GFP ou GFP-E2F1 sauvage/muté. Un marquage intracellulaire de la caspase 3 clivée est réalisé 48h après transfection. Pour cela, les cellules sont trypsinées à 37°C, centrifugées à 1500rpm pendant 5 minutes, puis fixées par ajout d'une solution de PBS – Paraformaldéhyde 1 % pendant 15 minutes à température ambiante. Après retrait de la solution de fixation, les cellules sont ensuite perméabilisées avec une solution de PBS – SVF 5 % – saponine 0,5 % pendant 15 minutes à température ambiante. Après son retrait, le marquage est réalisé par ajout d'une solution de PBS – SVF 5 % – saponine 0,1 %, à laquelle est ajouté l'anticorps anti-caspase 3 clivée (D3E9) couplé à l'AlexaFluor 647 (Cell Signaling, #9602) à la concentration indiquée par le fabricant ; incubé pendant 1h à l'obscurité et à température ambiante. En parallèle, un marquage contrôle est effectué de façon similaire avec l'isotype contrôle d'IgG de lapin couplé au même fluorochrome (US-Biological, 1190393), à une concentration équivalente à celle de l'anti-caspase 3 clivée. Après un lavage en PBS – SVF 5 % – saponine 0,1 % suivi d'un lavage PBS seul, les échantillons sont analysés par cytométrie en flux sur le FACSCalibur®. L'activation de la caspase 3 est évaluée parmi 10 000 cellules GFP positives.

3. Analyse de l'apoptose

La lignée Saos-2 estensemencée en plaque 6 puits. Les lignées MDA-MB-231, HeLa ou HCT116 p53^{-/-} sontensemencées en plaque 12 puits. A 80% de confluence, les cellules sont transfectées avec 2µg ou 1µg, respectivement, de plasmides codant GFP ou GFP-E2F1 sauvage/muté. Dans la lignée Saos-2, des expériences de co-transfections des vecteurs GFP indiqués ci-dessus avec ceux codant des protéines non taguées de la famille Bcl-2 ont également été réalisées. Dans ce cas, 2µg de plasmides codant GFP ou GFP-E2F1 sauvage/muté ont été transfectés à un ratio 1 : 3, soit avec 6µg de plasmides pcDNA3.1 anti ou pro-apoptotiques. Un marquage des phosphatidylsérines par l'AnnexinV est réalisée 48h après transfection sauf indications contraires. Pour cela, les cellules sont trypsinées à 37°C, centrifugées à 1500rpm pendant 5 minutes. Les culots sont lavés une fois en PBS avant d'être incubés avec la solution de marquage : PBS – Annexin V Binding Buffer 1X – AnnexinV-APC (BD Pharmingen™) pendant 15 minutes à l'obscurité. Les échantillons sont analysés par cytométrie en flux sur appareil FACSCalibur®. Une acquisition de 10 000 cellules GFP positives est effectuée, au sein de laquelle sera évaluée l'apoptose.

XI. Analyses statistiques

L'ensemble des expériences a été réalisé de manière indépendante à trois reprises (sauf si indication différente). Les résultats correspondent soit à une expérience représentative soit à la moyenne de plusieurs expériences où la variabilité entre les expériences est indiquée par le paramètre SEM (*Standard Error of Mean*). Les analyses statistiques correspondent à des tests t de Student, réalisés à l'aide du logiciel Graphpad Prism 5.0.

Correspondance des probabilités : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Bibliographie

- Adams, M.R., Sears, R., Nuckolls, F., Leone, G., and Nevins, J.R. (2000). Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3633–3639.
- Allen, K.E., de la Luna, S., Kerkhoven, R.M., Bernards, R., and La Thangue, N.B. (1997). Distinct mechanisms of nuclear accumulation regulate the functional consequence of E2F transcription factors. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 22), 2819–2831.
- Alonso, M.M., Fueyo, J., Yung, W.K.A., and Gomez-Manzano, C. (2006). E2F1 and telomerase: alliance in the dark side. *Cell Cycle Georget. Tex* 5, 930–935.
- Ambrosini, G., Sambol, E.B., Carvajal, D., Vassilev, L.T., Singer, S., and Schwartz, G.K. (2007). Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene* 26, 3473–3481.
- Ambrus, A.M., Islam, A.B.M.M.K., Holmes, K.B., Moon, N.S., Lopez-Bigas, N., Benevolenskaya, E.V., and Frolov, M.V. (2013). Loss of dE2F compromises mitochondrial function. *Dev. Cell* 27, 438–451.
- Amit, I., Citri, A., Shay, T., Lu, Y., Katz, M., Zhang, F., Tarcic, G., Siwak, D., Lahad, J., Jacob-Hirsch, J., et al. (2007). A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat. Genet.* 39, 503–512.
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J.-J., Mazzei, G., et al. (1997). Inhibition of Bax Channel-Forming Activity by Bcl-2. *Science* 370.
- Antonucci, L.A., Egger, J.V., and Krucher, N.A. (2014). Phosphorylation of the Retinoblastoma protein (Rb) on serine-807 is required for association with Bax. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 3611–3617.
- Aoki, I., Higuchi, M., and Gotoh, Y. (2013). NEDDylation controls the target specificity of E2F1 and apoptosis induction. *Oncogene* 32, 3954–3964.
- Apostolova, M.D., Ivanova, I.A., Dagnino, C., D'Souza, S.J.A., and Dagnino, L. (2002). Active nuclear import and export pathways regulate E2F-5 subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 277, 34471–34479.
- Aranovich, A., Liu, Q., Collins, T., Geng, F., Dixit, S., Leber, B., and Andrews, D.W. (2012). Differences in the mechanisms of proapoptotic BH3 proteins binding to Bcl-XL and Bcl-2 quantified in live MCF-7 cells. *Mol. Cell* 45, 754–763.
- Arnoult, D., Grodet, A., Lee, Y.-J., Estaquier, J., and Blackstone, C. (2005). Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J. Biol. Chem.* 280, 35742–35750.
- Attwooll, C., Oddi, S., Cartwright, P., Prosperini, E., Agger, K., Steensgaard, P., Wagener, C., Sardet, C., Moroni, M.C., and Helin, K. (2005). A novel repressive E2F6 complex containing the polycomb group protein, EPC1, that interacts with EZH2 in a proliferation-specific manner. *J. Biol. Chem.* 280, 1199–1208.
- Autret, A., and Martin, S.J. (2009). Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis. *Mol. Cell* 36, 355–363.
- Bagchi, S., Raychaudhuri, P., and Nevins, J.R. (1990). Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* 62, 659–669.
- Bagchi, S., Weinmann, R., and Raychaudhuri, P. (1991). The retinoblastoma protein copurifies with E2F-1, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* 65, 1063–1072.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., et al. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434, 658–662.
- Bamford, S., Dawson, E., Forbes, S., Clements, J., Pettett, R., Dogan, A., Flanagan, A., Teague, J., Futreal, P.A., Stratton, M.R., et al. (2004). The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br. J. Cancer* 91, 355–358.
- Banerjee, D., Gorlick, R., Liefshitz, A., Danenberg, K., Danenberg, P.C., Danenberg, P.V., Klimstra, D., Jhanwar, S., Cordon-Cardo, C., Fong, Y., et al. (2000). Levels of E2F-1 expression are higher in lung metastasis of colon cancer as compared with hepatic metastasis and correlate with levels of thymidylate synthase. *Cancer Res.* 60, 2365–2367.
- Basañez, G., Sharpe, J.C., Galanis, J., Brandt, T.B., Hardwick, J.M., and Zimmerberg, J. (2002). Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J. Biol. Chem.* 277, 49360–49365.
- Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., and Vousden, K.H. (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124–125.
- Bell, L.A., O'Prey, J., and Ryan, K.M. (2006). DNA-binding independent cell death from a minimal proapoptotic region of E2F-1. *Oncogene* 25, 5656–5663.
- Belvedere, O., Puglisi, F., Di Loreto, C., Cataldi, P., Guglielmi, A., Aschele, C., and Sobrero, A. (2004). Lack of correlation between immunohistochemical expression of E2F-1, thymidylate synthase expression and clinical response to 5-fluorouracil in advanced colorectal cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 15, 55–58.

- Ben Shachar, B., Feldstein, O., Hacohen, D., and Ginsberg, D. (2010). The tumor suppressor maspin mediates E2F1-induced sensitivity of cancer cells to chemotherapy. *Mol. Cancer Res. MCR* 8, 363–372.
- Benevolenskaya, E.V., and Frolov, M.V. (2015). Emerging links between E2F control and mitochondrial function. *Cancer Res.* 75, 619–623.
- Berkovich, E., and Ginsberg, D. (2003). ATM is a target for positive regulation by E2F-1. *Oncogene* 22, 161–167.
- Bertin-Ciftci, J., Barré, B., Le Pen, J., Maillet, L., Couriaud, C., Juin, P., and Braun, F. (2013). 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.
- Bhattacharya, S., Garriga, J., Calbó, J., Yong, T., Haines, D.S., and Graña, X. (2003). SKP2 associates with p130 and accelerates p130 ubiquitylation and degradation in human cells. *Oncogene* 22, 2443–2451.
- Bhola, P.D., Mattheyses, A.L., and Simon, S.M. (2009). Spatial and temporal dynamics of mitochondrial membrane permeability waves during apoptosis. *Biophys. J.* 97, 2222–2231.
- Biasutto, L., Azzolini, M., Szabò, I., and Zoratti, M. (2016). The mitochondrial permeability transition pore in AD 2016: An update. *BBA - Mol. Cell Res.* 1863, 2515–2530.
- Bierie, B., and Moses, H.L. (2006). Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 506–520.
- Bishop, J.M. (1983). Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 301–354.
- Bishop, J.M. (1985). Viral oncogenes. *Cell* 42, 23–38.
- Biswas, A.K., and Johnson, D.G. (2012). Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage. *Cancer Res.* 72, 13–17.
- Blake, M.C., and Azizkhan, J.C. (1989). Transcription factor E2F is required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4994–5002.
- Blanchet, E., Annicotte, J.-S., Lagarrigue, S., Aguilar, V., Clapé, C., Chavey, C., Fritz, V., Casas, F., Apparailly, F., Auwerx, J., et al. (2011). E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat. Cell Biol.* 13, 1146–1152.
- Bleicken, S., Wagner, C., and García-Sáez, A.J. (2013). Mechanistic Differences in the Membrane Activity of Bax and Bcl-xL Correlate with Their Opposing Roles in Apoptosis. *Biophys. J.* 104, 421–431.
- Bleicken, S., Jeschke, G., Stegmüller, C., Salvador-Gallego, R., García-Sáez, A.J., and Bordignon, E. (2014). Structural model of active Bax at the membrane. *Mol. Cell* 56, 496–505.
- Booth, L.A., Tavallai, S., Hamed, H.A., Cruickshanks, N., and Dent, P. (2014). The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Cell. Signal.* 26, 549–555.
- Borner, C. (1996). Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 271, 12695–12698.
- Braun, F., de Carné Trécesson, S., Bertin-Ciftci, J., and Juin, P. (2013). Protect and serve: Bcl-2 proteins as guardians and rulers of cancer cell survival. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 2937–2947.
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597–601.
- Brooks, C., and Dong, Z. (2007). Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins: a key in Bak? *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 3043–3047.
- Brooks, C., Wei, Q., Feng, L., Dong, G., Tao, Y., Mei, L., Xie, Z.-J., and Dong, Z. (2007). Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11649–11654.
- Brouwer, J.M., Westphal, D., Dewson, G., Robin, A.Y., Uren, R.T., Bartolo, R., Thompson, G.V., Colman, P.M., Kluck, R.M., and Czabotar, P.E. (2014). Bak core and latch domains separate during activation, and freed core domains form symmetric homodimers. *Mol. Cell* 55, 938–946.
- Bruncko, M., Wang, L., Sheppard, G.S., Phillips, D.C., Tahir, S.K., Xue, J., Erickson, S., Fidanze, S., Fry, E., Hasvold, L., et al. (2015). Structure-guided design of a series of MCL-1 inhibitors with high affinity and selectivity. *J. Med. Chem.* 58, 2180–2194.
- Bussard, K.M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C., and Marini, F.C. (2016). Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res. BCR* 18, 84.
- Caelles, C., Helmborg, A., and Karin, M. (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370, 220–223.
- Campone, M., Noël, B., Couriaud, C., Grau, M., Guillemin, Y., Gautier, F., Gouraud, W., Charbonnel, C., Campion, L., Jézéquel, P., et al. (2011). c-Myc dependent expression of pro-apoptotic Bim renders HER2-overexpressing breast cancer cells dependent on anti-apoptotic Mcl-1. *Mol. Cancer* 10, 110.
- Cao, Q., Xia, Y., Azadniv, M., and Crispe, I.N. (2004). The E2F-1 transcription factor promotes caspase-8 and bid

- expression, and enhances Fas signaling in T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *173*, 1111–1117.
- Carcagno, A.L., Ogara, M.F., Sonzogni, S.V., Marazita, M.C., Sirkin, P.F., Ceruti, J.M., and Cánepa, E.T. (2009). E2F1 transcription is induced by genotoxic stress through ATM/ATR activation. *IUBMB Life* *61*, 537–543.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* *298*.
- Carnevale, J., Palander, O., Seifried, L.A., and Dick, F.A. (2012). DNA damage signals through differentially modified E2F1 molecules to induce apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 900–912.
- Cartier, J., Berthelet, J., Marivin, A., Gemble, S., Edmond, V., Plenchette, S., Lagrange, B., Hammann, A., Dupoux, A., Delva, L., et al. (2011). Cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP1) can regulate E2F1 transcription factor-mediated control of cyclin transcription. *J. Biol. Chem.* *286*, 26406–26417.
- Cartron, P.-F., Juin, P., Oliver, L., Martin, S., Meflah, K., and Vallette, F.M. (2003). Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 4701–4712.
- Cartron, P.-F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M., and Juin, P. (2004). The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol. Cell* *16*, 807–818.
- Cassimere, E.K., Pyndiah, S., and Sakamuro, D. (2009). The c-MYC-interacting proapoptotic tumor suppressor BIN1 is a transcriptional target for E2F1 in response to DNA damage. *Cell Death Differ.* *16*, 1641–1653.
- Chaussepied, M., and Ginsberg, D. (2004). Transcriptional regulation of AKT activation by E2F. *Mol. Cell* *16*, 831–837.
- Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M., and Nevins, J.R. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* *65*, 1053–1061.
- Chen, H.-Z., Tsai, S.-Y., and Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 785–797.
- Chen, J., Zhu, F., Weeks, R.L., Biswas, A.K., Guo, R., Li, Y., and Johnson, D.G. (2011). E2F1 promotes the recruitment of DNA repair factors to sites of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 1287–1294.
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Differential Targeting of Prosurvival Bcl-2 Proteins by Their BH3-Only Ligands Allows Complementary Apoptotic Function. *Mol. Cell* *17*, 393–403.
- Cheng, E.H.Y., Sheiko, T.V., Fisher, J.K., Craigen, W.J., and Korsmeyer, S.J. (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* *301*, 513–517.
- Chiang, C.W., Harris, G., Eilig, C., Masters, S.C., Subramanian, R., Shenolikar, S., Wadzinski, B.E., and Yang, E. (2001). Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin-3-dependent lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation. *Blood* *97*, 1289–1297.
- Chipuk, J.E., Maurer, U., Green, D.R., and Schuler, M. (2003). Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* *4*, 371–381.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* *303*, 1010–1014.
- Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D.D., and Green, D.R. (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* *309*, 1732–1735.
- Chipuk, J.E., McStay, G.P., Bharti, A., Kuwana, T., Clarke, C.J., Siskind, L.J., Obeid, L.M., and Green, D.R. (2012). Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* *148*, 988–1000.
- Cho, E.-C., Zheng, S., Munro, S., Liu, G., Carr, S.M., Moehlenbrink, J., Lu, Y.-C., Stimson, L., Khan, O., Konietzny, R., et al. (2012). Arginine methylation controls growth regulation by E2F-1. *EMBO J.* *31*, 1785–1797.
- Choi, S., Chen, Z., Tang, L.H., Fang, Y., Shin, S.J., Panarelli, N.C., Chen, Y.-T., Li, Y., Jiang, X., and Du, Y.-C.N. (2016). Bcl-xL promotes metastasis independent of its anti-apoptotic activity. *Nat. Commun.* *7*, 10384–10384.
- Christensen, J., Cloos, P., Toftegaard, U., Klinkenberg, D., Bracken, A.P., Trinh, E., Heeran, M., Di Stefano, L., and Helin, K. (2005). Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res.* *33*, 5458–5470.
- Christenson, E., Merlin, S., Saito, M., and Schlesinger, P. (2008). Cholesterol effects on BAX pore activation. *J. Mol. Biol.* *381*, 1168–1183.
- Chu, R., Terrano, D.T., and Chambers, T.C. (2012). Cdk1/cyclin B plays a key role in mitotic arrest-induced apoptosis by phosphorylation of Mcl-1, promoting its degradation and freeing Bak from sequestration. *Biochem. Pharmacol.* *83*, 199–206.

- Colell, A., Ricci, J.-E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N.J., Li, C.W., et al. (2007). GAPDH and Autophagy Preserve Survival after Apoptotic Cytochrome c Release in the Absence of Caspase Activation. *Cell* 129, 983–997.
- Conner, E.A., Lemmer, E.R., Omori, M., Wirth, P.J., Factor, V.M., and Thorgeirsson, S.S. (2000). Dual functions of E2F-1 in a transgenic mouse model of liver carcinogenesis. *Oncogene* 19, 5054–5062.
- Courel, M., Friesenhahn, L., and Lees, J.A. (2008). E2f6 and Bmi1 cooperate in axial skeletal development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 237, 1232–1242.
- Couturier, C., and Deprez, B. (2012). Setting Up a Bioluminescence Resonance Energy Transfer High throughput Screening Assay to Search for Protein/Protein Interaction Inhibitors in Mammalian Cells. *Front. Endocrinol.* 3, 100.
- Cress, W.D., Johnson, D.G., and Nevins, J.R. (1993). A genetic analysis of the E2F1 gene distinguishes regulation by Rb, p107, and adenovirus E4. *Mol. Cell Biol.* 13, 6314–6325.
- Croxton, R., Ma, Y., Song, L., Haura, E.B., and Cress, W.D. (2002). Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene* 21, 1359–1369.
- Cuddeback, S.M., Yamaguchi, H., Komatsu, K., Miyashita, T., Yamada, M., Wu, C., Singh, S., and Wang, H.G. (2001). Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J. Biol. Chem.* 276, 20559–20565.
- Czabotar, P.E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Yao, S., Robin, A.Y., Smith, B.J., et al. (2013). Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* 152, 519–531.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 49–63.
- Dahiya, A., Gavin, M.R., Luo, R.X., and Dean, D.C. (2000). Role of the LXCXE Binding Site in Rb Function. *Mol. Cell Biol.* 20, 6799.
- Dai, H., Ding, H., Meng, X.W., Peterson, K.L., Schneider, P.A., Karp, J.E., and Kaufmann, S.H. (2015). Constitutive BAK activation as a determinant of drug sensitivity in malignant lymphohematopoietic cells. *Genes Dev.* 29, 2140–2152.
- Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B., and Greenberg, M.E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol. Cell* 6, 41–51.
- DeGregori, J., and Johnson, D.G. (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr. Mol. Med.* 6, 739–748.
- Dejean, L.M., Martinez-Caballero, S., Guo, L., Hughes, C., Teijido, O., Ducret, T., Ichas, F., Korsmeyer, S.J., Antonsson, B., Jonas, E.A., et al. (2005). Oligomeric Bax Is a Component of the Putative Cytochrome c Release Channel MAC, Mitochondrial Apoptosis-induced Channel. *Mol. Biol. Cell* 16, 2424–2432.
- Dejean, L.M., Martinez-Caballero, S., and Kinnally, K.W. (2006). Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis? *Cell Death Differ.* 13, 1387–1395.
- Del Gaizo Moore, V., and Letai, A. (2013). BH3 profiling—measuring integrated function of the mitochondrial apoptotic pathway to predict cell fate decisions. *Cancer Lett.* 332, 202–205.
- Delbridge, A.R.D., Grabow, S., Strasser, A., and Vaux, D.L. (2016). Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 16, 99–109.
- Denisov, A.Y., Madiraju, M.S.R., Chen, G., Khadir, A., Beuparlant, P., Attardo, G., Shore, G.C., and Gehring, K. (2003). Solution structure of human BCL-w: modulation of ligand binding by the C-terminal helix. *J. Biol. Chem.* 278, 21124–21128.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J. Cell Biol.* 144, 891–901.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (2001). Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol. Cell* 8, 601–611.
- Dewson, G., Kratina, T., Czabotar, P., Day, C.L., Adams, J.M., and Kluck, R.M. (2009). Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their alpha6 helices. *Mol. Cell* 36, 696–703.
- Di Stefano, L., Jensen, M.R., and Helin, K. (2003). E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J.* 22, 6289–6298.
- Dick, F.A., and Dyson, N. (2003). pRB contains an E2F1-specific binding domain that allows E2F1-induced apoptosis to be regulated separately from other E2F activities. *Mol. Cell* 12, 639–649.
- Dick, F.A., and Rubin, S.M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 297–306.

- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffey, P.J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol. CB* 10, 1201–1204.
- Dong, Y.B., Yang, H.L., Elliott, M.J., Liu, T.J., Stilwell, A., Atienza, C., and McMasters, K.M. (1999). Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer efficiently induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer* 86, 2021–2033.
- Du, X., Youle, R.J., FitzGerald, D.J., and Pastan, I. (2010). Pseudomonas exotoxin A-mediated apoptosis is Bak dependent and preceded by the degradation of Mcl-1. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3444–3452.
- Dunaief, J.L., Strober, B.E., Guha, S., Khavari, P.A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G.R., and Goff, S.P. (1994). The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* 79, 119–130.
- Duronio, R.J., and Xiong, Y. (2013). Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008904.
- Dyson, H.J., and Komives, E.A. (2012). Role of disorder in I κ B-NF κ B interaction. *IUBMB Life* 64, 499–505.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145, 104–116.
- Edmond, V., Merdzhanova, G., Gout, S., Brambilla, E., Gazzeri, S., and Eymin, B. (2013). A new function of the splicing factor SRSF2 in the control of E2F1-mediated cell cycle progression in neuroendocrine lung tumors. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 1267–1278.
- Eischen, C.M., Packham, G., Nip, J., Fee, B.E., Hiebert, S.W., Zambetti, G.P., and Cleveland, J.L. (2001). Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. *Oncogene* 20, 6983–6993.
- Engelmann, D., and Pützer, B.M. (2010). Translating DNA damage into cancer cell death—A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 13, 119–131.
- Engelmann, D., and Pützer, B.M. (2012). The dark side of E2F1: in transit beyond apoptosis. *Cancer Res.* 72, 571–575.
- Engelmann, D., Knoll, S., Ewerth, D., Steder, M., Stoll, A., and Pützer, B.M. (2010). Functional interplay between E2F1 and chemotherapeutic drugs defines immediate E2F1 target genes crucial for cancer cell death. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 67, 931–948.
- Estaquier, J., and Arnoult, D. (2007). Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ.* 14, 1086–1094.
- Eymin, B., Karayan, L., Séité, P., Brambilla, C., Brambilla, E., Larsen, C.J., and Gazzéri, S. (2001a). Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity. *Oncogene* 20, 1033–1041.
- Eymin, B., Gazzeri, S., Brambilla, C., and Brambilla, E. (2001b). Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. *Oncogene* 20, 1678–1687.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.
- Ferreira, R., Magnaghi-Jaulin, L., Robin, P., Harel-Bellan, A., and Trouche, D. (1998). The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10493–10498.
- Field, S.J., Tsai, F.Y., Kuo, F., Zubiaga, A.M., Kaelin, W.G., Livingston, D.M., Orkin, S.H., and Greenberg, M.E. (1996). E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* 85, 549–561.
- Fogal, V., Kartasheva, N.N., Trigiante, G., Llanos, S., Yap, D., Vousden, K.H., and Lu, X. (2005). ASPP1 and ASPP2 are new transcriptional targets of E2F. *Cell Death Differ.* 12, 369–376.
- Follis, A.V., Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Yun, M.-K., Grace, C.R., Nourse, A., Baran, K., Ou, L., Min, L., White, S.W., et al. (2013). PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis. *Nat. Chem. Biol.* 9, 163–168.
- Follis, A.V., Llambi, F., Ou, L., Baran, K., Green, D.R., and Kriwacki, R.W. (2014). The DNA-binding domain mediates both nuclear and cytosolic functions of p53. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 535–543.
- Follis, A.V., Llambi, F., Merritt, P., Chipuk, J.E., Green, D.R., and Kriwacki, R.W. (2015). Pin1-Induced Proline Isomerization in Cytosolic p53 Mediates BAX Activation and Apoptosis. *Mol. Cell* 59, 677–684.
- Fortin, A., MacLaurin, J.G., Arbour, N., Cregan, S.P., Kushwaha, N., Callaghan, S.M., Park, D.S., Albert, P.R., and Slack, R.S. (2004). The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1. *J. Biol. Chem.* 279, 28706–28714.
- Frame, F.M., Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Cress, W.D., and Kowalik, T.F. (2006). E2F1 induces MRN foci formation and a cell cycle checkpoint response in human fibroblasts. *Oncogene* 25, 3258–3266.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* 1, 515–525.

- Freedman, D.A., and Levine, A.J. (1998). Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 7288–7293.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M., and Dryja, T.P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* *323*, 643–646.
- Frisch, S.M., and Mymryk, J.S. (2002). Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 441–452.
- Fujita, Y., Sakakura, C., Shimomura, K., Nakanishi, M., Yasuoka, R., Aragane, H., Hagiwara, A., Abe, T., Inazawa, J., and Yamagishi, H. (2003). Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in esophageal squamous cell carcinoma, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Hepatogastroenterology.* *50*, 1857–1863.
- Fuster, J.J., Sanz-González, S.M., Moll, U.M., and Andrés, V. (2007). Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol. Med.* *13*, 192–199.
- Gabellini, C. [b1] (analytic), Del Bufalo, D. [b1] (analytic), and Zupi, G. [b1] (analytic) (2006). Involvement of RB gene family in tumor angiogenesis (English). *Oncogene Basingstoke* *25*, 5326–5332.
- Galbiati, L., Mendoza-Maldonado, R., Gutierrez, M.I., and Giacca, M. (2005). Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. *Cell Cycle Georget. Tex* *4*, 930–939.
- Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., Noël, B., Hickman, J.A., Geneste, O., Cartron, P.-F., Vallette, F.M., Manon, S., et al. (2009). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J. Cell Biol.* *185*, 279–290.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* *19*, 107–120.
- Gao, G., and Dou, Q.P. (2000). N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J. Cell. Biochem.* *80*, 53–72.
- Garcia-Garcia, A., Rodriguez-Rocha, H., Tseng, M.T., Montes de Oca-Luna, R., Zhou, H.S., McMasters, K.M., and Gomez-Gutierrez, J.G. (2012). E2F-1 lacking the transcriptional activity domain induces autophagy. *Cancer Biol. Ther.* *13*, 1091–1101.
- Garcia-Jove Navarro, M., Basset, C., Arcondéguy, T., Touriol, C., Perez, G., Prats, H., and Lacazette, E. (2013). Api5 contributes to E2F1 control of the G1/S cell cycle phase transition. *PLoS One* *8*, e71443.
- Garner, T.P., Reyna, D.E., Priyadarshi, A., Chen, H.-C., Li, S., Wu, Y., Ganesan, Y.T., Malashkevich, V.N., Almo, S.S., Cheng, E.H., et al. (2016). An Autoinhibited Dimeric Form of BAX Regulates the BAX Activation Pathway. *Mol. Cell* *63*, 485–497.
- Gaubatz, S., Lindeman, G.J., Ishida, S., Jakoi, L., Nevins, J.R., Livingston, D.M., and Rempel, R.E. (2000). E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol. Cell* *6*, 729–735.
- Gautier, F., Guillemin, Y., Cartron, P.F., Gallenne, T., Cauquil, N., Le Diguarher, T., Casara, P., Vallette, F.M., Manon, S., Hickman, J.A., et al. (2011). Bax activation by engagement with, then release from, the BH3 binding site of Bcl-xL. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 832–844.
- Geisler, S., Holmström, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J., and Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* *12*, 119–131.
- Germain, M., and Duronio, V. (2007). The N terminus of the anti-apoptotic BCL-2 homologue MCL-1 regulates its localization and function. *J. Biol. Chem.* *282*, 32233–32242.
- Germain, M., and Shore, G.C. (2003). Cellular distribution of Bcl-2 family proteins. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* *2003*, pe10.
- Giangrande, P.H., Zhu, W., Schlisio, S., Sun, X., Mori, S., Gaubatz, S., and Nevins, J.R. (2004). A role for E2F6 in distinguishing G1/S- and G2/M-specific transcription. *Genes Dev.* *18*, 2941–2951.
- Gilmore, A.P., Metcalfe, A.D., Romer, L.H., and Streuli, C.H. (2000). Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J. Cell Biol.* *149*, 431–446.
- Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I., and Green, D.R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol.* *2*, 156–162.
- Gomez-Gutierrez, J.G., Garcia-Garcia, A., Hao, H., Rao, X.-M., Montes de Oca-Luna, R., Zhou, H.S., and McMasters, K.M. (2010). Adenovirus-mediated expression of truncated E2F-1 suppresses tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer* *116*, 4420–4432.
- Gomez-Manzano, C., Mitlianga, P., Fueyo, J., Lee, H.Y., Hu, M., Spurgers, K.B., Glass, T.L., Koul, D., Liu, T.J., McDonnell, T.J., et al. (2001). Transfer of E2F-1 to human glioma cells results in transcriptional up-regulation of Bcl-2. *Cancer Res.* *61*, 6693–6697.
- Goto, Y., Hayashi, R., Kang, D., and Yoshida, K. (2006). Acute loss of transcription factor E2F1 induces

- mitochondrial biogenesis in HeLa cells. *J. Cell. Physiol.* **209**, 923–934.
- Gratas, C., Séry, Q., Rabé, M., Oliver, L., and Vallette, F.M. (2014). Bak and Mcl-1 are essential for Temozolomide induced cell death in human glioma. *Oncotarget* **5**, 2428–2435.
- Green, D.R., and Llambi, F. (2015). *Cell Death Signaling*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. **7**.
- Grimm, S., Bauer, M.K., Baeuerle, P.A., and Schulze-Osthoff, K. (1996). Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *J. Cell Biol.* **134**, 13–23.
- Gross, A., Yin, X.-M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S.J. (1999). Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, while BCL-XL Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death. *J. Biol. Chem.* **274**, 1156–1163.
- Große, L., Wurm, C.A., Brüser, C., Neumann, D., Jans, D.C., and Jakobs, S. (2016). Bax assembles into large ring-like structures remodeling the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *EMBO J.* **35**, 402–413.
- Gudi, R., Barkinge, J., Hawkins, S., Prabhakar, B., and Kanteti, P. (2009). Siva-1 promotes K-48 polyubiquitination of TRAF2 and inhibits TCR-mediated activation of NF-kappaB. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. Off. Organ Int. Soc. Environ. Toxicol. Cancer* **28**, 25–38.
- Guida, P., and Zhu, L. (1999). DP1 phosphorylation in multimeric complexes: weaker interaction with cyclin A through the E2F1 cyclin A binding domain leads to more efficient phosphorylation than stronger interaction through the p107 cyclin A binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**, 596–604.
- Guo, B., Zhai, D., Cabezas, E., Welsh, K., Nouraini, S., Satterthwait, A.C., and Reed, J.C. (2003). Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* **423**, 456–461.
- Guo, R., Chen, J., Zhu, F., Biswas, A.K., Berton, T.R., Mitchell, D.L., and Johnson, D.G. (2010). E2F1 localizes to sites of UV-induced DNA damage to enhance nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* **285**, 19308–19315.
- Guo, W., Zhang, Y., Ling, Z., Liu, X., Zhao, X., Yuan, Z., Nie, C., and Wei, Y. (2015). Caspase-3 feedback loop enhances Bid-induced AIF/endoG and Bak activation in Bax and p53-independent manner. *Cell Death Dis.* **6**, e1919.
- Hada, M., and Kwok, R.P. (2014). Regulation of ku70-bax complex in cells. *J. Cell Death* **7**, 11–13.
- Hada, M., Subramanian, C., Andrews, P.C., and Kwok, R.P.S. (2016). Cytosolic Ku70 regulates Bax-mediated cell death. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*
- Hagemeyer, C., Cook, A., and Kouzarides, T. (1993). The retinoblastoma protein binds E2F residues required for activation in vivo and TBP binding in vitro. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4998–5004.
- Hahn, F., Klein, C., Demmer, O., Marchenko, N., Vaseva, A., Moll, U.M., and Kessler, H. (2010). BclxL changes conformation upon binding to wild-type but not mutant p53 DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* **285**, 3439–3450.
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., Elia, A., de la Pompa, J.L., Kagi, D., Khoo, W., et al. (1998). Differential Requirement for Caspase 9 in Apoptotic Pathways In Vivo. *Cell* **94**, 339–352.
- Hallstrom, T.C., and Nevins, J.R. (2003). Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 10848–10853.
- Hallstrom, T.C., and Nevins, J.R. (2006). Jab1 is a specificity factor for E2F1-induced apoptosis. *Genes Dev.* **20**, 613–623.
- Han, J., Goldstein, L.A., Hou, W., Gastman, B.R., and Rabinowich, H. (2010). Regulation of mitochondrial apoptotic events by p53-mediated disruption of complexes between antiapoptotic Bcl-2 members and Bim. *J. Biol. Chem.* **285**, 22473–22483.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **353**.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Review: Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674.
- Hao, H., Chen, C., Rao, X.-M., Gomez-Gutierrez, J.G., Zhou, H.S., and McMasters, K.M. (2012). E2F-1- and E2Ftr-mediated apoptosis: the role of DREAM and HRK. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 605–615.
- Haraguchi, M., Torii, S., Matsuzawa, S., Xie, Z., Kitada, S., Krajewski, S., Yoshida, H., Mak, T.W., and Reed, J.C. (2000). Apoptotic Protease Activating Factor 1 (Apaf-1)-Independent Cell Death Suppression by Bcl-2. *J. Exp. Med.* **191**, 1709–1720.
- Hardwick, J.M., and Polster, B.M. (2002). Preview: Bax, along with Lipid Conspirators, Allows Cytochrome c to Escape Mitochondria. *Mol. Cell* **10**, 963–965.
- Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K.H., and Oren, M. (1995). Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.* **9**, 2170–2183.

- Hekman, M., Albert, S., Galmiche, A., Rennefahrt, U.E.E., Fueller, J., Fischer, A., Puehringer, D., Wiese, S., and Rapp, U.R. (2006). Reversible membrane interaction of BAD requires two C-terminal lipid binding domains in conjunction with 14-3-3 protein binding. *J. Biol. Chem.* *281*, 17321–17336.
- Hershko, T., and Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J. Biol. Chem.* *279*, 8627–8634.
- Hershko, T., Chaussepied, M., Oren, M., and Ginsberg, D. (2005). Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F. *Cell Death Differ.* *12*, 377–383.
- van den Heuvel, S., and Dyson, N.J. (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 713–724.
- Hiebert, S.W., Lipp, M., and Nevins, J.R. (1989). E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 3594–3598.
- Hilgendorf, K.I., Leshchiner, E.S., Nedelcu, S., Maynard, M.A., Calo, E., Ianari, A., Walensky, L.D., and Lees, J.A. (2013). The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria. *Genes Dev.* *27*, 1003–1015.
- Hinds, M.G., Lackmann, M., Skea, G.L., Harrison, P.J., Huang, D.C.S., and Day, C.L. (2003). The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO J.* *22*, 1497–1507.
- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S.A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* *15*, 1573.
- Hockings, C., Anwari, K., Ninnis, R.L., Brouwer, J., O’Hely, M., Evangelista, M., Hinds, M.G., Czabotar, P.E., Lee, E.F., Fairlie, W.D., et al. (2015). Bid chimeras indicate that most BH3-only proteins can directly activate Bak and Bax, and show no preference for Bak versus Bax. *Cell Death Dis.* *6*, e1735.
- Hour, T.C., Chen, L., and Lin, J.K. (2000). Suppression of transcription factor NF-kappaB activity by Bcl-2 protein in NIH3T3 cells: implication of a novel NF-kappaB p50-Bcl-2 complex for the anti-apoptotic function of Bcl-2. *Eur. J. Cell Biol.* *79*, 121–129.
- Hsieh, J.K., Fredersdorf, S., Kouzarides, T., Martin, K., and Lu, X. (1997). E2F1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction. *Genes Dev.* *11*, 1840–1852.
- Hsieh, J.-K., Yap, D., O’Connor, D.J., Fogal, V., Fallis, L., Chan, F., Zhong, S., and Lu, X. (2002). Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage. *Mol. Cell Biol.* *22*, 78–93.
- Hsu, Y.T., and Youle, R.J. (1997). Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J. Biol. Chem.* *272*, 13829–13834.
- Hsu, Y.-T., Wolter, K.G., and Youle, R.J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 3668–3672.
- Huang, H., Zegarra-Moro, O.L., Benson, D., and Tindall, D.J. (2004). Androgens repress Bcl-2 expression via activation of the retinoblastoma (RB) protein in prostate cancer cells. *Oncogene* *23*, 2161–2176.
- Huang, H.J., Yee, J.K., Shew, J.Y., Chen, P.L., Bookstein, R., Friedmann, T., Lee, E.Y., and Lee, W.H. (1988). Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* *242*, 1563–1566.
- Ianari, A., Gallo, R., Palma, M., Alesse, E., and Gulino, A. (2004). Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* *279*, 30830–30835.
- Ianari, A., Natale, T., Calo, E., Ferretti, E., Alesse, E., Screpanti, I., Haigis, K., Gulino, A., and Lees, J.A. (2009). Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer Cell* *15*, 184–194.
- Iaquinta, P.J., and Lees, J.A. (2007). Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 649–657.
- Ichim, G., Lopez, J., Ahmed, S.U., Muthalagu, N., Giampazolias, E., Delgado, M.E., Haller, M., Riley, J.S., Mason, S.M., Athineos, D., et al. (2015). Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Mol. Cell* *57*, 860–872.
- Ingram, L., Munro, S., Coutts, A.S., and La Thangue, N.B. (2011). E2F-1 regulation by an unusual DNA damage-responsive DP partner subunit. *Cell Death Differ.* *18*, 122–132.
- Inoue, Y., Kitagawa, M., and Taya, Y. (2007). Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. *EMBO J.* *26*, 2083–2093.
- Inuzuka, H., Fukushima, H., Shaik, S., Liu, P., Lau, A.W., and Wei, W. (2011). Mcl-1 ubiquitination and destruction. *Oncotarget* *2*, 239–244.
- Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H., et al. (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* *407*, 645–648.

- Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., and Nevins, J.R. (2001). Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol. Cell Biol.* **21**, 4684–4699.
- Ivanova, I.A., and Dagnino, L. (2007). Activation of p38 and CRM1-dependent nuclear export promotes E2F1 degradation during keratinocyte differentiation. *Oncogene* **26**, 1147–1154.
- Ivanova, I.A., Vespa, A., and Dagnino, L. (2007). A novel mechanism of E2F1 regulation via nucleocytoplasmic shuttling: determinants of nuclear import and export. *Cell Cycle Georget. Tex* **6**, 2186–2195.
- Ivanova, I.A., Nakrieko, K.-A., and Dagnino, L. (2009). Phosphorylation by p38 MAP kinase is required for E2F1 degradation and keratinocyte differentiation. *Oncogene* **28**, 52–62.
- Iwamoto, M., Banerjee, D., Menon, L.G., Jurkiewicz, A., Rao, P.H., Kemeny, N.E., Fong, Y., Jhanwar, S.C., Gorlick, R., and Bertino, J.R. (2004). Overexpression of E2F-1 in lung and liver metastases of human colon cancer is associated with gene amplification. *Cancer Biol. Ther.* **3**, 395–399.
- Jiang, H., Martin, V., Gomez-Manzano, C., Johnson, D.G., Alonso, M., White, E., Xu, J., McDonnell, T.J., Shinojima, N., and Fueyo, J. (2010). The RB-E2F1 pathway regulates autophagy. *Cancer Res.* **70**, 7882–7893.
- Jiao, W., Datta, J., Lin, H.-M., Dundr, M., and Rane, S.G. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling of the retinoblastoma tumor suppressor protein via Cdk phosphorylation-dependent nuclear export. *J. Biol. Chem.* **281**, 38098–38108.
- Jiao, W., Lin, H.-M., Datta, J., Braunschweig, T., Chung, J.-Y., Hewitt, S.M., and Rane, S.G. (2008). Aberrant nucleocytoplasmic localization of the retinoblastoma tumor suppressor protein in human cancer correlates with moderate/poor tumor differentiation. *Oncogene* **27**, 3156–3164.
- Jin, Y.-Q., An, G.-S., Ni, J.-H., Li, S.-Y., and Jia, H.-T. (2014). ATM-dependent E2F1 accumulation in the nucleolus is an indicator of ribosomal stress in early response to DNA damage. *Cell Cycle Georget. Tex* **13**, 1627–1638.
- Jin, Z., May, W.S., Gao, F., Flagg, T., and Deng, X. (2006). Bcl2 suppresses DNA repair by enhancing c-Myc transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **281**, 14446–14456.
- Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D., and Nevins, J.R. (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **365**, 349–352.
- Johnson, D.G., Cress, W.D., Jakoi, L., and Nevins, J.R. (1994). Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 12823–12827.
- Jone, J.M., Datta, P., Srinivasula, S.M., Ji, W., Gupta, S., ZhiJia Zhang, Davies, E., Hajnóczky, G., Saunders, T.L., Van Keuren, M.L., et al. (2003). Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice. *Nature* **425**, 721.
- JOST, C.A., GINSBERG, D., and KAELIN, J., WILLIAM G. (1996). A Conserved Region of Unknown Function Participates in the Recognition of E2F Family Members by the Adenovirus E4 ORF 6/7 Protein. *Virology* **220**, 78–90.
- Jost, C.A., Marin, M.C., and Kaelin, W.G. (1997). p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* **389**, 191–194.
- Jourdain, A., and Martinou, J.-C. (2009). Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1884–1889.
- Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., and Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 455–465.
- Karbowski, M., Norris, K.L., Cleland, M.M., Jeong, S.-Y., and Youle, R.J. (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* **443**, 658–662.
- Kasim, V., Huang, C., Zhang, J., Jia, H., Wang, Y., Yang, L., Miyagishi, M., and Wu, S. (2014). Synergistic cooperation of MDM2 and E2F1 contributes to TAp73 transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **449**, 319–326.
- Kaufmann, T., Schlipf, S., Sanz, J., Neubert, K., Stein, R., and Borner, C. (2003). Characterization of the signal that directs Bcl-xL, but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* **160**, 53–64.
- Kaur, J., and Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 461–472.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.-C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., and Cheng, E.H.-Y. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1348–1358.
- Kinnally, K.W., and Antonsson, B. (2007). A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **12**, 857–868.
- Kitagawa, M., Lee, S.H., and McCormick, F. (2008). Skp2 suppresses p53-dependent apoptosis by inhibiting p300. *Mol. Cell* **29**, 217–231.

- Klumpp, S., Selke, D., and Kriegstein, J. (2003). Protein phosphatase type 2C dephosphorylates BAD. *Neurochem. Int.* *42*, 555–560.
- Knudson, A.G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *68*, 820–823.
- Kolluri, S.K., Zhu, X., Zhou, X., Lin, B., Chen, Y., Sun, K., Tian, X., Town, J., Cao, X., Lin, F., et al. (2008). A short Nur77-derived peptide converts Bcl-2 from a protector to a killer. *Cancer Cell* *14*, 285–298.
- Komori, H., Enomoto, M., Nakamura, M., Iwanaga, R., and Ohtani, K. (2005). Distinct E2F-mediated transcriptional program regulates p14ARF gene expression. *EMBO J.* *24*, 3724–3736.
- Kontaki, H., and Talianidis, I. (2010). Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Mol. Cell* *39*, 152–160.
- Kouzarides, T. (1993). Transcriptional regulation by the retinoblastoma protein. *Trends Cell Biol.* *3*, 211–213.
- Kovesdi, I., Reichel, R., and Nevins, J.R. (1986). Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* *45*, 219–228.
- Kowalik, T.F., DeGregori, J., Schwarz, J.K., and Nevins, J.R. (1995). E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis. *J. Virol.* *69*, 2491–2500.
- Krek, W., Ewen, M.E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, W.G., and Livingston, D.M. (1994). Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* *78*, 161–172.
- Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* *331*.
- Kwon, M.J., Nam, E.S., Cho, S.J., Park, H.R., Shin, H.S., Park, J.H., Park, C.H., and Lee, W.J. (2010). E2F1 expression predicts outcome in Korean women who undergo surgery for breast carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* *17*, 564–571.
- Lai, A., Lee, J.M., Yang, W.M., DeCaprio, J.A., Kaelin, W.G., Seto, E., and Branton, P.E. (1999). RBP1 recruits both histone deacetylase-dependent and -independent repression activities to retinoblastoma family proteins. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6632–6641.
- Lalier, L., Cartron, P.-F., Olivier, C., Logé, C., Bougras, G., Robert, J.-M., Oliver, L., and Vallette, F.M. (2011). Prostaglandins antagonistically control Bax activation during apoptosis. *Cell Death Differ.* *18*, 528–537.
- Landeta, O., Landajuena, A., Gil, D., Taneva, S., Di Primo, C., Sot, B., Valle, M., Frolov, V.A., and Basañez, G. (2011). Reconstitution of proapoptotic BAK function in liposomes reveals a dual role for mitochondrial lipids in the BAK-driven membrane permeabilization process. *J. Biol. Chem.* *286*, 8213–8230.
- Lang, S.E., McMahon, S.B., Cole, M.D., and Hearing, P. (2001). E2F transcriptional activation requires TRRAP and GCN5 cofactors. *J. Biol. Chem.* *276*, 32627–32634.
- Lartigue, L., Medina, C., Schembri, L., Chabert, P., Zanese, M., Tomasello, F., Dalibart, R., Thoraval, D., Crouzet, M., Ichas, F., et al. (2008). An intracellular wave of cytochrome c propagates and precedes Bax redistribution during apoptosis.
- Lauterwasser, J., Todt, F., Zerbes, R.M., Nguyen, T.N., Craigen, W., Lazarou, M., van der Laan, M., and Edlich, F. (2016). The porin VDAC2 is the mitochondrial platform for Bax retrotranslocation. *Sci. Rep.* *6*, 32994.
- Lazarou, M., Stojanovski, D., Frazier, A.E., Kotevski, A., Dewson, G., Craigen, W.J., Kluck, R.M., Vaux, D.L., and Ryan, M.T. (2010). Inhibition of Bak activation by VDAC2 is dependent on the Bak transmembrane anchor. *J. Biol. Chem.* *285*, 36876–36883.
- Lazzerini Denchi, E., and Helin, K. (2005). E2F1 is crucial for E2F-dependent apoptosis. *EMBO Rep.* *6*, 661–668.
- Le Pen, J., Laurent, M., Sarosiek, K., Vuillier, C., Gautier, F., Montessuit, S., Martinou, J.C., Letaï, A., Braun, F., and Juin, P.P. (2016). Constitutive p53 heightens mitochondrial apoptotic priming and favors cell death induction by BH3 mimetic inhibitors of BCL-xL. *Cell Death Dis.* *7*, e2083.
- Leber, B., Lin, J., and Andrews, D.W. (2007). Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *12*, 897–911.
- Lee, B.-K., Bhinge, A.A., and Iyer, V.R. (2011). Wide-ranging functions of E2F4 in transcriptional activation and repression revealed by genome-wide analysis. *Nucleic Acids Res.* *39*, 3558–3573.
- Lee, E.F., Czabotar, P.E., Smith, B.J., Deshayes, K., Zobel, K., Colman, P.M., and Fairlie, W.D. (2007). Crystal structure of ABT-737 complexed with Bcl-xL: implications for selectivity of antagonists of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ.* *14*, 1711–1713.
- Lee, J., Kim, C.-H., Simon, D.K., Aminova, L.R., Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Murphy, A.N., Lonze, B.E., Kim, K.-S., Ginty, D.D., et al. (2005). Mitochondrial cyclic AMP response element-binding protein (CREB) mediates mitochondrial gene expression and neuronal survival. *J. Biol. Chem.* *280*, 40398–40401.
- Lee, J., Park, C.K., Park, J.O., Lim, T., Park, Y.S., Lim, H.Y., Lee, I., Sohn, T.S., Noh, J.H., Heo, J.S., et al. (2008). Impact of E2F-1 expression on clinical outcome of gastric adenocarcinoma patients with adjuvant

- chemoradiation therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 82–88.
- Lee, Y., Jeong, S.-Y., Karbowski, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol. Biol. Cell* *15*, 5001–5011.
- Leigh-Brown, S., Enriquez, J.A., and Odom, D.T. (2010). Nuclear transcription factors in mammalian mitochondria. *Genome Biol.* *11*, 215.
- Leone, G., Nuckolls, F., Ishida, S., Adams, M., Sears, R., Jakoi, L., Miron, A., and Nevins, J.R. (2000). Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 3626–3632.
- Lessene, G., Czabotar, P.E., Sleebs, B.E., Zobel, K., Lowes, K.N., Adams, J.M., Baell, J.B., Colman, P.M., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., et al. (2013). Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 390–397.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* *2*, 183–192.
- Leu, J.I.-J., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., and George, D.L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol.* *6*, 443–450.
- Leung, J.Y., and Nevins, J.R. (2012). E2F6 associates with BRG1 in transcriptional regulation. *PLoS One* *7*, e47967.
- Levine, B. (2007). Cell biology: Autophagy and cancer. *Nature* *745*.
- Li, K., Li, Y., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Spencer, E., Chen, Z.J., Wang, X., and Williams, R.S. (2000). Cytochrome c Deficiency Causes Embryonic Lethality and Attenuates Stress-Induced Apoptosis. *Cell* *101*, 389–399.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479–489.
- Liban, T.J., Thwaites, M.J., Dick, F.A., and Rubin, S.M. (2016). Structural Conservation and E2F Binding Specificity within the Retinoblastoma Pocket Protein Family. *J. Mol. Biol.*
- Lill, R., and Neupert, W. (1996). Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane. *Trends Cell Biol.* *6*, 56–61.
- Lin, B., Kolluri, S.K., Lin, F., Liu, W., Han, Y.-H., Cao, X., Dawson, M.I., Reed, J.C., and Zhang, X. (2004). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* *116*, 527–540.
- Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R. (2001). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev.* *15*, 1833–1844.
- Lind, E.F., Wayne, J., Wang, Q.Z., Staeva, T., Stolzer, A., and Petrie, H.T. (1999). Bcl-2-induced changes in E2F regulatory complexes reveal the potential for integrated cell cycle and cell death functions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 5374–5379.
- Lindenboim, L., Kringel, S., Braun, T., Borner, C., and Stein, R. (2005). Bak but not Bax is essential for Bcl-xS-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* *12*, 713–723.
- Lindenboim, L., Borner, C., and Stein, R. (2011). Nuclear proteins acting on mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 584–596.
- Lindsay, J., Esposti, M.D., and Gilmore, A.P. (2011). Bcl-2 proteins and mitochondria--specificity in membrane targeting for death. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 532–539.
- Lithgow, T., van Driel, R., Bertram, J.F., and Strasser, A. (1994). The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *5*, 411–417.
- Liu, G., and Xirodimas, D.P. (2010). NUB1 promotes cytoplasmic localization of p53 through cooperation of the NEDD8 and ubiquitin pathways. *Oncogene* *29*, 2252–2261.
- Liu, B., Shats, I., Angus, S.P., Gatz, M.L., and Nevins, J.R. (2013). Interaction of E2F7 transcription factor with E2F1 and C-terminal-binding protein (CtBP) provides a mechanism for E2F7-dependent transcription repression. *J. Biol. Chem.* *288*, 24581–24589.
- Liu, D., Wei, Y., Zhou, F., Ge, Y., Xu, J., Chen, H., Zhang, W., Yun, X., and Jiang, J. (2008a). E1AF promotes mithramycin A-induced Huh-7 cell apoptosis depending on its DNA-binding domain. *Arch. Biochem. Biophys.* *477*, 20–26.
- Liu, J., Zhou, W., Li, S.-S., Sun, Z., Lin, B., Lang, Y.-Y., He, J.-Y., Cao, X., Yan, T., Wang, L., et al. (2008b). Modulation of orphan nuclear receptor Nur77-mediated apoptotic pathway by acetylshikonin and analogues. *Cancer Res.* *68*, 8871–8880.
- Liu, K., Lin, F.-T., Ruppert, J.M., and Lin, W.-C. (2003). Regulation of E2F1 by BRCT domain-containing protein TopBP1. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 3287–3304.
- Liu, K., Luo, Y., Lin, F.-T., and Lin, W.-C. (2004). TopBP1 recruits Brg1/Brm to repress E2F1-induced apoptosis, a

- novel pRb-independent and E2F1-specific control for cell survival. *Genes Dev.* *18*, 673–686.
- Liu, K., Paik, J.C., Wang, B., Lin, F.-T., and Lin, W.-C. (2006). Regulation of TopBP1 oligomerization by Akt/PKB for cell survival. *EMBO J.* *25*, 4795–4807.
- Liu, Z., Wild, C., Ding, Y., Ye, N., Chen, H., Wold, E.A., and Zhou, J. (2016). BH4 domain of Bcl-2 as a novel target for cancer therapy. *Drug Discov. Today* *21*, 989–996.
- Lizé, M., Pilarski, S., and Dobbelstein, M. (2010). E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell Death Differ.* *17*, 452–458.
- Lizé, M., Klimke, A., and Dobbelstein, M. (2011). MicroRNA-449 in cell fate determination. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 2874–2882.
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol. Cell* *44*, 517–531.
- Loftus, S.J., Liu, G., Carr, S.M., Munro, S., and La Thangue, N.B. (2012). NEDDylation regulates E2F-1-dependent transcription. *EMBO Rep.* *13*, 811–818.
- Logan, N., Graham, A., Zhao, X., Fisher, R., Maiti, B., Leone, G., and La Thangue, N.B. (2005). E2F-8: an E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. *Oncogene* *24*, 5000–5004.
- Lopez, J., and Tait, S.W.G. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br. J. Cancer* *112*, 957–962.
- Lopez, J., Bessou, M., Riley, J.S., Giampazolias, E., Todt, F., Rochegüe, T., Oberst, A., Green, D.R., Edlich, F., Ichim, G., et al. (2016). Mito-priming as a method to engineer Bcl-2 addiction. *Nat. Commun.* *7*, 10538.
- Lorenzo, H.K., Susin, S.A., Penninger, J., and Kroemer, G. (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ.* *6*, 516–524.
- Loughran, O., and La Thangue, N.B. (2000). Apoptotic and growth-promoting activity of E2F modulated by MDM2. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 2186–2197.
- Louie, M.C., Zou, J.X., Rabinovich, A., and Chen, H.-W. (2004). ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 5157–5171.
- Lovell, J.F., Billen, L.P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* *135*, 1074–1084.
- Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* *432*, 307–315.
- Lu, Q., and Hong, W. (2009). Bcl2 enhances c-Myc-mediated MMP-2 expression of vascular smooth muscle cells. *Cell. Signal.* *21*, 1054–1059.
- Lukas, J., Petersen, B.O., Holm, K., Bartek, J., and Helin, K. (1996). Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 1047–1057.
- Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* *107*, 137–148.
- Luo, R.X., Postigo, A.A., and Dean, D.C. (1998). Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* *92*, 463–473.
- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., and Wang, X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* *2*, 754–761.
- Ma, S.B., Nguyen, T.N., Tan, I., Ninnis, R., Iyer, S., Stroud, D.A., Menard, M., Kluck, R.M., Ryan, M.T., and Dewson, G. (2014). Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function. *Cell Death Differ.* *21*, 1925–1935.
- Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J.P., Troalen, F., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* *391*, 601–605.
- Mahanic, C.S., Budhavarapu, V., Graves, J.D., Li, G., and Lin, W.-C. (2015). Regulation of E2 Promoter Binding Factor 1 (E2F1) transcriptional activity through a deubiquitinating enzyme, UCH37. *J. Biol. Chem.*
- Makin, G.W., Corfe, B.M., Griffiths, G.J., Thistlethwaite, A., Hickman, J.A., and Dive, C. (2001). Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate. *EMBO J.* *20*, 6306–6315.
- Mantovani, F., Tocco, F., Girardini, J., Smith, P., Gasco, M., Lu, X., Crook, T., and Del Sal, G. (2007). The prolyl isomerase Pin1 orchestrates p53 acetylation and dissociation from the apoptosis inhibitor iASPP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 912–920.
- Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J., and Lemoine, N.R. (2002). Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 3577–3589.
- Marchenko, N.D., and Moll, U.M. (2007). The role of ubiquitination in the direct mitochondrial death program of p53. *Cell Cycle Georget. Tex* *6*, 1718–1723.

- Marchenko, N.D., Zaika, A., and Moll, U.M. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* *275*, 16202–16212.
- Marchenko, N.D., Wolff, S., Erster, S., Becker, K., and Moll, U.M. (2007). Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *EMBO J.* *26*, 923–934.
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., and Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 81–94.
- Markham, D., Munro, S., Soloway, J., O'Connor, D.P., and La Thangue, N.B. (2006). DNA-damage-responsive acetylation of pRb regulates binding to E2F-1. *EMBO Rep.* *7*, 192–198.
- Marti, A., Wirbelauer, C., Scheffner, M., and Krek, W. (1999). Interaction between ubiquitin–protein ligase SCF^{SKP2} and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat. Cell Biol.* *1*, 14–19.
- Martin, K., Trouche, D., Hagemeier, C., and Kouzarides, T. (1995a). Regulation of transcription by E2F1/DP1. *J. Cell Sci. Suppl.* *19*, 91–94.
- Martin, K., Trouche, D., Hagemeier, C., Sørensen, T.S., La Thangue, N.B., and Kouzarides, T. (1995b). Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature* *375*, 691–694.
- Martínez-Abundis, E., Correa, F., Rodríguez, E., Soria-Castro, E., Rodríguez-Zavala, J.S., Pacheco-Alvarez, D., and Zazueta, C. (2011). A CRAC-like motif in BAX sequence: relationship with protein insertion and pore activity in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*, 1888–1895.
- Mason, S.L., Loughran, O., and La Thangue, N.B. (2002). p14(ARF) regulates E2F activity. *Oncogene* *21*, 4220–4230.
- Merdzhanova, G., Edmond, V., De Seranno, S., Van den Broeck, A., Corcos, L., Brambilla, C., Brambilla, E., Gazzeri, S., and Eymis, B. (2008). E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ.* *15*, 1815–1823.
- Mignard, V., Lalier, L., Paris, F., and Vallette, F.M. (2014). Bioactive lipids and the control of Bax pro-apoptotic activity. *Cell Death Dis.* *5*, e1266.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* *11*, 577–590.
- Miller, A.V., Hicks, M.A., Nakajima, W., Richardson, A.C., Windle, J.J., and Harada, H. (2013). Paclitaxel-induced apoptosis is BAK-dependent, but BAX and BIM-independent in breast tumor. *PLoS One* *8*, e60685.
- Minn, A.J., Vélez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M., and Thompson, C.B. (1997). Bcl-xL forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* *385*, 353–357.
- Mitchell, K.O., Ricci, M.S., Miyashita, T., Dicker, D.T., Jin, Z., Reed, J.C., and El-Deiry, W.S. (2000). Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res.* *60*, 6318–6325.
- Moldoveanu, T., Follis, A.V., Kriwacki, R.W., and Green, D.R. (2014). Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 101–111.
- Monaco, G., Vervliet, T., Akl, H., and Bultynck, G. (2013). The selective BH4-domain biology of Bcl-2-family members: IP3Rs and beyond. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 1171–1183.
- Montero, J., Sarosiek, K.A., DeAngelo, J.D., Maertens, O., Ryan, J., Ercan, D., Piao, H., Horowitz, N.S., Berkowitz, R.S., Matulonis, U., et al. (2015). Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. *Cell* *160*, 977–989.
- Morgunova, E., Yin, Y., Jolma, A., Dave, K., Schmierer, B., Popov, A., Eremina, N., Nilsson, L., and Taipale, J. (2015). Structural insights into the DNA-binding specificity of E2F family transcription factors. *Nat. Commun.* *6*, 10050.
- Moroni, M.C., Hickman, E.S., Lazzarini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Müller, H., and Helin, K. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat. Cell Biol.* *3*, 552–558.
- Muchmore, S. w., Sattler, M., Heng Liang, Meadows, R. p., Harlan, J. e., Ho Sup Yoon, Nettesheim, D., Chang, B. s., Thompson, C. b., Sui-Lam Wong, et al. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* *381*, 335–341.
- Müller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D., and Helin, K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev.* *15*, 267–285.
- Mundle, S.D., and Saberwal, G. (2003). Evolving intricacies and implications of E2F1 regulation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 569–574.
- Münger, K., Scheffner, M., Huibregtse, J.M., and Howley, P.M. (1992). Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surv.* *12*, 197–217.
- Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R.V., McCurrach, M.E., Jacobson, M.D., Narita, M., Zhang, M.Q., Lazebnik, Y., Bar-Sagi, D., and Lowe, S.W. (2002). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat. Cell Biol.* *4*, 859–864.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and

- Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* *434*, 652–658.
- Nakajima, W., Sharma, K., Lee, J.Y., Maxim, N.T., Hicks, M.A., Vu, T.-T., Luu, A., Yeudall, W.A., Tanaka, N., and Harada, H. (2016). DNA damaging agent-induced apoptosis is regulated by MCL-1 phosphorylation and degradation mediated by the Noxa/MCL-1/CDK2 complex. *Oncotarget*.
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Hsu, Y.T., and Youle, R.J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J.* *18*, 2330–2341.
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Lamensdorf, I., Yoon, S.-H., and Youle, R.J. (2001). Bax and Bak Coalesce into Novel Mitochondria-Associated Clusters during Apoptosis. *J. Cell Biol.* *153*, 1265–1276.
- Nelson, M.A., Reynolds, S.H., Rao, U.N.M., Goulet, A.-C., Feng, Y., Beas, A., Honchak, B., Averill, J., Lowry, D.T., Senft, J.R., et al. (2006). Increased gene copy number of the transcription factor E2F1 in malignant melanoma. *Cancer Biol. Ther.* *5*, 407–412.
- Neuspiel, M., Zunino, R., Gangaraju, S., Rippstein, P., and McBride, H. (2005). Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J. Biol. Chem.* *280*, 25060–25070.
- Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O’Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E., et al. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* *412*, 561–565.
- Nikiforov, M.A., Riblett, M., Tang, W.-H., Gratchouck, V., Zhuang, D., Fernandez, Y., Verhaegen, M., Varambally, S., Chinnaiyan, A.M., Jakubowiak, A.J., et al. (2007). Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 19488–19493.
- Nomura, M., Shimizu, S., Sugiyama, T., Narita, M., Ito, T., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (2003). 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J. Biol. Chem.* *278*, 2058–2065.
- Nowak, K., Killmer, K., Gessner, C., and Lutz, W. (2007). E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a. *Biochim. Biophys. Acta* *1769*, 244–252.
- Obexer, P., Geiger, K., Ambros, P.F., Meister, B., and Ausserlechner, M.J. (2007). FKHL1-mediated expression of Noxa and Bim induces apoptosis via the mitochondria in neuroblastoma cells. *Cell Death Differ.* *14*, 534–547.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., et al. (2000). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* *102*, 849–862.
- Oh, W., Lee, E.-W., Sung, Y.H., Yang, M.-R., Ghim, J., Lee, H.-W., and Song, J. (2006). Jab1 induces the cytoplasmic localization and degradation of p53 in coordination with Hdm2. *J. Biol. Chem.* *281*, 17457–17465.
- Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., et al. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* *435*, 677–681.
- O’Reilly, L.A., Huang, D.C., and Strasser, A. (1996). The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *EMBO J.* *15*, 6979–6990.
- O’Reilly, L.A., Print, C., Hausmann, G., Moriishi, K., Cory, S., Huang, D.C., and Strasser, A. (2001). Tissue expression and subcellular localization of the pro-survival molecule Bcl-w. *Cell Death Differ.* *8*, 486–494.
- Oren, M. (1985). The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim. Biophys. Acta* *823*, 67–78.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 552–565.
- O’Sullivan, R.J., and Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 171–181.
- Paik, J.C., Wang, B., Liu, K., Lue, J.K., and Lin, W.-C. (2010). Regulation of E2F1-induced apoptosis by the nucleolar protein RRP1B. *J. Biol. Chem.* *285*, 6348–6363.
- Parone, P.A., James, D.I., Da Cruz, S., Mattenberger, Y., Donzé, O., Barja, F., and Martinou, J.-C. (2006). Inhibiting the mitochondrial fission machinery does not prevent Bax/Bak-dependent apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 7397–7408.
- Pasquier, B. (2016). Autophagy inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *73*, 985–1001.
- Pearson, A., and Greenblatt, J. (1997). Modular organization of the E2F1 activation domain and its interaction with general transcription factors TBP and TFIID. *Oncogene* *15*, 2643–2658.
- Pediconi, N., Ianari, A., Costanzo, A., Belloni, L., Gallo, R., Cimino, L., Porcellini, A., Screpanti, I., Balsano, C., Alesse, E., et al. (2003). Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* *5*, 552–558.
- Peng, R., Tong, J.-S., Li, H., Yue, B., Zou, F., Yu, J., and Zhang, L. (2013). Targeting Bax interaction sites reveals

that only homo-oligomerization sites are essential for its activation. *Cell Death Differ.* 20, 744–754.

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

Perissi, V., and Rosenfeld, M.G. (2005). Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 542–554.

Petit, P.X., Dupaigne, P., Pariselli, F., Gonzalez, F., Etienne, F., Rameau, C., and Bernard, S. (2009). Interaction of the alpha-helical H6 peptide from the pro-apoptotic protein tBid with cardiolipin. *FEBS J.* 276, 6338–6354.

Petros, A.M., Gunasekera, A., Xu, N., Olejniczak, E.T., and Fesik, S.W. (2004). Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x(L)-binding interface using NMR. *FEBS Lett.* 559, 171–174.

Pfanner, N., and Meijer, M. (1997). The Tom and Tim machine. *Curr. Biol.* CB 7, R100-103.

Phillips, A.C., Bates, S., Ryan, K.M., Helin, K., and Vousden, K.H. (1997). Induction of DNA synthesis and apoptosis are separable functions of E2F-1. *Genes Dev.* 11, 1853–1863.

Phillips, A.C., Ernst, M.K., Bates, S., Rice, N.R., and Vousden, K.H. (1999). E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol. Cell* 4, 771–781.

Phillips, D.C., Xiao, Y., Lam, L.T., Litvinovich, E., Roberts-Rapp, L., Souers, A.J., and Levenson, J.D. (2015). Loss in MCL-1 function sensitizes non-Hodgkin's lymphoma cell lines to the BCL-2-selective inhibitor venetoclax (ABT-199). *Blood Cancer J.* 5, e368.

Pierce, A.M., Gimenez-Conti, I.B., Schneider-Broussard, R., Martinez, L.A., Conti, C.J., and Johnson, D.G. (1998). Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8858–8863.

Pietsch, E.C., Perchiniak, E., Canutescu, A.A., Wang, G., Dunbrack, R.L., and Murphy, M.E. (2008). Oligomerization of BAK by p53 utilizes conserved residues of the p53 DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* 283, 21294–21304.

Plötz, M., Gillissen, B., Hossini, A.M., Daniel, P.T., and Eberle, J. (2012). Disruption of the VDAC2-Bak interaction by Bcl-x(S) mediates efficient induction of apoptosis in melanoma cells. *Cell Death Differ.* 19, 1928–1938.

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

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

Poppy Roworth, A., Ghari, F., and La Thangue, N.B. (2015). To live or let die - complexity within the E2F1 pathway. *Mol. Cell. Oncol.* 2, e970480.

Postma, C., Hermsen, M. a. J.A., Coffa, J., Baak, J.P.A., Mueller, J.D., Mueller, E., Bethke, B., Schouten, J.P., Stolte, M., and Meijer, G.A. (2005). Chromosomal instability in flat adenomas and carcinomas of the colon. *J. Pathol.* 205, 514–521.

Prudent, J., Zunino, R., Sugiura, A., Mattie, S., Shore, G.C., and McBride, H.M. (2015). MAPL SUMOylation of Drp1 Stabilizes an ER/Mitochondrial Platform Required for Cell Death. *Mol. Cell* 59, 941–955.

Puthalakath, H., and Strasser, A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* 9, 505–512.

Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., and Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell* 3, 287–296.

Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C., and Strasser, A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293, 1829–1832.

Pützer, B.M., and Engelmann, D. (2013a). E2F1 apoptosis counterattacked: evil strikes back. *Trends Mol. Med.* 19, 89–98.

Pützer, B.M., and Engelmann, D. (2013b). E2F1 apoptosis counterattacked: evil strikes back. *Trends Mol. Med.* 19, 89–98.

Qian, Y., Luckey, C., Horton, L., Esser, M., and Templeton, D.J. (1992). Biological function of the retinoblastoma protein requires distinct domains for hyperphosphorylation and transcription factor binding. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5363–5372.

Qin, X.Q., Livingston, D.M., Kaelin, W.G., and Adams, P.D. (1994). Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10918–10922.

Quinn, L.M., and Richardson, H. (2004). Bcl-2 in cell cycle regulation. *Cell Cycle Georget. Tex* 3, 7–9.

Raemy, E., Montessuit, S., Pierredon, S., van Kampen, A.H., Vaz, F.M., and Martinou, J.-C. (2016). Cardiolipin or MTCH2 can serve as tBID receptors during apoptosis. *Cell Death Differ.* 23, 1165–1174.

Ray, R.M., Bhattacharya, S., and Johnson, L.R. (2011). Mdm2 inhibition induces apoptosis in p53 deficient

- human colon cancer cells by activating p73- and E2F1-mediated expression of PUMA and Siva-1. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 16, 35–44.
- Rayman, J.B., Takahashi, Y., Indjeian, V.B., Dannenberg, J.-H., Catchpole, S., Watson, R.J., te Riele, H., and Dynlacht, B.D. (2002). E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev.* 16, 933–947.
- Real, P.J., Sanz, C., Gutierrez, O., Pipaon, C., Zubiaga, A.M., and Fernandez-Luna, J.L. (2006). Transcriptional activation of the proapoptotic bik gene by E2F proteins in cancer cells. *FEBS Lett.* 580, 5905–5909.
- Real, S., Espada, L., Espinet, C., Santidrián, A.F., and Tauler, A. (2010). Study of the in vivo phosphorylation of E2F1 on Ser403. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 912–918.
- Rehm, M., Düßmann, H., and Prehn, J.H.M. (2003). Real-time single cell analysis of Smac/DIABLO release during apoptosis.
- Rehm, M., Huber, H.J., Hellwig, C.T., Anguissola, S., Dussmann, H., and Prehn, J.H.M. (2009). Dynamics of outer mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis. *Cell Death Differ.* 16, 613–623.
- Reichel, R., Neill, S.D., Kovsdi, I., Simon, M.C., Raychaudhuri, P., and Nevins, J.R. (1989). The adenovirus E4 gene, in addition to the E1A gene, is important for trans-activation of E2 transcription and for E2F activation. *J. Virol.* 63, 3643–3650.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A., and Dynlacht, B.D. (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev.* 16, 245–256.
- Renault, T.T., Teijido, O., Antonsson, B., Dejean, L.M., and Manon, S. (2013). Regulation of Bax mitochondrial localization by Bcl-2 and Bcl-x(L): keep your friends close but your enemies closer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 64–67.
- Renault, T.T., Teijido, O., Missire, F., Ganesan, Y.T., Velours, G., Arokium, H., Beaumatin, F., Llanos, R., Athané, A., Camougrand, N., et al. (2015). Bcl-xL stimulates Bax relocation to mitochondria and primes cells to ABT-737. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 64, 136–146.
- Renault, T.T., Dejean, L.M., and Manon, S. (2016). A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl-xL and Bcl-2. *Mech. Ageing Dev.*
- Reymond, N., d’Agua, B.B., and Ridley, A.J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 858.
- Riedl, S.J., and Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 405–413.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Ferrari, D., Chami, M., Szabadkai, G., Magalhães, P.J., Di Virgilio, F., and Pozzan, T. (2003). Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene* 22, 8619–8627.
- Robertson, K.D., and Jones, P.A. (1998). The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6457–6473.
- Robertson, K.D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P.A., Jones, P.L., and Wolffe, A.P. (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat. Genet.* 25, 338–342.
- Rodriguez, J.M., Glozak, M.A., Ma, Y., and Cress, W.D. (2006). Bok, Bcl-2-related Ovarian Killer, Is Cell Cycle-regulated and Sensitizes to Stress-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 281, 22729–22735.
- Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Frame, F.M., Debatis, M.E., Sanchez, Y., Jones, S., and Kowalik, T.F. (2004). Apoptosis associated with deregulated E2F activity is dependent on E2F1 and Atm/Nbs1/Chk2. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2968–2977.
- Ross, J.F., Liu, X., and Dynlacht, B.D. (1999). Mechanism of transcriptional repression of E2F by the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Mol. Cell* 3, 195–205.
- Rounbehler, R.J., Rogers, P.M., Conti, C.J., and Johnson, D.G. (2002). Inactivation of E2f1 enhances tumorigenesis in a Myc transgenic model. *Cancer Res.* 62, 3276–3281.
- Roy, S.S., Ehrlich, A.M., Craigen, W.J., and Hajnóczky, G. (2009). VDAC2 is required for truncated BID-induced mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria. *EMBO Rep.* 10, 1341–1347.
- Rubin, S.M., Gall, A.-L., Zheng, N., and Pavletich, N.P. (2005). Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release. *Cell* 123, 1093–1106.
- Ruffolo, S.C., and Shore, G.C. (2003). BCL-2 selectively interacts with the BID-induced open conformer of BAK, inhibiting BAK auto-oligomerization. *J. Biol. Chem.* 278, 25039–25045.
- Russell, J.L., Powers, J.T., Rounbehler, R.J., Rogers, P.M., Conti, C.J., and Johnson, D.G. (2002). ARF differentially modulates apoptosis induced by E2F1 and Myc. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1360–1368.
- Russell, J.L., Weakes, R.L., Berton, T.R., and Johnson, D.G. (2006). E2F1 suppresses skin carcinogenesis via the ARF-p53 pathway. *Oncogene* 25, 867–876.
- Ryo, A., Liou, Y.-C., Wulf, G., Nakamura, M., Lee, S.W., and Lu, K.P. (2002). PIN1 is an E2F target gene essential

for Neu/Ras-induced transformation of mammary epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5281–5295.

Saito, M., Helin, K., Valentine, M.B., Griffith, B.B., Willman, C.L., Harlow, E., and Look, A.T. (1995). Amplification of the E2F1 transcription factor gene in the HEL erythroleukemia cell line. *Genomics* 25, 130–138.

Saito, M., Korsmeyer, S.J., and Schlesinger, P.H. (2000). BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat. Cell Biol.* 2, 553–555.

Salvador-Gallego, R., Mund, M., Cosentino, K., Schneider, J., Unsay, J., Schraermeyer, U., Engelhardt, J., Ries, J., and García-Sáez, A.J. (2016). Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. *EMBO J.* 35, 389–401.

Samuels-Lev, Y., O'Connor, D.J., Bergamaschi, D., Trigiante, G., Hsieh, J.K., Zhong, S., Campargue, I., Naumovski, L., Crook, T., and Lu, X. (2001). ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol. Cell* 8, 781–794.

Sani, M.-A., Dufourc, E.J., and Gröbner, G. (2009). How does the Bax-alpha1 targeting sequence interact with mitochondrial membranes? The role of cardiolipin. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 623–631.

Sanjuán Szklarz, L.K., Kozjak-Pavlovic, V., Vögtle, F.-N., Chacinska, A., Milenkovic, D., Vogel, S., Dürr, M., Westermann, B., Guiard, B., Martinou, J.-C., et al. (2007). Preprotein transport machineries of yeast mitochondrial outer membrane are not required for Bax-induced release of intermembrane space proteins. *J. Mol. Biol.* 368, 44–54.

Sarosiek, K.A., and Letai, A. (2016). Directly targeting the mitochondrial pathway of apoptosis for cancer therapy using BH3 mimetics - recent successes, current challenges and future promise. *FEBS J.*

Sarosiek, K.A., Chi, X., Bachman, J.A., Sims, J.J., Montero, J., Patel, L., Flanagan, A., Andrews, D.W., Sorger, P., and Letai, A. (2013a). BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. *Mol. Cell* 51, 751–765.

Sarosiek, K.A., Chonghaile, T.N., and Letai, A. (2013b). Mitochondria: gatekeepers of response to chemotherapy. *Trends Cell Biol.* 23, 612–619.

Schaal, C., Pillai, S., and Chellappan, S.P. (2014). The Rb-E2F transcriptional regulatory pathway in tumor angiogenesis and metastasis. *Adv. Cancer Res.* 121, 147–182.

Schafer, B., Quispe, J., Choudhary, V., Chipuk, J.E., Ajero, T.G., Du, H., Schneiter, R., and Kuwana, T. (2009). Mitochondrial Outer Membrane Proteins Assist Bid in Bax-mediated Lipidic Pore Formation.

Schellenberg, B., Wang, P., Keeble, J.A., Rodriguez-Enriquez, R., Walker, S., Owens, T.W., Foster, F., Tanianis-Hughes, J., Brennan, K., Streuli, C.H., et al. (2013). Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Mol. Cell* 49, 959–971.

Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M., and Reed, J.C. (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 5113–5118.

Schinzel, A., Kaufmann, T., and Borner, C. (2004). Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion, and changes in subcellular localization. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1644, 95–105.

Schweichel, J.U., and Merker, H.J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253–266.

Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300, 135–139.

Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., and Andrews, D.W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 508–520.

Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103–112.

Shew, J.Y., Lin, B.T., Chen, P.L., Tseng, B.Y., Yang-Feng, T.L., and Lee, W.H. (1990). C-terminal truncation of the retinoblastoma gene product leads to functional inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6–10.

Shih, C., Shilo, B.Z., Goldfarb, M.P., Dannenberg, A., and Weinberg, R.A. (1979). Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 5714–5718.

Shimazu, T., Degenhardt, K., Nur-E-Kamal, A., Zhang, J., Yoshida, T., Zhang, Y., Mathew, R., White, E., and Inouye, M. (2007). NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition. *Genes Dev.* 21, 929–941.

Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483–487.

Singh, P., Wong, S.H., and Hong, W. (1994). Overexpression of E2F-1 in rat embryo fibroblasts leads to neoplastic transformation. *EMBO J.* 13, 3329–3338.

Singh, P., Coe, J., and Hong, W. (1995). A role for retinoblastoma protein in potentiating transcriptional

- activation by the glucocorticoid receptor. *Nature* **374**, 562–565.
- Sot, B., Freund, S.M.V., and Fersht, A.R. (2007). Comparative biophysical characterization of p53 with the pro-apoptotic BAK and the anti-apoptotic BCL-xL. *J. Biol. Chem.* **282**, 29193–29200.
- Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., et al. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* **19**, 202–208.
- Stanelle, J., Stiewe, T., Theseling, C.C., Peter, M., and Pützer, B.M. (2002). Gene expression changes in response to E2F1 activation. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1859–1867.
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., and Vogt, P.K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **260**, 170–173.
- Stevaux, O., and Dyson, N.J. (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 684–691.
- Stevens, C., and La Thangue, N.B. (2004). The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair* **3**, 1071–1079.
- Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N.B. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **5**, 401–409.
- Stiewe, T., and Pützer, B.M. (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat. Genet.* **26**, 464–469.
- Sugioka, R., Shimizu, S., Funatsu, T., Tamagawa, H., Sawa, Y., Kawakami, T., and Tsujimoto, Y. (2003). BH4-domain peptide from Bcl-xL exerts anti-apoptotic activity in vivo. *Oncogene* **22**, 8432–8440.
- Suzuki, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **645**.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2008). Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* **27**, 6452–6461.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 621–632.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2013). Mitochondrial Regulation of Cell Death.
- Tait, S.W.G., Parsons, M.J., Llambi, F., Bouchier-Hayes, L., Connell, S., Muñoz-Pinedo, C., and Green, D.R. (2010). Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Dev. Cell* **18**, 802–813.
- Tait, S.W.G., Ichim, G., and Green, D.R. (2014). Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *J. Cell Sci.* **127**, 2135–2144.
- Takahashi, Y., Rayman, J.B., and Dynlacht, B.D. (2000). Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev.* **14**, 804–816.
- Talluri, S., and Dick, F.A. (2012). Regulation of transcription and chromatin structure by pRB: here, there and everywhere. *Cell Cycle Georget. Tex* **11**, 3189–3198.
- Tan, C., Dlugosz, P.J., Peng, J., Zhang, Z., Lapolla, S.M., Plafker, S.M., Andrews, D.W., and Lin, J. (2006). Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2. *J. Biol. Chem.* **281**, 14764–14775.
- Tanaka, H., Matsumura, I., Ezoe, S., Satoh, Y., Sakamaki, T., Albanese, C., Machii, T., Pestell, R.G., and Kanakura, Y. (2002). E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol. Cell* **9**, 1017–1029.
- Taubert, S., Gorrini, C., Frank, S.R., Parisi, T., Fuchs, M., Chan, H.-M., Livingston, D.M., and Amati, B. (2004). E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4546–4556.
- Tedesco, D., Lukas, J., and Reed, S.I. (2002). The pRB-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev.* **16**, 2946–2957.
- Teijido, O., and Dejean, L. (2010). Upregulation of Bcl2 inhibits apoptosis-driven BAX insertion but favors BAX relocalization in mitochondria. *FEBS Lett.* **584**, 3305–3310.
- Teissier, S., Pang, C.L., and Thierry, F. (2010). The E2F5 repressor is an activator of E6/E7 transcription and of the S-phase entry in HPV18-associated cells. *Oncogene* **29**, 5061–5070.
- Thalmeier, K., Synovzik, H., Mertz, R., Winnacker, E.L., and Lipp, M. (1989). Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter. *Genes Dev.* **3**, 527–536.
- Thomas, L.W., Lam, C., and Edwards, S.W. (2010). Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett.* **584**, 2981–2989.
- Thomas, L.W., Lam, C., Clark, R.E., White, M.R.H., Spiller, D.G., Moots, R.J., and Edwards, S.W. (2012). Serine 162, an essential residue for the mitochondrial localization, stability and anti-apoptotic function of Mcl-1. *PLoS One* **7**, e45088.
- Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Youle, R.J., and Edlich, F. (2013). The C-terminal helix of Bcl-x(L)

- mediates Bax retrotranslocation from the mitochondria. *Cell Death Differ.* **20**, 333–342.
- Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Emschermann, F., Lauterwasser, J., Kaiser, A., Ichim, G., Tait, S.W.G., Frank, S., Langer, H.F., et al. (2015). Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. *EMBO J.* **34**, 67–80.
- Tomasini, R., Samir, A.A., Carrier, A., Isnardon, D., Cecchinelli, B., Soddu, S., Malissen, B., Dagorn, J.-C., Iovanna, J.L., and Dusetti, N.J. (2003). TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 37722–37729.
- Tomita, Y., Marchenko, N., Erster, S., Nemajerova, A., Dehner, A., Klein, C., Pan, H., Kessler, H., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2006). WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J. Biol. Chem.* **281**, 8600–8606.
- Tong, T., Ji, J., Jin, S., Li, X., Fan, W., Song, Y., Wang, M., Liu, Z., Wu, M., and Zhan, Q. (2005). Gadd45a expression induces Bim dissociation from the cytoskeleton and translocation to mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4488–4500.
- Toyota, H., Yanase, N., Yoshimoto, T., Moriyama, M., Sudo, T., and Mizuguchi, J. (2003). Calpain-induced Bax-cleavage product is a more potent inducer of apoptotic cell death than wild-type Bax. *Cancer Lett.* **189**, 221–230.
- Trimarchi, J.M., and Lees, J.A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 11–20.
- Trimarchi, J.M., Fairchild, B., Wen, J., and Lees, J.A. (2001). The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1519–1524.
- Trouche, D., Cook, A., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator stimulates E2F1/DP1 activity. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4139–4145.
- Tsai, K.Y., Hu, Y., Macleod, K.F., Crowley, D., Yamasaki, L., and Jacks, T. (1998). Mutation of E2f-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. *Mol. Cell* **2**, 293–304.
- Tse, C., Shoemaker, A.R., Adickes, J., Anderson, M.G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E.F., Marsh, K.C., Mitten, M.J., Nimmer, P., et al. (2008). ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* **68**, 3421–3428.
- Tyagi, S., and Herr, W. (2009). E2F1 mediates DNA damage and apoptosis through HCF-1 and the MLL family of histone methyltransferases. *EMBO J.* **28**, 3185–3195.
- Tyagi, S., Chabes, A.L., Wysocka, J., and Herr, W. (2007). E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol. Cell* **27**, 107–119.
- Urban, C., Rhême, C., Maerz, S., Berg, B., Pick, R., Nitschke, R., and Borner, C. (2008). Apoptosis induced by Semliki Forest virus is RNA replication dependent and mediated via Bak. *Cell Death Differ.* **15**, 1396–1407.
- Vahsen, N., Candé, C., Brière, J.-J., Bénit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P.G., Pequignot, M.O., Casares, N., Lazar, V., et al. (2004). AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* **23**, 4679–4689.
- Vairo, G., Soos, T.J., Upton, T.M., Zalvide, J., DeCaprio, J.A., Ewen, M.E., Koff, A., and Adams, J.M. (2000). Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4745–4753.
- Vance, J.E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* **265**, 7248–7256.
- Vance, J.E. (2014). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 595–609.
- Vandel, L., Nicolas, E., Vaute, O., Ferreira, R., Ait-Si-Ali, S., and Trouche, D. (2001). Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6484–6494.
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 135–147.
- Vaziri, H., Dessain, S.K., Ng Eaton, E., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L., and Weinberg, R.A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**, 149–159.
- Vela, L., Gonzalo, O., Naval, J., and Marzo, I. (2013). Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *J. Biol. Chem.* **288**, 4935–4946.
- Velasco, G., Hubé, F., Rollin, J., Neuillet, D., Philippe, C., Bouzinba-Segard, H., Galvani, A., Viegas-Péquignot, E., and Francastel, C. (2010). Dnmt3b recruitment through E2F6 transcriptional repressor mediates germ-line gene silencing in murine somatic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 9281–9286.
- Verona, R., Moberg, K., Estes, S., Starz, M., Vernon, J.P., and Lees, J.A. (1997). E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 7268–7282.

- van Vliet, A.R., Verfaillie, T., and Agostinis, P. (2014). New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 2253–2262.
- Wang, A., Rud, J., Olson, C.M., Anguita, J., and Osborne, B.A. (2009). Phosphorylation of Nur77 by the MEK-ERK-RSK cascade induces mitochondrial translocation and apoptosis in T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 3268–3277.
- Wang, B., Liu, K., Lin, F.-T., and Lin, W.-C. (2004). A role for 14-3-3 tau in E2F1 stabilization and DNA damage-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 54140–54152.
- Wang, C., Chen, L., Hou, X., Li, Z., Kabra, N., Ma, Y., Nemoto, S., Finkel, T., Gu, W., Cress, W.D., et al. (2006). Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* 8, 1025–1031.
- Wang, C., Rauscher, F.J., Cress, W.D., and Chen, J. (2007a). Regulation of E2F1 function by the nuclear corepressor KAP1. *J. Biol. Chem.* 282, 29902–29909.
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., and Reed, J.C. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284, 339–343.
- Wang, J., Shen, W.H., Jin, Y.J., Brandt-Rauf, P.W., and Yin, Y. (2007b). A molecular link between E2F-1 and the MAPK cascade. *J. Biol. Chem.* 282, 18521–18531.
- Wang, J., Yin, D.P., Liu, Y.-X., Baer, R., and Yin, Y. (2007c). Dual specificity phosphatase 1/CL100 is a direct transcriptional target of E2F-1 in the apoptotic response to oxidative stress. *Cancer Res.* 67, 6737–6744.
- Wang, K., Zhou, L.-Y., Wang, J.-X., Wang, Y., Sun, T., Zhao, B., Yang, Y.-J., An, T., Long, B., Li, N., et al. (2015). E2F1-dependent miR-421 regulates mitochondrial fragmentation and myocardial infarction by targeting Pink1. *Nat. Commun.* 6, 7619.
- Wang, Y., Alla, V., Goody, D., Gupta, S.K., Spitschak, A., Wolkenhauer, O., Pützer, B.M., and Engelmann, D. (2016). Epigenetic factor EPC1 is a master regulator of DNA damage response by interacting with E2F1 to silence death and activate metastasis-related gene signatures. *Nucleic Acids Res.* 44, 117–133.
- Watanabe, T., Imoto, I., Katahira, T., Hirasawa, A., Ishiwata, I., Emi, M., Takayama, M., Sato, A., and Inazawa, J. (2002). Differentially regulated genes as putative targets of amplifications at 20q in ovarian cancers. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 93, 1114–1122.
- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 14, 2060–2071.
- Wei, Y., Liu, D., Ge, Y., Zhou, F., Xu, J., Chen, H., Gu, J., and Jiang, J. (2008). Identification of E1AF as a target gene of E2F1-induced apoptosis in response to DNA damage. *J. Biochem. (Tokyo)* 144, 539–546.
- Weijts, B.G.M.W., Bakker, W.J., Cornelissen, P.W.A., Liang, K.-H., Schaftenaar, F.H., Westendorp, B., de Wolf, C.A.C.M.T., Paciejewska, M., Scheele, C.L.G.J., Kent, L., et al. (2012). E2F7 and E2F8 promote angiogenesis through transcriptional activation of VEGFA in cooperation with HIF1. *EMBO J.* 31, 3871–3884.
- Weinberg, R.A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science* 254, 1138–1146.
- Weinberg, R.A. (1994). Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA. Cancer J. Clin.* 44, 160–170.
- Weinberg, R.A. (2014). Coming full circle—from endless complexity to simplicity and back again. *Cell* 157, 267–271.
- Whyte, P., Buchkovich, K.J., Horowitz, J.M., Friend, S.H., Raybuck, M., Weinberg, R.A., and Harlow, E. (1988). Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334, 124–129.
- Wilfling, F., Weber, A., Potthoff, S., Vögtle, F.-N., Meisinger, C., Paschen, S.A., and Häcker, G. (2012). BH3-only proteins are tail-anchored in the outer mitochondrial membrane and can initiate the activation of Bax. *Cell Death Differ.* 19, 1328–1336.
- Wilkinson, J.C., Cepero, E., Boise, L.H., and Duckett, C.S. (2004). Upstream Regulatory Role for XIAP in Receptor-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7003–7014.
- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 19, 1294–1305.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., et al. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856–859.
- Wirth, M., Stojanovic, N., Christian, J., Paul, M.C., Stauber, R.H., Schmid, R.M., Häcker, G., Krämer, O.H., Saur, D., and Schneider, G. (2014). MYC and EGR1 synergize to trigger tumor cell death by controlling NOXA and BIM transcription upon treatment with the proteasome inhibitor bortezomib. *Nucleic Acids Res.* 42, 10433–10447.
- Won, J., Kim, D.Y., La, M., Kim, D., Meadows, G.G., and Joe, C.O. (2003). Cleavage of 14-3-3 protein by caspase-

- 3 facilitates bad interaction with Bcl-x(L) during apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 19347–19351.
- Wong, J.V., Dong, P., Nevins, J.R., Mathey-Prevot, B., and You, L. (2011). Network calisthenics: control of E2F dynamics in cell cycle entry. *Cell Cycle Georget. Tex* **10**, 3086–3094.
- Wood, D.E., Thomas, A., Devi, L.A., Berman, Y., Beavis, R.C., Reed, J.C., and Newcomb, E.W. (1998). Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene* **17**, 1069–1078.
- Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H.I., Sang, L., Chong, G.T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F.A., Field, S.J., et al. (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* **414**, 457–462.
- Wu, Z.L., Zheng, S.S., Li, Z.M., Qiao, Y.Y., Aau, M.Y., and Yu, Q. (2010). Polycomb protein EZH2 regulates E2F1-dependent apoptosis through epigenetically modulating Bim expression. *Cell Death Differ.* **17**, 801–810.
- Xie, Q., Bai, Y., Wu, J., Sun, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Mei, P., and Yuan, Z. (2011). Methylation-mediated regulation of E2F1 in DNA damage-induced cell death. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **31**, 139–146.
- Xie, W., Jiang, P., Miao, L., Zhao, Y., Zhimin, Z., Qing, L., Zhu, W., and Wu, M. (2006). Novel link between E2F1 and Smac/DIABLO: proapoptotic Smac/DIABLO is transcriptionally upregulated by E2F1. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2046–2055.
- Xu, M., Sheppard, K.A., Peng, C.Y., Yee, A.S., and Piwnicka-Worms, H. (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8420–8431.
- Yamagata, H., Shimizu, S., Nishida, Y., Watanabe, Y., Craigen, W.J., and Tsujimoto, Y. (2009). Requirement of voltage-dependent anion channel 2 for pro-apoptotic activity of Bax. *Oncogene* **28**, 3563–3572.
- Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., Harlow, E., and Dyson, N.J. (1996). Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* **85**, 537–548.
- Yamasaki, L., Bronson, R., Williams, B.O., Dyson, N.J., Harlow, E., and Jacks, T. (1998). Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice. *Nat. Genet.* **18**, 360–364.
- Yamazaki, K., Yajima, T., Nagao, T., Shinkawa, H., Kondo, F., Hanami, K., Asoh, A., Sugano, I., and Ishida, Y. (2003). Expression of transcription factor E2F-1 in pancreatic ductal carcinoma: an immunohistochemical study. *Pathol. Res. Pract.* **199**, 23–28.
- Yang, H.L., Dong, Y.B., Elliott, M.J., Liu, T.J., and McMasters, K.M. (2000). Caspase activation and changes in Bcl-2 family member protein expression associated with E2F-1-mediated apoptosis in human esophageal cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **6**, 1579–1589.
- Yang, S.-Z., Lin, F.-T., and Lin, W.-C. (2008). MCPH1/BRIT1 cooperates with E2F1 in the activation of checkpoint, DNA repair and apoptosis. *EMBO Rep.* **9**, 907–915.
- Yang, T., Kozopas, K.M., and Craig, R.W. (1995). The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J. Cell Biol.* **128**, 1173–1184.
- Yao, Y., Fujimoto, L.M., Hirshman, N., Bobkov, A.A., Antignani, A., Youle, R.J., and Marassi, F.M. (2015). Conformation of BCL-XL upon membrane-integration. *J. Mol. Biol.* **427**, 2262–2270.
- Yee, A.S., Reichel, R., Kovetski, I., and Nevins, J.R. (1987). Promoter interaction of the E1A-inducible factor E2F and its potential role in the formation of a multi-component complex. *EMBO J.* **6**, 2061–2068.
- You, H., Pellegrini, M., Tsuchihara, K., Yamamoto, K., Hacker, G., Erlacher, M., Villunger, A., and Mak, T.W. (2006). FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J. Exp. Med.* **203**, 1657–1663.
- Youn, C.-K., Cho, H.-J., Kim, S.-H., Kim, H.-B., Kim, M.-H., Chang, I.-Y., Lee, J.-S., Chung, M.-H., Hahm, K.-S., and You, H.J. (2005). Bcl-2 expression suppresses mismatch repair activity through inhibition of E2F transcriptional activity. *Nat. Cell Biol.* **7**, 137–147.
- Yunis, J.J., and Ramsay, N. (1978). Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am. J. Dis. Child.* **132**, 161–163.
- Zacchi, P., Gostissa, M., Uchida, T., Salvagno, C., Avolio, F., Volinia, S., Ronai, Z. 'ev, Blandino, G., Schneider, C., and Del Sal, G. (2002). The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* **419**, 853–857.
- Zaika, A., Irwin, M., Sansome, C., and Moll, U.M. (2001). Oncogenes induce and activate endogenous p73 protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 11310–11316.
- Zaltsman, Y., Shachnai, L., Yivgi-Ohana, N., Schwarz, M., Maryanovich, M., Houtkooper, R.H., Vaz, F.M., De Leonadis, F., Fiermonte, G., Palmieri, F., et al. (2010). MTCH2/MIMP is a major facilitator of tBID recruitment to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* **12**, 553–562.
- Zha, J., Weiler, S., Oh, K.J., Wei, M.C., and Korsmeyer, S.J. (2000). Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* **290**, 1761–1765.
- Zhang, L., and Wang, C. (2006). F-box protein Skp2: a novel transcriptional target of E2F. *Oncogene* **25**, 2615–2627.

- Zhang, H.S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A.A., Ma, D., Luo, R.X., Harbour, J.W., and Dean, D.C. (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* *101*, 79–89.
- Zhang, J., Huang, K., O'Neill, K.L., Pang, X., and Luo, X. (2016). Bax/Bak activation in the absence of Bid, Bim, Puma, and p53. *Cell Death Dis.* *7*, e2266.
- Zhang, W., Wang, X., and Chen, T. (2012). Resveratrol induces apoptosis via a Bak-mediated intrinsic pathway in human lung adenocarcinoma cells. *Cell. Signal.* *24*, 1037–1046.
- Zhang, Z., Wang, H., Li, M., Rayburn, E.R., Agrawal, S., and Zhang, R. (2005). Stabilization of E2F1 protein by MDM2 through the E2F1 ubiquitination pathway. *Oncogene* *24*, 7238–7247.
- Zhao, L.-J., Subramanian, T., Vijayalingam, S., and Chinnadurai, G. (2014). CtBP2 proteome: Role of CtBP in E2F7-mediated repression and cell proliferation. *Genes Cancer* *5*, 31–40.
- Zhao, Y., Tan, J., Zhuang, L., Jiang, X., Liu, E.T., and Yu, Q. (2005). Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 16090–16095.
- Zheng, H., You, H., Zhou, X.Z., Murray, S.A., Uchida, T., Wulf, G., Gu, L., Tang, X., Lu, K.P., and Xiao, Z.-X.J. (2002). The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature* *419*, 849–853.
- Zhou, L., and Chang, D.C. (2008). Dynamics and structure of the Bax-Bak complex responsible for releasing mitochondrial proteins during apoptosis. *J. Cell Sci.* *121*, 2186–2196.
- Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W., and Chen, X. (1998). The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res.* *58*, 5061–5065.
- Zhu, L., Lu, Z., and Zhao, H. (2015). Antitumor mechanisms when pRb and p53 are genetically inactivated. *Oncogene* *34*, 4547–4557.
- Ziebold, U., Reza, T., Caron, A., and Lees, J.A. (2001). E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos. *Genes Dev.* *15*, 386–391.
- Zong, W.-X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.-C., Yuan, J., and Thompson, C.B. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.* *162*, 59–69.

Annexes

Au cours de ma thèse, j'ai pu contribuer au travail de Janic Lepen (Le Pen et al., 2016; présenté en **Annexe 1**). Ses travaux ont mis en évidence l'implication non transcriptionnelle du facteur de transcription p53 dans l'apoptose induite par le BH3-mimétique ABT-737. En effet, des différences de sensibilité à l'ABT-737 ont été observées entre des lignées de cancer colorectal présentant des niveaux variables d'expression de p53. La lignée HCT116 p21^{-/-} est très sensible à l'action du traitement BH3-mimétique, or cette lignée présente un fort taux de p53, responsable de leur sensibilité accrue à l'ABT-737. La diminution de l'expression de p53 par ARN interférence rend cette lignée résistante au traitement. De façon concordante, la lignée HCT116 parentale devient sensible à l'ABT-737 lors d'un co-traitement par la nutlin-3a (inhibiteur de MDM2) qui provoque une augmentation du niveau de p53, tandis que la lignée isogénique HCT116 p53^{-/-}, déficiente pour p53, résiste à l'action du traitement. La contribution de p53 dans l'action de l'ABT-737 est indépendante de ses fonctions transcriptionnelles. En effet, ni l'inhibition de la transcription par l' α -amanitine, ni directement celle de l'activité transcriptionnelle de p53 par la pifitrine- α ne modifie le niveau de mort des HCT116 p21^{-/-} sous traitement. Les données d'immunoprécipitation avec l'anticorps 6A7 (reconnaissance de la conformation active de Bax) indiquent que p53 est requis pour l'activation de Bax survenant dans les cellules traitées par l'ABT-737. Une analyse des interactions Bax – Bcl-xL a été effectuée par approche de BRET dans la lignée HCT116 p21^{-/-} en présence ou non d'ARN interférence dirigé contre l'ARNm de p53. En absence de stress, l'interaction reste identique dans les deux conditions. En revanche, en présence de l'ABT-737, l'interaction est moins sensible au traitement en absence de p53. L'utilisation d'une approche de BH3-Profiling a permis de mettre en évidence un rôle critique de p53 dans le priming mitochondrial car une meilleure réponse, des lignées p21^{-/-} et p21^{-/-} Puma^{-/-}, est observée en présence de p53 après ajout de peptides BH3. Ainsi le facteur de transcription, par son action non transcriptionnelle, contribue à augmenter le priming des mitochondries et favorise de la sorte l'action de thérapies anti-cancéreuses comme l'ABT-737.

Constitutive p53 heightens mitochondrial apoptotic priming and favors cell death induction by BH3 mimetic inhibitors of BCL-xL

J Le Pen¹, M Laurent¹, K Sarosiek², C Vuillier¹, F Gautier^{1,3}, S Montessuit⁴, JC Martinou⁴, A Letai², F Braun^{*1,5} and PP Juin^{*1,3}

Proapoptotic molecules directly targeting the BCL-2 family network are promising anticancer therapeutics, but an understanding of the cellular stress signals that render them effective is still elusive. We show here that the tumor suppressor p53, at least in part by transcription independent mechanisms, contributes to cell death induction and full activation of BAX by BH3 mimetic inhibitors of BCL-xL. In addition to mildly facilitating the ability of compounds to derepress BAX from BCL-xL, p53 also provides a death signal downstream of anti-apoptotic proteins inhibition. This death signal cooperates with BH3-induced activation of BAX and it is independent from PUMA, as enhanced p53 can substitute for PUMA to promote BAX activation in response to BH3 mimetics. The acute sensitivity of mitochondrial priming to p53 revealed here is likely to be critical for the clinical use of BH3 mimetics.

Cell Death and Disease (2016) 7, e2083; doi:10.1038/cddis.2015.400; published online 4 February 2016

Major tumor suppressors pathways, such as these relying on pRB and/or protein 53 (p53), promote proapoptotic signals that ultimately converge on Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization (MOMP).¹ As a consequence, their loss in cancer cells results in failure to undergo MOMP in response to therapy, and approaches allowing to mitigate such defects are being actively investigated.

The BCL-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) family proteins are key regulators of MOMP and subsequent apoptosis.²⁻⁴ They are subdivided into three groups depending on their BCL-2 homology (BH) domain composition and their function: the multidomain anti-apoptotic proteins (BCL-2-like 1 (BCL-xL), BCL-2 and myeloid cell leukemia-1 (MCL-1), the multidomain proapoptotic proteins (BCL-2-associated X protein (BAX), BCL-2 antagonist/killer-1 (BAK)) and the BH3-only proapoptotic members (BCL-2-associated death promoter (BAD), Bcl-2-interacting mediator of cell death (BIM), BH3-interacting-domain death agonist (BID), NOXA and p53-upregulated modulator of apoptosis (PUMA)).⁵⁻⁷ Cell-fate decisions triggered by apoptotic stimuli are based on the relative amount of each BCL-2 protein as well as on the interplay between members of this family.^{5,8,9} One proximal step is the conversion of inert monomeric molecules of BAX/BAK into dimers that nucleate higher order oligomerization and lead to mitochondrial damage.¹⁰⁻¹² This process of 'activation' can be induced by a subset of BH3-only proteins that directly interact with BAX/BAK (the so-called activators,

BIM, BID and PUMA). Conversely, antiapoptotic proteins prevent this by interacting with BAX/BAK and/or activators.^{13,14} This relies on the binding of the BH3 domain of the proapoptotic proteins to a hydrophobic cleft formed by the BH1-2 and -3 domains of BCL-2 homologs.¹⁵ This can now be pharmacologically modulated by 'BH3-mimetics' that target more or less selectively the BH3-binding pockets of BCL-2, BCL-xL or MCL-1.¹⁶

BH3 mimetics directly promote MOMP by releasing BH-3 activators and BAX/BAK from antiapoptotic proteins, hence their use may help restore apoptosis in cancer cells harboring defects in tumor suppressor pathways. However, tumor suppressors may provide additional cooperating signals that foster BH3 mimetic induced cell death, and whose absence may reciprocally limit BH3 mimetics efficiency. Consistent with the latter view, we recently showed that the pRB/E2F-1 pathway amplifies cell death induced by BCL-2/BCL-xL inhibition, by mediating caspase-dependent induction of the endogenous MCL-1 inhibitor NOXA.¹⁷ Likewise, p53, as a transcription factor, was shown to induce the expression of various apoptotic BCL-2 family genes^{18,19} in addition to directly interacting with some BCL-2 family proteins.²⁰⁻²⁸ So far, no comprehensive study has investigated which, if any, of these effects may be critical to BH3-mimetic induction of cell death. We herein show that p53, even when expressed in viable,

¹UMR 892 INSERM/6299 CNRS/Université de Nantes, Team 8 'Cell Survival And Tumor Escape In Breast Cancer', Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, Nantes, France; ²Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA; ³Institut de Cancérologie de l'Ouest, Centre de Lutte contre le Cancer René Gauducheau, Saint Herblain, France and ⁴Department of Cell Biology, University of Geneva, Geneva, Switzerland

*Corresponding author: F Braun or P Juin, U892, INSERM, 9 quai Moncoussu, Nantes 44035, France. Tel: +33 02 4008 4083; Fax: +33 02 4008 4081; E-mail: braun@ibpc.fr or philippe.juin@univ-nantes.fr

⁵Current address: CNRS FRE3630 (affiliated with Univ.Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité), Institut de Biologie Physio-chimique, 13 rue Pierre et Marie Curie, Paris 75005, France.

Abbreviations: BAD, BCL-2-associated death promoter; BAK, BCL-2 antagonist/killer-1; BAX, BCL-2-associated X protein; BCL-2, B-cell CLL/lymphoma 2; BCL-xL, BCL-2-like 1; BH, BCL-2 homology; BID, BH3-interacting-domain death agonist; BIM, Bcl-2-interacting mediator of cell death; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; HRK, Harakiri; MCL-1, myeloid cell leukemia-1; MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization; Mdm2, Mouse double minute 2 homolog; p53, protein 53; PUMA, p53-upregulated modulator of apoptosis

Received 04.8.15; revised 07.12.15; accepted 09.12.15; Edited by G Dewson

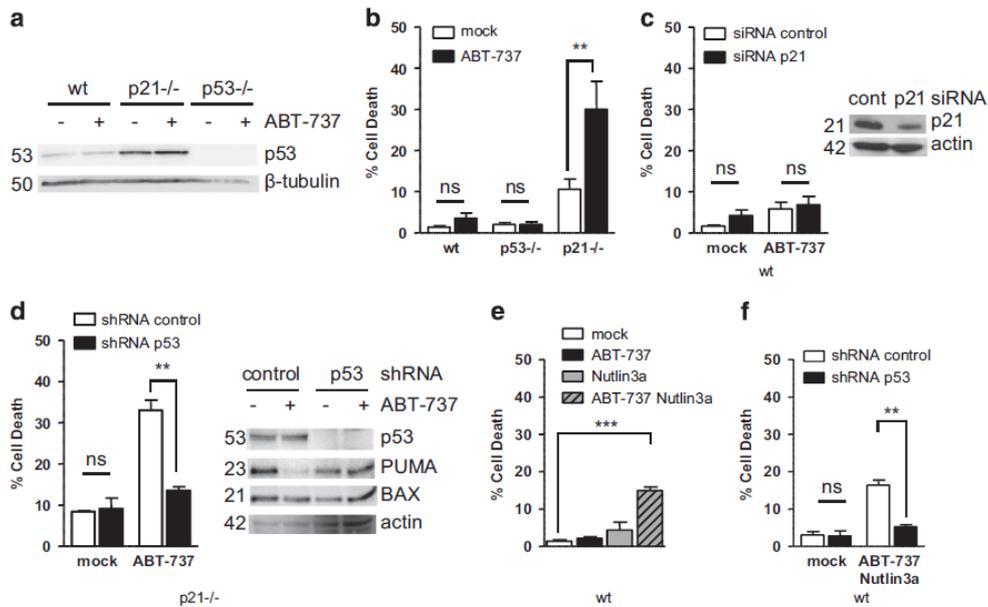


Figure 1 p53 is involved in sensitivity to ABT-737. **(a)** HCT116 wt, p53^{-/-} or p21^{-/-} cells were treated for 24h by 2 μ M ABT-737 for western-blot analysis of p53 expression. **(b)** Cells were treated as in a before cell death measurement. **(c)** HCT116 wt cells were transfected with control or p21 siRNAs. Forty-eight hours later, cells were treated by 2 μ M ABT-737 for 24 h before western blot (inset) and cell death measurement. **(d)** HCT116 p21^{-/-} cells previously infected with control or p53 shRNAs were treated by 2 μ M ABT-737 for 24 h before cell death analysis and western blot. **(e)** HCT116 wt were treated for 24 h by 2 μ M ABT-737 and/or 10 μ M Nutlin3a before cell death analysis (one-way ANOVA and Bonferroni post test). **(f)** HCT116 wt cells previously infected with a control or p53 shRNAs were treated by 2 μ M ABT-737 and 10 μ M Nutlin3a for 24 h before cell death analysis. Cell death was assessed by a trypan blue staining procedure. Corresponding molecular weight on western blots are indicated (kDa). Data presented are mean \pm S.E.M. of three independent experiments. ** P <0.01, *** P <0.001

dividing cancer cells, promotes death signals that critically cooperate with BH3 mimetic treatment to trigger cell death.

Results

Constitutive expression of p53 in HCT116 p21^{-/-} cells contributes to induction of cell death by the BCL-2/BCL-xL inhibitor ABT-737. We have previously established that the colorectal cancer HCT116 p21^{-/-} cell line is a model cell line that requires sustained inhibition of PUMA and BAX by BCL-xL to survive. This cell line is therefore a useful model to study the mechanisms leading to BAX-dependent cell death following BH3 mimetic inhibition of BCL-xL.¹³ Independently from p21 loss, the HCT116 p21^{-/-} cells were shown to express constitutively high levels of p53²⁹ (see also Figure 1a).

These cells are more sensitive than the parental (HCT116 wt) cell line to treatment with the BH3 mimetic inhibitor of BCL-2 and BCL-xL, ABT-737 (Figure 1b). Whereas down regulation of p21 by RNA interference in wild-type cells has no detectable impact on their resistance to ABT-737 (Figure 1c), downregulation of p53 in p21 null cells by a lentiviral-based shRNA significantly decreased their sensitivity (Figure 1d). Reciprocally, treatment of HCT116 wt cells with the Mouse double minute 2 homolog (Mdm2) inhibitor Nutlin-3a enhanced p53 expression and the response to ABT-737 (Figure 1e) whereas HCT116 p53^{-/-} cells remained resistant to the combined treatment (data not shown). This

effect was inhibited by down regulation of p53 (Figure 1f). Of note, p21 levels were induced by Nutlin-3a treatment in these assays, further underscoring the inconsequence of p21 expression on sensitivity to ABT-737 (Supplementary Figure S1A). Similar results were observed in the breast cancer Cal51 cell lines where ABT-737 and Nutlin-3a treatment synergized to induce p53-dependent cell death (Supplementary Figure S1B–C). Altogether, these results show that p53, when expressed above a certain threshold, contributes to the apoptotic response induced by ABT-737.

p53 does not sensitize cells to ABT-737 through transcriptional induction of NOXA, PUMA or BAX.

PUMA and BAX are major actors of the apoptotic response of HCT116 p21^{-/-} cells to ABT-737, whereas BIM did not appear to contribute to these responses.¹³ Moreover, silencing of NOXA expression prevented cell death induced by ABT-737 (Figure 2a), indicating that this endogenous MCL-1 inhibitor has a role in cell death induction by BCL-2/BCL-xL inhibition. As NOXA, PUMA and BAX are transcriptional targets of activated p53,³⁰ we investigated whether their constitutive induction by p53 prior treatment, and/or their induction by p53 during treatment, had a role. NOXA expression was increased in HCT116 p21^{-/-} upon ABT-737 treatment (Figure 2a), as reported in other cell lines.^{17,31} Such induction was still detectable in p53-depleted cells (Figure 2b) and overexpression of NOXA in HCT116 p53-null cells neither induced cell death by itself nor sensitized

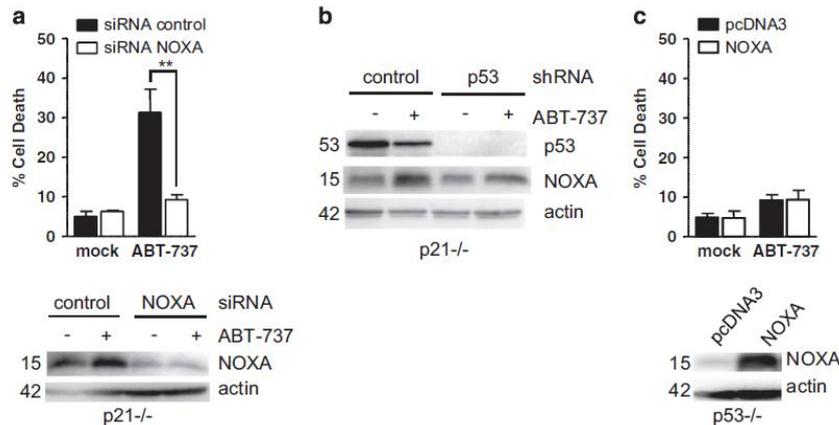


Figure 2 p53-independent induction of NOXA is involved in HCT116 p21^{-/-} sensitivity to ABT-737. **(a)** HCT116 p21^{-/-} cells were transfected by control or NOXA siRNAs for 48 h and treated for 24 h additional hours by 2 μM ABT-737 before cell death analysis and western blot. **(b)** HCT116 p21^{-/-} cells previously infected with a control or p53 shRNAs were treated by 2 μM ABT-737 for 24 h before western blot analysis. **(c)** HCT116 p53^{-/-} cells were transfected with pcDNA3 or pcDNA3-NOXA vector. Twenty-four hours later, cells were treated by 2 μM ABT-737 for 24 h before cell death analysis. Data presented are mean ± S.E.M. of three independent experiments. **P<0.01

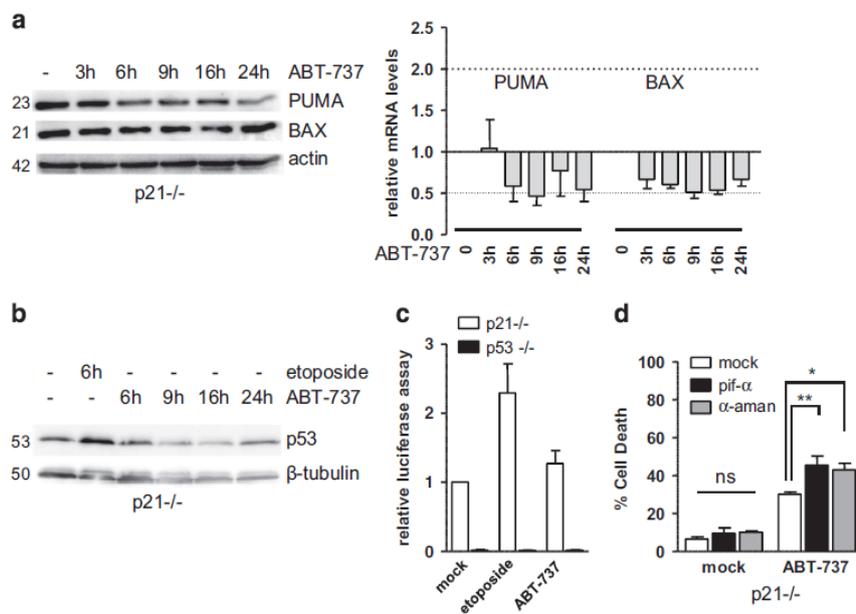


Figure 3 p53 transcriptional activity is dispensable for cell death induction by ABT-737. **(a and b)** HCT116 p21^{-/-} cells were treated for the indicated time by 2 μM ABT-737 or 20 μM Etoposide (a genotoxic agent used as a positive control for p53 activation) before western blot analysis and qPCR. **(c)** HCT116 p21^{-/-} and p53^{-/-} transfected with TA-luciferase control vector or p53-reporter luciferase vector, in parallel to a pCMV-β-galactosidase vector as transfection control. Twenty-four hours later, cells were treated for amanitin (w/o e) 6 h by 2 μM ABT-737 or 50 μM Etoposide, before lysis and luciferase assay. **(d)** HCT116 p21^{-/-} were pretreated 24 h by 40 μM Pifithrin-α (pif-α) or 10 μM α-Amanitin (α-Aman), before treatment for 24 h by 2 μM ABT-737 and cell death analysis. Data presented are mean ± S.E.M. of three independent experiments. *P<0.05, **P<0.01

them to ABT-737 treatment (Figure 2c). This argues that NOXA is an inducible actor of ABT-737-triggered apoptosis. However its induction does not absolutely require p53 and it is insufficient *per se*, in the absence of p53, to induce efficient cell death in combination with ABT-737. The situation was different for PUMA and BAX. Indeed, investigation of kinetic changes in PUMA and BAX protein and mRNA expression levels during ABT-737 treatment brought no

support to the hypothesis that their expression was induced at all (and *a fortiori* by p53) during treatment (Figure 3a). Moreover, PUMA and BAX were not detectably affected by silencing of p53 in HCT116 p21^{-/-} cells, whether these were untreated or treated 24 h with ABT-737 (Figure 1d). Indeed, ABT-737 had no effect on the expression of p53 itself in the p21^{-/-} cells (Figure 3b) and the transcriptional activity of p53, as measured in a luciferase reporter assay, was

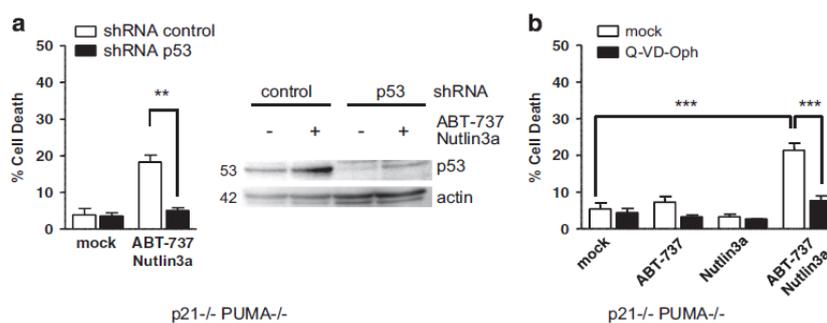


Figure 4 p53 favors sensitivity to ABT-737 in the absence of PUMA. **(a)** HCT116 p21^{-/-} PUMA^{-/-} cells were infected with control or p53 shRNAs before treatment for 24 h with 2 μ M ABT-737 and 10 μ M Nutlin3a and western blot and cell death analysis. **(b)** HCT116 p21^{-/-} PUMA^{-/-} cells were treated for 24 h by 2 μ M ABT-737, 10 μ M Nutlin3a and/or 10 μ M of the pan caspase inhibitor Q-VD-Oph, before cell death analysis. Data presented are mean \pm S.E.M. of three independent experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

not detectably modified by ABT-737 treatment in p21-null cells (Figure 3c). Importantly, neither Pifitrin- α (an inhibitor of p53-dependent transcriptional activation), nor α -Amanitin (an inhibitor of RNA polymerase-mediated transcription) inhibited cell death induced by ABT-737 in HCT116 p21^{-/-} cells (Figure 3d) arguing that the transcriptional activity of p53 is dispensable for cell death induction by ABT-737 in these cells. Notably, we even noted a stimulatory effect of these compounds. This evokes a preceding publication who ascribed this enhancement to the fact that p53 transcriptional activity is not only dispensable for apoptotic responses, but also a restraint to the execution of p53 mitochondrial death program.³² Pretreatment with Pifitrin- α of the wild-type cells did not decrease cell death induced by the combined ABT-737 and Nutlin-3a treatment, indicating that the transcriptional activity of p53 is dispensable under these conditions (Supplementary Figure S1D).

Finally, it should be noted that the effects exerted by p53 are not functionally equivalent to those of the BH3-only proteins NOXA and/or PUMA. As shown below, p53 exerts apoptotic effects even in cells depleted of MCL-1 and thus they cannot solely rely on the induction of NOXA (which essentially functions as an inhibitor of MCL-1) or of NOXA-like molecules. Moreover, we found that in HCT116 p21^{-/-} PUMA^{-/-} cells, enhancement of p53 expression by Nutlin-3a treatment sensitized these otherwise resistant cells to ABT-737 treatment (Figure 4a and b). Cell death induced under these conditions was inhibited by silencing of p53 by RNA interference (Figure 4a) and by pretreatment with a broad-spectrum caspase inhibitor Q-VD-Oph (Figure 4b), whereas pretreatment with Pifitrin- α did not decrease the level of cell death (Supplementary Figure S1D).

Our data support the notion that p53 exerts an effect that adds to these of NOXA and PUMA to promote cell death in ABT-737 cells, and that this effect is in great part independent of its transcriptional activity.

p53 favors BAX activation in ABT-737-treated cells.

As BAX has a major role in cell death induced by ABT-737 treatment or BCL-xL loss in HCT116 p21^{-/-} cells,¹³ we investigated the influence of p53 on BAX 'activation' by ABT-737 treatment.

We first evaluated conformation changes in the amino-terminus domain of BAX by immunoprecipitation assays with the 6A7 antibody. 6A7 immunoreactive forms of BAX were detected in ABT-737-treated p21-null cells, but only weakly in wild-type cells and not in p53-null cells, indicating that the insensitivity of the wild-type and p53-null cells coincides with an absence of efficient activation of BAX (Figure 5a). The induction of the 6A7 positive form was severely impaired in p21-null cells depleted in p53 arguing that p53 favors conformation change amplitudes of BAX in response to ABT-737 (Figure 5a). Importantly, even though PUMA is a major driver of BAX 'activation' in ABT-737 treated HCT116 p21^{-/-} cells,¹³ a significant conformation change in BAX was detected in HCT116 p21^{-/-} PUMA^{-/-} cells treated by the combination ABT-737/Nutlin3a (Figure 5b). This implies that enhanced p53 can substitute for PUMA to promote BAX activation and subsequent cell death (as shown in Figure 4). Other features of BAX activation are mitochondrial translocation and oligomerization. To evaluate BAX mitochondrial translocation, percentages of cells with punctate BAX distribution were determined after ABT-737 treatment (Figure 5c and Supplementary Figure S2). BAX showed a punctate staining pattern that colocalized with a mitochondrial marker upon ABT-737 treatment in p21-null cells but not in cells infected with a p53 shRNA lentivector (Figure 5c). No translocation of BAX was observed in the wild-type cells and in p53-null cells, consistent with the absence of 6A7-positive BAX molecules in these cells (Figure 5c). In agreement with data above, oligomerization of BAX, assessed by crosslinking with disuccinimidyl suberate (DSS) was detected in ABT-737-treated p21-null cells, but only weakly in wild-type cells and not in p53-null cells. This oligomerization of BAX in ABT-737 treated HCT116 p21-null cells was abolished by silencing of p53 (Figure 5d).

p53 modulates both the inhibition of BCL-xL by ABT-737 and death signals downstream of BCL-xL. BAX activation is critically kept in check by the BH3-binding activity of BCL-xL in HCT116 p21^{-/-} cells, as shown by the fact that inhibition of BCL-2/BCL-xL by ABT-737, and BCL-xL down regulation, both trigger BAX-dependent cell

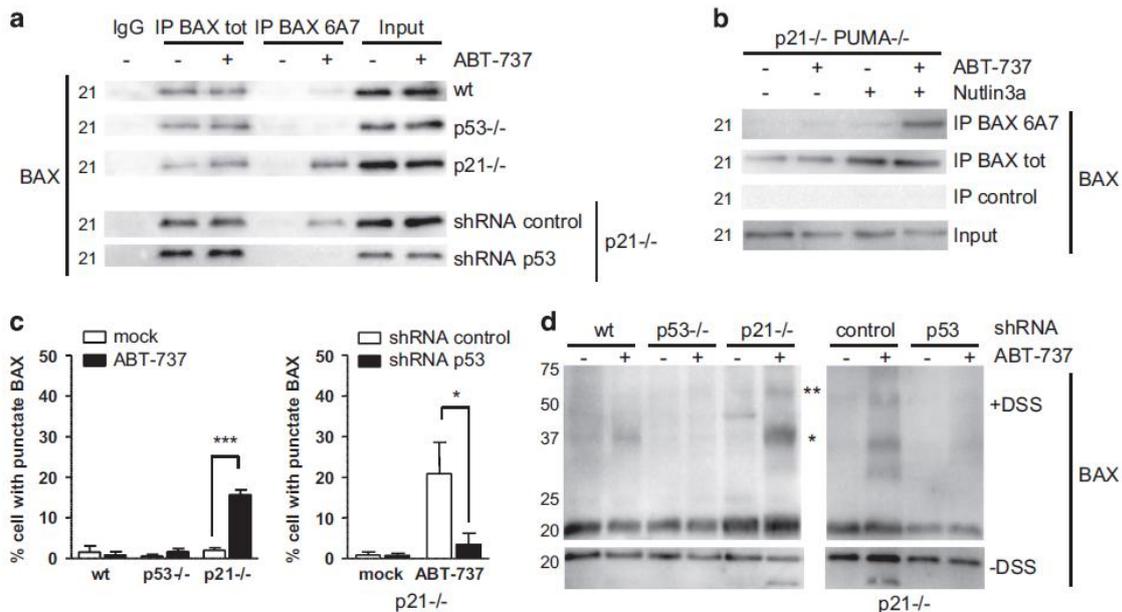


Figure 5 p53 favors BAX activation upon ABT-737 treatment. **(a)** HCT116 wt, p53^{-/-}, p21^{-/-} or p21^{-/-} previously infected with control or p53 shRNAs were treated for 16h by 2 μ M ABT-737, before immunoprecipitation using a conformation specific-BAX antibody (6A7) and a non-conformation specific BAX antibody (BAX tot.) **(b)** HCT116 p21^{-/-} PUMA^{-/-} were treated for 20 h by 2 μ M ABT-737 and/or 10 μ M Nutlin3a, before immunoprecipitation using the indicated anti-BAX antibodies. **(c)** HCT116 wt, p53^{-/-}, p21^{-/-}, or p21^{-/-} previously infected with control or p53 shRNAs were treated for 20 h by 2 μ M ABT-737. Cells were stained using Mitotracker Red, and a BAX- antibody. More than 50 cells were observed per treatment and cells exhibiting punctate BAX staining were counted. **(d)** HCT116 wt, p53^{-/-}, p21^{-/-}, or p21^{-/-} previously infected with control or p53 shRNAs were treated for 16 h by 2 μ M ABT-737. Hundred micrograms of proteins were crosslinked by DSS before western blot analysis. (*) (**): sizes in agreement with BAX oligomers. Data presented are mean \pm S.E.M. of three independent experiments. * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001

death.¹³ In further support to this, treatment of these cells with WEHI-539, a selective BCL-xL inhibitor, triggered p53-dependent cell death (Supplementary Figure S3). This indicates that p53 acts by favoring derepression of BCL-xL sensitive death signals by BH3 mimetics and/or by inducing death signals once BCL-xL is inhibited.

To investigate the former, we measured the spacial proximity between transiently transfected Luciferase-fused BAX and YFP-fused BCL-xL by bioluminescence resonance energy transfer (BRET) in live cells expressing p53 or not, treated or not with ABT-737. As previously reported,³³ saturable BRET signals were observed between donor BAX and increasing levels of acceptor BCL-xL, indicative of a specific interaction between these proteins. Specificity was further confirmed by assessing that BRET signals were significantly less intense when a variant of YFP-BCL-xL carrying a single point-mutation in the BH3 binding site was used (Supplementary Figure S4). The saturation curves that were observed between BAX and wild-type BCL-xL in control HCT116 p21^{-/-} and in p53-depleted cells were almost identical, suggesting that constitutive p53 does not impact on the propensity of BCL-xL to sequester BAX (Figure 6a). We then investigated the influence p53 might have on the sensitivity of these interactions to ABT-737. The effect of a range of ABT-737 concentrations on BAX/BCL-xL BRET signals in control and p53-deleted cells was evaluated. Silencing of p53 in p21-null cells consistently enhanced the resistance of BAX/BCL-xL interactions (evaluated by BRET) to ABT-737 (Figure 6b), indicating that constitutive p53

sensitizes BAX/BCL-xL interactions to ABT-737. Of note, p53 is not absolutely required for ABT-737 to inhibit BAX/BCL-xL interactions, as comparable inhibitions of BRET signals by concentrations above 1 μ M of ABT-737 were measured in p53-proficient and p53-deficient cells. This may explain why we detected no difference in the effects of ABT-737 (used at 2 μ M) on endogenous BAX/BCL-xL when we grossly evaluated them by co-immunoprecipitation assays in lysates from treated wild-type and p21^{-/-} HCT116 cells (Supplementary Figure S5).

To evaluate whether p53 might exert an apoptotic effect beyond its modulation of BCL-xL sensitivity to ABT-737, we analyzed whether it would have a role even in cells deleted in BCL-xL. In agreement with previous results,¹³ silencing of BCL-xL in p21-null cells promoted a more efficient cell death in itself than ABT-737 treatment. This effect was not significantly enhanced by silencing of MCL-1 (Figure 7a), whereas silencing of MCL-1 strongly increased cell death of p21^{-/-} cells treated with ABT-737 (Figure 7b). Silencing of the two antiapoptotic proteins lead to a weak level of cell death of HCT116 wt cells (Figure 7a) that was enhanced by Nutlin3a treatment (Figure 7d). Little cell death was measured in the p53 null cells in all these conditions (Figure 7a and c). Moreover, Pifithrin- α did not inhibit cell death in response to the silencing of BCL-xL and MCL-1 in p21 null cells (Figure 7e). Thus, p53 is required to promote cell death in cells in which the proapoptotic actors are no more sequestered by the anti-apoptotic counterparts, independently from its transcriptional activity.

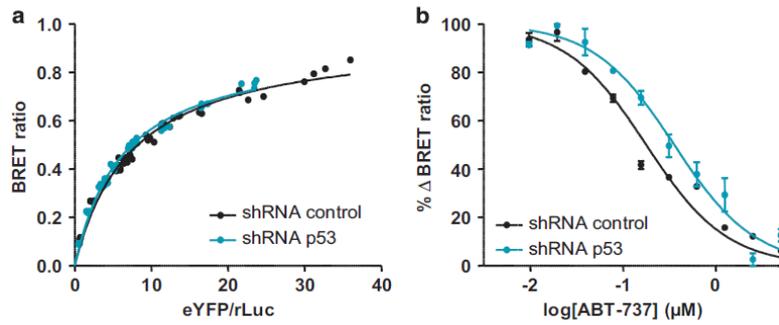


Figure 6 Effect of p53 on BCL-xL binding to BAX. **(a)** Donor saturation assay analysis: saturation curves were performed in HCT116 p21^{-/-} cells previously infected with control (black) or p53 shRNAs (blue) using increasing amount of vectors encoding YFP-BCL-xL in the presence of a fixed amount of the vector-encoding Rluc-BAX. BRET ratios (BRET Unit) were measured for every YFP-BCL-xL plasmid concentrations and are plotted as a function of the ratio of total acceptor to donor fluorescence (YFP-BCL-xL/Rluc-BAX). The data were fitted using a nonlinear regression equation assuming a single binding site. **(b)** Dose-response effect of ABT-737 on BCL-xL/BAX BRET signals. HCT116 p21^{-/-} cells previously infected with control (black) or p53 (blue) shRNAs were transiently transfected with a constant amount of plasmid DNA encoding the donor Rluc-BAX (50 ng) and plasmid DNA encoding the acceptor YFP-BCL-xL (200 ng), treated or not with increasing doses of ABT-737 (from 0.1 to 10 μM). %ΔBRET is plotted as a function of the logarithmic ABT-737 concentrations. The data were fitted using a nonlinear regression. Data shown represent results from one of three separate BRET titration experiments (performed in duplicate) that produced qualitatively similar results

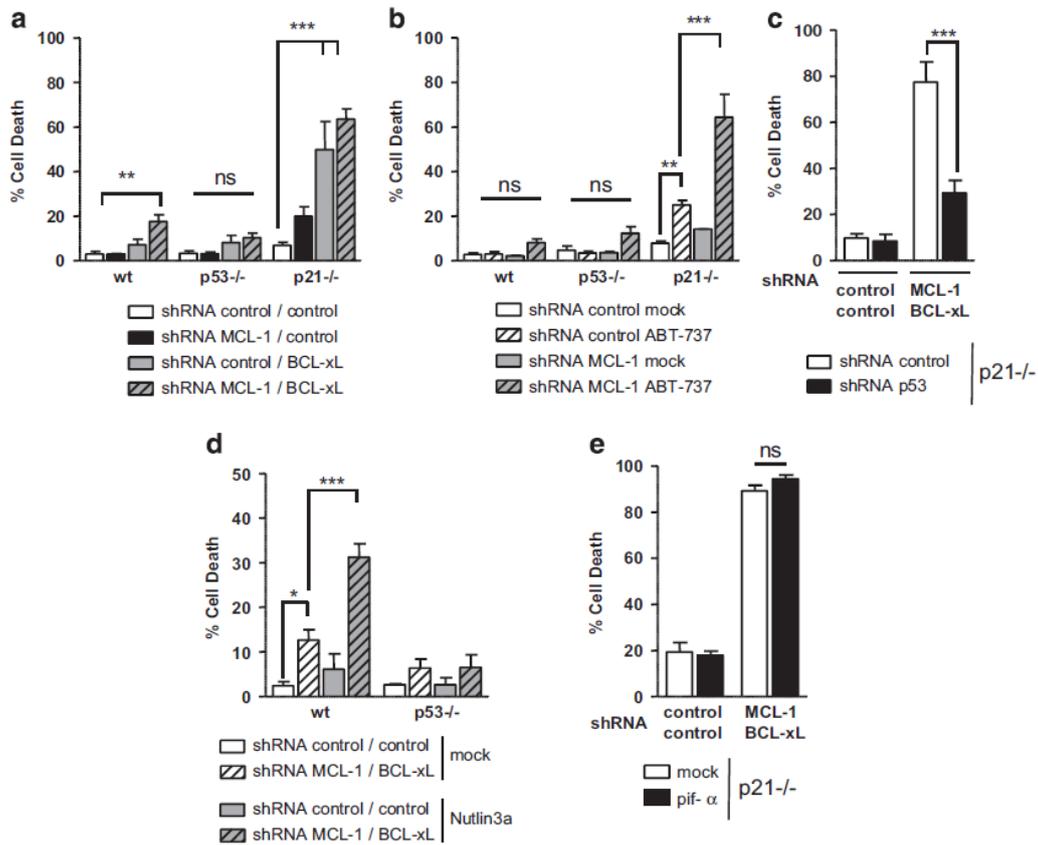


Figure 7 p53 contributes to efficient cell death induced by silencing of MCL-1 and BCL-xL. **(a)** HCT116 wt, p53^{-/-} or p21^{-/-} cells were infected with control or MCL-1 shRNAs. Six hours later, cells were infected with control or BCL-xL shRNAs. Twenty-four hours later, cells were washed, and cell death was assessed after forty-eight additional hours. **(b)** HCT116 wt, p53^{-/-} or p21^{-/-} cells were infected with control or MCL-1 shRNAs. Cells were washed after 24 h, and treated 16 h by 2 μM ABT-737 before cell death analysis. **(c)** HCT116 p21^{-/-} cells previously infected with control or p53 shRNAs were infected with control or MCL-1 shRNAs. Six hours later, cells were infected with control or BCL-xL shRNAs. Twenty-four hours later, cells were washed, and cell death was assessed after 48 additional hours. **(d)** HCT116 wt or p53^{-/-} cells were infected with control or MCL-1 shRNAs. Six hours later, cells were infected with control or BCL-xL shRNAs. Twenty-four hours later, cells were washed and treated by 10 μM Nutlin3a for 48 h before cell death analysis. **(e)** HCT116 p21^{-/-} cells were infected as in c and 24 h later, cells were washed and treated by 40 μM Pifithrin-α (pif-α). Cell death was assessed after 48 additional hours. Data presented are mean ± S.E.M. of three independent experiments. **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001

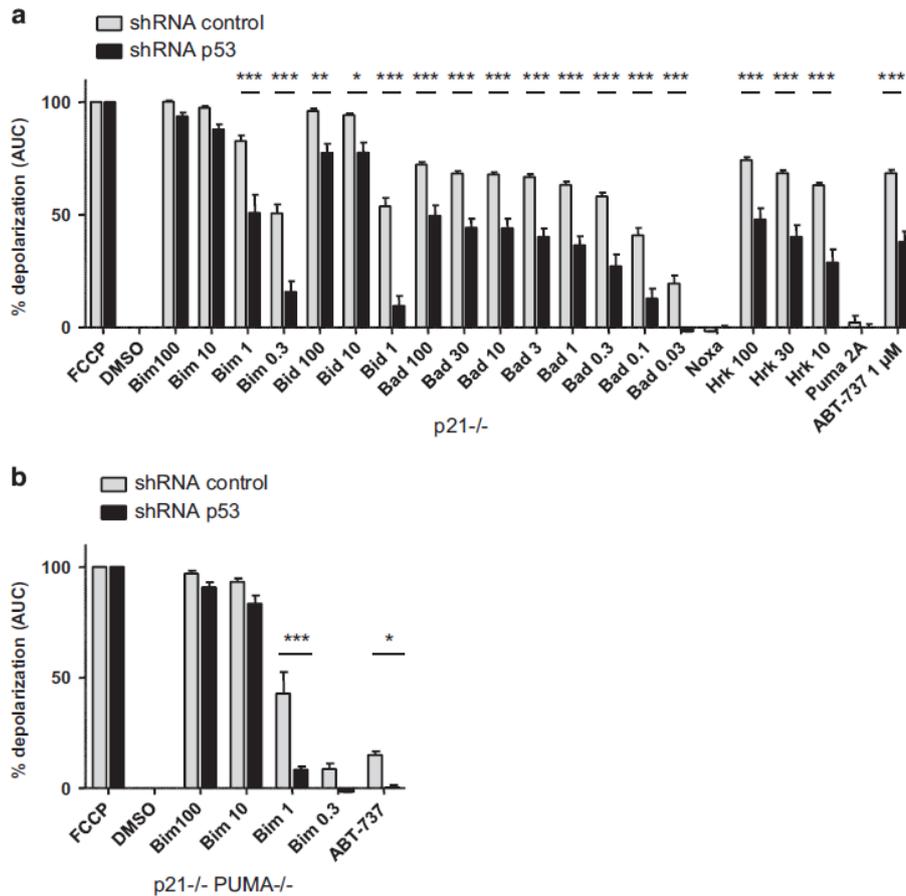


Figure 8 p53 impacts on mitochondrial priming. Mitochondrial depolarization of digitonin-permeabilized HCT116 p21^{-/-} cells (a) or HCT116 p21^{-/-} PUMA^{-/-} cells previously infected with control or p53 shRNAs, stained with the mitochondrial potential sensitive JC1 dye, and treated with a panel of BH3 peptides. Percent depolarization is shown as the area under the curve (AUC) normalized to positive control fully depolarized mitochondria (FCCP). Dimethyl sulfoxide (DMSO) serves as the negative control. Data presented are mean ± S.E.M. of three independent experiments. **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001

As a whole, these data indicate that, in order to favor BAX activation and cell death in response to BH3 mimetics, p53 both facilitates derepression of BAX from BCL-xL by the BH3 mimetics and full-blown BAX activation once BCL-xL is inhibited (or its expression down regulated).

p53 heightens mitochondrial apoptotic priming. We inferred from the above results that, in addition to having a specific effect on the response of BAX/BCL-xL interactions to BH3 mimetics, constitutive p53 would exert a promiscuous effect that amplifies mitochondrial damage in response to most (if not all) perturbations of the BCL-2 network. To test this in an integrated manner, we performed BH3 profiling assays. In these assays, we evaluated, as a marker of mitochondrial integrity, the mitochondrial potential of permeabilized HCT116 p21^{-/-} or p21^{-/-} PUMA^{-/-} cells (in which p53 was downregulated or not) incubated with a range of BH3 peptides and with ABT-737. As shown in Figure 8a, HCT116 p21^{-/-} cells expressing PUMA and p53 (that is, infected with a control shRNA) showed dose-dependent response to BAX activating peptides (BIM-BH3 and BID-BH3) and the sensitizing peptides BAD-BH3 (which targets

BCL-2/BCL-xL) and Harakiri (HRK)-BH3 (which only targets BCL-xL) but did not respond to the NOXA-BH3 peptide (which inhibits MCL-1). This is in agreement with a critical role for BCL-xL in maintaining the survival of these apoptotic competent cells. Downregulation of p53 by shRNA decreased the response to active peptides. Whereas p53-depleted cells had a diminished response even to the highest concentrations of BAD-BH3 and HRK-BH3, they only resisted to intermediate concentrations of BID and BIM-BH3 peptides (Figure 8a). This indicates that constitutive p53 may provide an active mitochondrial damaging signal that remains limiting when sensitizing peptides are used but that can be bypassed by high concentrations of activating peptides. Moreover, BH3 profiling experiments were consistent with the notion that this signal is independent from an effect of PUMA on mitochondrial priming (ref. 13 and manuscript in preparation). PUMA-deficient cells had, indeed, diminished responses to low doses of BIM-BH3 and to ABT-737 (compare Figure 8b with 8a), that were further decreased by p53 depletion (Figure 8b). Altogether, these data indicate that constitutive p53 heightens mitochondrial priming by an effect that is independent from, and adds to, that of PUMA.

Discussion

ABT-737 and its orally available equivalent ABT-263 do not target MCL-1 but inhibit both BCL-2 and BCL-xL. As the latter is arguably the most potent anti-apoptotic protein of the family and a major contributor to drug resistance, such compounds are likely to have a role to play in a chemotherapeutic setting. The clinical use of BH3 mimetic inhibitors of BCL-xL is, however, limited by their secondary effects, in particular on platelets. Identifying parameters that determine the therapeutic window of these compounds is therefore important. It is thus of particular relevance to report that p53, even when expressed constitutively under conditions where it does not influence the expression of its proapoptotic transcription targets, enhances cell death induced by BCL-xL inhibition. On one hand, this implies that BH3 mimetics may not totally substitute for the lack of an active p53 tumor suppressor in cancer cells. On the other hand, it implies that healthy tissues may be more harmed than anticipated when BCL-xL inhibitors are combined with chemotherapeutic agents that even mildly affect p53.

BH3 mimetics, because they only inhibit selective subsets of antiapoptotic proteins, efficiently induce apoptosis when two types of signals are also present: signals that inhibit other anti-apoptotic proteins (MCL-1 in the case of ABT-737) and signals that trigger BAX activation. Our results are in line with preceding results and underscore that, to the very least in the case of ABT-737 treatment of the cells used here, NOXA contributes to the former signals, and constitutive PUMA to the latter. However, p53 does not promote ABT-737 induction of cell death solely via expression of either one of these two main actors. Indeed, p53 exerts a proapoptotic activity even in MCL-1-depleted cells. Thus, the apoptotic function of p53 extends beyond inhibition of MCL-1 by induction of NOXA. Moreover, p53 was dispensable for ABT-737 treatment to induce expression of NOXA, an effect we recently reported to rely on the pRB/E2F-1 pathway in p53 mutant cells.¹⁷ We also found no evidence of a role of p53 in the expression of PUMA in cells where it nevertheless contributes to cell death. The fact that enhancement of p53 expression sensitizes PUMA knock out cells to ABT-737 demonstrates that p53 exerts a BAX-dependent apoptotic effect that is independent from PUMA, even though it might cooperate with it to favor cell death.

That constitutive p53 heightens mitochondrial priming in cooperation with (and not via) BH3-only proteins is particularly well illustrated by BH3 profiling assays. These assays reveal that down regulation of p53 impacts on the mitochondrial response to numerous BH3 peptides, even in cells where this response is lowered by PUMA knock out (which impacts in itself on mitochondrial priming independently from p53). p53 depletion diminishes the response to low concentrations of activator BH3 peptides but not to higher concentrations. This is mostly consistent with the notion that constitutive p53 provides signals that cooperate with BH3-mediated activation of BAX, and that are dispensable for MOMP to occur when a sufficient amount of activator BH3 molecules are present. In agreement with this, we found that p53 was required for BAX translocation, change of conformation and oligomerization to be fully patent in cells treated with BH3 mimetics, even though all these events can be reproduced in the absence of p53 in cell-free assays.^{5,13}

Another important implication from the BH3 profiling assays

is that the effect of p53 on MOMP lies, at least partly, downstream of anti-apoptotic proteins, as p53 depletion confers resistance to induction of MOMP by the highest concentrations of the sensitizer BAD and HRK-BH3 peptides we could test. In further support of this idea, we found that p53 still had an apoptotic role in cells that were depleted in BCL-xL and/or MCL-1. This implies that p53 would exert a promiscuous, positive, effect on BAX activity regardless of the identity of the antiapoptotic proteins that keep this activity in check. Our observations may thus extend to BCL-2 or MCL-1 inhibition. Arguably, the effect of p53 on the sensitivity of BCL-xL/BAX interactions to ABT-737 might appear as an additional effect, as it implies that p53 might have a specific influence on BCL-xL. We cannot formally rule out, however, that it ensues from a single effect on BAX that favors its displacement from BCL-xL in the same time as its activation.

Pretreatments with either Pifithrin- α (or α -Amanitin) did not inhibit cell death induced by ABT-737, or by the silencing of MCL-1 and BCL-xL, which is reminiscent of their lack of inhibitory effect on Nutlin-induced p53-dependent apoptosis in HCT116 cells.^{32,34} This argues that p53 would exert at least some of its proapoptotic effects by a transcription-independent function,^{21,23,24,26,27,35–38} possibly from the cytoplasm where we found p53 to partly reside in the cells used here (data not shown). It is particularly relevant here to recall that the DNA binding domain of p53 can interact with BCL-xL. This interaction is favored by tetramerization of p53 and it influences the BH3 binding activity of BCL-xL even though it does not occur at the BH3 binding site *stricto sensu*.^{21,23,24} p53 might also directly activate BAX and/or BAK by a similar, yet to be fully characterized, type of interaction.^{27,28,36,37} A recombinant p53 constructs encompassing residues 79–393³⁸ had no detectable effect on the priming of HCT116 p21^{-/-} cells (whether they had been depleted in p53 by RNA interference or not prior the assays, data not shown). When incubated with mitochondria isolated from BAX/BAK null mouse embryonic fibroblasts, this recombinant p53 did not trigger cytochrome c release by itself, did not activate recombinant BAX, did not enhance the effects of tBID on BAX, and did not derepress the inhibitory effects of BCL-xL (Supplementary Figure S6). Since this construct lacks the N-terminal transcriptional activation region, this brings support to the notion that this latter portion, but not the DNA binding domain *per se* is involved in BAX activation.^{39,40} *Cis-trans* interconversion of Pro47 in this domain by the prolyl isomerase Pin1 was shown recently to enhance p53 induced BAX activation.⁴¹ Of note, we could not find evidence of specific interactions between constitutive p53 and either BAX or BCL-xL in co-immunoprecipitations assays in the cells used in this study, and we failed to detect specific BRET signals between ectopic p53 and any of these BCL-2 proteins (data not shown). We thus can not formally rule out that p53, in addition to its direct effects on BAX, might exert other effects on mitochondrial apoptotic priming.

Taken together, our data unravel widespread effects of p53 on mitochondrial priming. Mitochondrial priming may thus acutely respond to the many stresses that stabilize and activate p53. As BH3 profiling assays are quite sensitive to detect such changes, that can occur without any overt activation of a p53 transcriptional program, this underscores their potential as biomarkers predicting cytotoxicity (and BCL-2 dependency)

in a dynamic manner⁴² and the role of mitochondria as a «sounding board» of stress signals. From a clinical standpoint, the preferred sensitivity to BH3 mimetics of cells that express higher levels of p53 implies that BH3 mimetic treatment may skew clonal diversity and counter-select for cells with less (or less responsive) p53. Understanding the mechanistic basis for p53 induced priming, and finding approaches to bypass the consequences of p53 defects on this priming, are therefore required to avoid this bias.

Material and methods

Cell culture. The Cal51 cell line obtained from ATCC, was grown in RPMI medium. The HCT116 cell lines (parental, p21^{-/-}, p53^{-/-} and p21^{-/-} PUMA^{-/-}), grown in McCoy's 5A, were kindly provided by Dr. B. Vogelstein (John Hopkins Kimmel Cancer Center, Baltimore, MD, USA). When specified, we used ABT-737 at 2 μM, WEHI-539 at 2 μM, Nutlin-3a at 10 μM (Sigma, St. Louis, MO, USA), Etoposide at 50 μM (Sigma), Pifithrin-α at 40 μM (Sigma), α-Amanitin at 10 μM (Sigma), QVD-OPH at 10 μM (R&D System, Minneapolis, MN, USA).

Plasmids, RNA interferences and recombinant proteins. Cells were transfected with pcDNA3 (as a control vector) or pcDNA3-NOXA vector using Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Control siRNA or p21 siRNA (Santa-cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA, respectively #44230 and #29427) were transfected using HiPerfect transfection reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA). We used the following lentivirus: PFG12 and PLKO1; bacterial LacZ as control (5'-gtgaccagcgaatacctgt-3'), human BCL-xL (5'-AGGATACAGCTGGA GTCAG-3'), and human MCL-1 (5'-gaatgccagtgacctgt-3'); p53 and control were from Addgene, Cambridge, MA, USA (respectively #25636 and #8453). Lentivirus were engineered, produced and titrated as previously described.¹³ A multiplicity of infection of three was used, and further experiments were performed 2 days after infection. Cells infected by PLKO1 were selected by adding 1 μg/ml of puromycin to the medium, and cells were used during a maximum of 4 weeks.

The recombinant His-tagged full length BAX and caspase-8-cleaved BID (tBID) were prepared as previously described.⁴³ The recombinant p53 was kindly provided by Professor Halazonetis and prepared as previously described.³⁸

Cellular assays. Bioluminescence Resonance Energy Transfer assays were performed as previously described.³³ Briefly, the indicated cells were seeded on 12 plates and transfected with 50 ng/well of pRLuc-BAX vector (BRET donor, BAX fused to luciferase), and increasing amount (for saturation curves), or 200 ng/well (for dose-response curves), of peYFP-BCL-xL vector (BRET acceptor, BCL-xL fused to eYFP). Twenty-four hours later, cells were reseeded into white 96-well plate and treated as indicated. Light emissions at 485 and 530 nm were measured consecutively by using the Mithras fluorescence-luminescence detector LB-940 (Berthold, Thoiry, France) after addition of 5 μM of the luciferase substrate (coelenterazine H from Uptima, Montlucon, France). The BRET signal was determined by calculating the ratio of the light emitted by the acceptor protein eYFP-BCL-xL (530 nm) over the light emitted by the donor protein RLuc-BAX (475 nm), and corrected by subtracting the background signal detected with a non-tagged BCL-xL.

Mitochondrial profiling was performed as previously described.⁴⁴ BH3 peptide diluted in T-EB (300 mM Trehalose, 10 mM HEPES-KOH pH7.7, 80 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1% BSA, 5 mM succinate) were deposited per well in a black 384-well plate. Cells were washed in T-EB, resuspended and added to one volume of a dye solution containing 4 μM JC-1, 40 μg/ml oligomycin, 0.02% digitonin, 20 mM 2-mercaptoethanol in T-EB. This cell/dye solution stood 10 min at RT to allow permeabilization and dye equilibration. Fifteen microliters of the cell/dye mix was added to each treatment well of the plate (final concentration of 2 × 10⁴ cells/well), shaken for 15 s inside the reader, and the fluorescence at 590 nm monitored every 5 min at 32 °C for 3 h. Percentage loss of Ψ_m for the peptides is calculated by normalization to the solvent only control DMSO and the positive control FCCP. PUMA2A is an inert double alanine-substituted PUMA BH3 peptide serving as a negative control. Individual DBP analysis were performed using triplicates for DMSO, FCCP, and the different BH3 concentrations used, and the expressed values stand for the average of three different readings.

Luciferase assays were performed by cotransfecting cells with TA-luciferase control vector or p53-reporter luciferase vector (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA, Briefly, 15 μl of #LR0000 and #LR0057, respectively) and with pCMV-β-

galactosidase vector. After treatment, cells were lysed under agitation in PLB (Promega, Madison, WI, USA) and luciferase activity was measured using Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). β-galactosidase activity was measured using the specific assay reporter system (Promega). The luciferase activity was reported to the β-galactosidase activity, and is shown relative to the untreated condition.

Coimmunoprecipitation assays, using 1 μg of the indicated antibody and 500 μg of protein lysates in 1% CHAPS buffer with protease phosphatase inhibitors, were performed with protein A/G-agarose PureProteome system (Millipore) as previously described.¹³ CHAPS buffer has been previously reported not to activate BAX.^{45,46} After western blotting, proteins were revealed using clean-blot IP reagent Pierce (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

For immunocytochemical assays, cells were incubated 15 min with 150 nM de MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen), washed with PBS and fixed with 1% paraformaldehyde in PBS for 30 min at RT. Cells were washed in PBS and permeabilized with 0.1% SDS in PBS for 10 min at RT. Cells were washed and, after a 30-min saturation with 5% BSA in PBS at 37 °C, were incubated with primary antibodies diluted in 1% BSA in PBS overnight at 4 °C (BAX A3533, Dako, Glostrup, Denmark). After three washes in PBS, incubation with secondary antibodies (anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor 488) was performed in 1% BSA in PBS for 2 h at 37 °C. Cells were then washed and mounted in ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen). Representative images were acquired on Zeiss Axiovert 200M.

After washing with PBS, cells for crosslinking experiments were lysed on ice using 1% CHAPS buffer with protease phosphatase inhibitors, and extract were cleared by centrifugation 15 min 13 000 g at 4 °C. Hundred micrograms of protein extract were incubated with 5 mM of DSS in Hepes 20 mM buffer. After 30 min agitation at room temperature, 50 mM of Tris-HCl pH7.5 was added to stop the reaction. After 15 min of incubation, crosslinked extracts were denaturated for electrophoresis and western-blotting.

Cell viability was determined by a trypan blue staining procedure.

Immunoblot and antibodies. After two washings with cold PBS, cells were lysed in ice-cold lysis buffer (SDS 1%; EDTA 10 mM; Tris-HCl pH8.1 50 mM; protease inhibitors, Na3VO4 1 mM, NaF 100 ×) and extracts were sonicated. Protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred onto a PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) and revealed with a chemiluminescence kit (Millipore). Presented Western-Blot are representative of three independent experiments. Following antibodies were used: actin (MAB1501R, Millipore), β-tubulin (T0198, Sigma), BAX (A3533, Dako), BCL-xL (1018-1, Epitomics), cytochrome c (BD-Pharmingen San Diego, CA, USA), MCL-1 (sc-819, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), NOXA (ALX-804-408, Enzo Life Science, New York, NY, USA), PUMA (12450, Cell Signalling), p21 (2947, Cell Signalling), p53 (#554294, BD-Pharmingen). The above antibodies against BAX, BCL-xL and p53 were also used for immunoprecipitations, as those against BAX 6A7 (ab5714, Abcam, Cambridge, UK) and FLAG-tag (F1804, Sigma).

Quantitative PCR. Total RNA were extracted from cells using a kit Nucleospin RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer instructions. Retrotranscription was performed from 500 ng RNA using Maxima First strand cDNA Synthesis kit for RT-q-PCR (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Quantitative PCR was performed with EuroBioGreen qPCR Mix Lo-ROX (Eurobio, Courtabouef, France) from 4 ng of retrotranscribed RNA using a Stratagene Mx3005P (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Data were analyzed using Pfaffl method with three references genes (*ActB*, *RPLP0* and *RPS18*)⁴⁷ and presented in mRNA levels relative to untreated cells.

Following primers were used:

BAX (5'-GCAACTTCAACTGGGGCCGGG/GATCCAGCCCAACAGCCGCTC-3');
PUMA (5'-GGAACAGTGGGCCCCGGGAGA/GTGCCGCTGTCTCCTCTT-3');
ActB (5'-AGAAAATCTGGCACCACACC/CAGAGGCGTACAGGGATAGC-3');
RPLP0 (5'-AACCAGCTCTGGAGAACT/CCCTGGAGATTTTAGTGGT-3');
RPS18 (5'-ATCCCTGAAAAGTCCAGCA/CCCTTGGTGGAGTCAATG-3').

Data analysis. Data were from three independent experiments. Unless otherwise stated, statistical analysis of data was performed using two-ways ANOVA with Bonferonni post-test on GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA). Error bars represent S.E.Ms. The following symbols are used: *, ** and *** that correspond to a *P*-value inferior to 0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We thank members of the 'Cell Survival and Tumor Escape in Breast Cancer' laboratory for their technical advice, fruitful comments and enthusiasm. We thank Thanos Halazonetis for his kind sharing of the p53 (79–393) construct. We thank Céline Couriaud for her technical help in the preparation of lentivirus particles. We thank Philippe Hulin for his technical support at the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell). JLP and CV are supported by grants from INSERM Region and the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur respectively. This work was supported by Région Pays de la Loire (CIMATH2), Ligue contre le Cancer (R13137) and ARC (R15083NN).

- Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004; 432:307–315.
- Chipuk JE, Fisher JC, Dillon CP, Kriwacki RW, Kuwana T, Green DR. Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 20327–20332.
- Martinou J-C, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell* 2011; 21:92–101.
- Tait SWG, Green DR. Cell survival in tough times: The mitochondrial recovery plan. *Cell Cycle Georget Tex* 2010; 9: 4254–4255.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 2010; 37: 299–310.
- Lalier L, Cartron PF, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B *et al*. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis Int J Program Cell Death* 2007; 12: 887–896.
- Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 508–520.
- Gautier F, Guillemin Y, Cartron PF, Gallenne T, Cauquil N, Le Diguarher T *et al*. Bax activation by engagement with, then release from, the BH3 binding site of Bcl-xL. *Mol Cell Biol* 2011; 31: 832–844.
- Leber B, Lin J, Andrews DW. Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene* 2010; 29: 5221–5230.
- Czabotar PE, Westphal D, Dewson G, Ma S, Hockings C, Fairlie WD *et al*. Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* 2013; 152: 519–531.
- Moldoveanu T, Grace CR, Llambi F, Nourse A, Fitzgerald P, Gehring K *et al*. BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20: 589–597.
- Peng R, Tong JS, Li H, Yue B, Zou F, Yu J *et al*. Targeting Bax interaction sites reveals that only homo-oligomerization sites are essential for its activation. *Cell Death Differ* 2013; 20: 744–754.
- Gallenne T, Gautier F, Oliver L, Hervouet E, Noël B, Hickman JA *et al*. Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J Cell Biol* 2009; 185: 279–290.
- Ren D, Tu HC, Kim H, Wang GX, Bean GR, Takeuchi O *et al*. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science* 2010; 330: 1390–1393.
- Ding J, Mooers BH, Zhang Z, Kale J, Falcone D, McNichol J *et al*. After embedding in membranes antiapoptotic Bcl-XL protein binds both Bcl-2 homology region 3 and helix 1 of proapoptotic Bax protein to inhibit apoptotic mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem* 2014; 289: 11873–11896.
- Ni Chonghaile T, Letai A. Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene* 2008; 27 (Suppl 1): S149–S157.
- Bertin-Ciftci J, Barré B, Le Pen J, Maillet L, Couriaud C, Juin P *et al*. 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* 2013; 20: 755–764.
- Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 749–758.
- Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 332–337.
- Comel A, Sorrentino G, Capaci V, Del Sal G. The cytoplasmic side of p53's oncosuppressive activities. *FEBS Lett* 2014; 588: 2600–2609.
- Deng X, Gao F, Flagg T, Anderson J, May WS. Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 4421–4434.
- Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 2009; 458: 1127–1130.
- Hagn F, Klein C, Demmer O, Marchenko N, Vaseva A, Moll UM *et al*. BclxL changes conformation upon binding to wild-type but not mutant p53 DNA binding domain. *J Biol Chem* 2010; 285: 3439–3450.
- Han J, Goldstein LA, Hou W, Gastman BR, Rabinowich H. Regulation of mitochondrial apoptotic events by p53-mediated disruption of complexes between antiapoptotic Bcl-2 members and Bim. *J Biol Chem* 2010; 285: 22473–22483.
- Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787: 414–420.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M *et al*. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 2004; 303: 1010–1014.
- Leu J. I.-J., Dumont P, Hafez M, Murphy ME, George DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 443–450.
- Sot B, Freund SMV, Fersht AR. Comparative biophysical characterization of p53 with the pro-apoptotic BAK and the anti-apoptotic BCL-xL. *J Biol Chem* 2007; 282: 29193–29200.
- Ferrandiz N, Martin-Perez J, Blanco R, Donertas D, Weber A, Eilers M *et al*. HCT116 cells deficient in p21Waf1 are hypersensitive to tyrosine kinase inhibitors and adriamycin through a mechanism unrelated to p21 and dependent on p53. *DNA Repair* 2009; 8: 390–399.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T *et al*. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288: 1053–1058.
- Song JH, Kandasamy K, Zemskova M, Lin Y-W, Kraft AS. The BH3 Mimetic ABT-737 Induces Cancer Cell Senescence. *Cancer Res* 2011; 71: 506–515.
- Vaseva AV, Marchenko ND, Moll UM. The transcription-independent mitochondrial p53 program is a major contributor to nutlin-induced apoptosis in tumor cells. *Cell Cycle Georget Tex* 2009; 8: 1711–1719.
- Bah N, Maillet L, Ryan J, Dubreil S, Gautier F, Letai A *et al*. Bcl-xL controls a switch between cell death modes during mitotic arrest. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1291.
- Arima Y, Nitta M, Kuninaka S, Zhang D, Fujiwara T, Taya Y *et al*. Transcriptional Blockade Induces p53-dependent Apoptosis Associated with Translocation of p53 to Mitochondria. *J Biol Chem* 2005; 280: 19166–19176.
- Follis AV, Llambi F, Ou L, Baran K, Green DR, Kriwacki RW. The DNA-binding domain mediates both nuclear and cytosolic functions of p53. *Nat Struct Mol Biol* 2014; 21: 535–543.
- Pietsch EC, Perchiniak E, Canutescu AA, Wang G, Dunbrack RL, Murphy ME. Oligomerization of BAK by p53 utilizes conserved residues of the p53 DNA binding domain. *J Biol Chem* 2008; 283: 21294–21304.
- Nieminen AI, Eskelinen VM, Haikala HM, Tervonen TA, Yan Y, Partanen JI *et al*. Myc-induced AMPK-phospho p53 pathway activates Bak to sensitize mitochondrial apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: E1839–E1848.
- Petty TJ, Emamzadeh S, Costantino L, Petkova I, Stavridi ES, Saven JG *et al*. An induced fit mechanism regulates p53 DNA binding kinetics to confer sequence specificity. *EMBO J* 2011; 30: 2167–2176.
- Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Kazaz A, Vousden K, Oren M. p53 mediated apoptosis in HeLa cells: transcription dependent and independent mechanisms. *Leukemia* 1997; 11 (Suppl 3): 337–339.
- Chipuk JE, Maurer U, Green DR, Schuler M. Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* 2003; 4: 371–381.
- Follis AV, Llambi F, Merritt P, Chipuk JE, Green DR, Kriwacki RW. Pin1-induced proline isomerization in cytosolic p53 mediates BAX activation and apoptosis. *Mol Cell* 2015; 59: 677–684.
- Montero J, Sarosiek KA, DeAngelo JD, Maertens O, Ryan J, Ercan D *et al*. Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. *Cell* 2015; 160: 977–989.
- Montessuit S, Somasekharan SP, Terrones O, Lucken-Ardjomande S, Herzig S, Schwarzenbacher R *et al*. Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell* 2010; 142: 889–901.
- Sarosiek KA, Chi X, Bachman JA, Sims JJ, Montero J, Patel L *et al*. BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. *Mol Cell* 2013; 51: 751–765.
- Hsu YT, Youle RJ. Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 1997; 272: 13829–13834.
- Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 2000; 345(Pt 2): 271–278.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: e45.



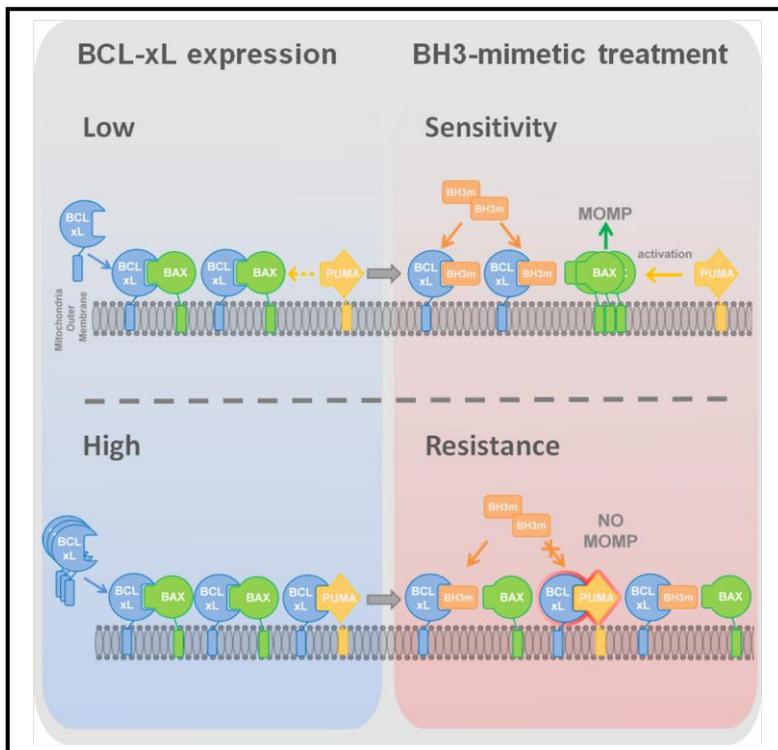
Cell Death and Disease is an open-access journal published by *Nature Publishing Group*. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on *Cell Death and Disease* website (<http://www.nature.com/cddis>)

Les travaux de Jessie Pécot, auxquels j'ai eu l'occasion de prendre part, mettent en évidence un rôle critique de la localisation et mobilité des protéines anti-apoptotiques pour leur fonction inhibitrice de la mort cellulaire (publication *in press*, présentée en **Annexe 2**). Les cellules tumorales, présentant un fort taux d'expression de Bcl-xL, sont peu sensibles à l'action du BH3-mimétique Wehi-539 (spécifique de Bcl-xL). Une étude moléculaire des interactions engagées entre Bcl-xL et ses contreparties pro-apoptotiques a été effectuée, par une approche de BRET en cellules entières, afin d'analyser les effets du Wehi-539. Les données obtenues indiquent que, contrairement aux études *in vitro* acellulaires, certaines de ces interactions résistent à l'action du traitement bien qu'elles impliquent la poche hydrophobe de Bcl-xL. C'est le cas de Puma – Bcl-xL. La sensibilité de l'interaction au Wehi-539 dépend de la localisation et de la mobilité de Bcl-xL. En effet, un regain de sensibilité est obtenu avec Bcl-xL ΔC cytosolique et Bcl-xL $\Delta 2$ dont la mobilité et la localisation cytosolique sont accentuées comparé à Bcl-xL sauvage. L'étude a alors été étendue à d'autres complexes de la famille Bcl-2. Les interactions de Puma et Bim avec Bcl-xL sont insensibles au traitement par le Wehi-539 contrairement aux interactions de ces deux BH3-Only avec Bcl-xL ΔC . Les couples Bak ou Bad avec Bcl-xL répondent à l'action du traitement mais de façon accrue avec la forme cytosolique de Bcl-xL. En revanche, les interactions entre les pro-apoptotiques Bax ou Bid avec Bcl-xL sont extrêmement sensibles à l'action du Wehi-539, et ce qu'importe le statut de Bcl-xL : lié ou non aux membranes. Des constatations similaires ont été faites avec l'anti-apoptotique Bcl-2. En effet, l'absence de liaison aux membranes sensibilisent les complexes Bcl-2 – Bim/Puma/Bad au BH3-mimétique ABT-199 (spécifique de Bcl-2). Le modèle mito-priming (développé par l'équipe de Tait) a été utilisé pour générer des fonds cellulaires dépendants de l'interaction Puma – Bcl-xL ou tBid – Bcl-xL. Dans le 1^{er} cas, une faible réponse apoptotique au Wehi-539 est observée, tandis que le 2nd présente une bonne sensibilité à l'action du traitement. Ainsi la sensibilité de certains complexes anti – pro-apoptotiques peut dépendre de la localisation et/ou mobilité des protéines anti-apoptotiques ce qui influence la réponse aux thérapies anti-cancéreuses.

Tight sequestration of BH3 proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes Contributes to Apoptotic Resistance

Graphical Abstract



Authors

Jessie Pécot, Laurent Maillet, Janic Le Pen, Céline Vuillier, ..., Anthony Letai, Stephen W.G. Tait, Fabien Gautier, Philippe P. Juin

In Brief

Pécot et al. show that sequestration of pro-apoptotic proteins by BCL-xL is favored by its membrane binding and low level mitochondrial translocation dynamics. This explains why membrane-localized BCL-xL has enhanced anti-apoptotic properties and establishes that intracellular localization of BCL-xL *per se* is critical for cell survival regulation.

Highlights

- BH3-mimetics inefficiently derepress BCL-xL inhibition of PUMA-induced BAX activation
- BH3 mimetics do not target all intracellular BCL-xL complexes equally well
- Membrane-binding of BCL-xL contributes to BH3-mimetics resistance

Tight sequestration of BH3 proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes Contributes to Apoptotic Resistance

Jessie Pécot^{1±}, Laurent Maillet^{1±}, Janic Le Pen¹, Céline Vuillier¹, Sophie de Carné Trécesson^{1 #}, Aurélie Fétiveau¹, Kristofer Sarosiek³, Florian J. Bock⁴, Frédérique Braun^{1 0}, Anthony Letai³, Stephen W.G. Tait⁴, Fabien Gautier^{2 1*}, Philippe P. Juin^{1 2*#}

¹ CRCNA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France.

² ICO René Gauducheau, Saint Herblain, France

³ Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA 02215, USA

⁴ Cancer Research UK Beatson Institute ; Institute of Cancer Sciences ; University of Glasgow ; Garscube Estate, Switchback Road Glasgow, G61 1BD United Kingdom

[±]The authors contributed equally to this work.

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

⁰ current address : CNRS FRE3630 (affiliated with Univ.Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité), Institut de Biologie Physio-chimique, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

* corresponding authors

philippe.juin@univ-nantes.fr, fabien.gautier@univ-nantes.fr

lead contact

SUMMARY

Anti-apoptotic BCL-2 family members bind to BH3-only proteins and multidomain BAX/BAK to preserve mitochondrial integrity and maintain survival. Whereas inhibition of these interactions is the biological basis of BH3-mimetic anti-cancer therapy, the actual response of membrane-bound protein complexes to these compounds is currently ill-defined. Here we find that treatment with BH3 mimetics targeting BCL-xL spares subsets of cells with the highest levels of this protein. In intact cells, sequestration of some pro-apoptotic activators (including PUMA and BIM) by full length BCL-xL is much more resistant to derepression than previously described in cell-free systems. Alterations in the BCL-xL C-terminal anchor that impact on subcellular membrane targeting and localization dynamics restore sensitivity. Thus, the membrane localization of BCL-xL enforces its control over cell survival and it importantly limits the pro-apoptotic effects of BH3-mimetics through selectively influencing BCL-xL binding to key pro-apoptotic effectors.

INTRODUCTION

The BCL-2 family proteins are major regulators of mitochondrial outer membrane permeabilisation (MOMP) and subsequent apoptosis in response to bacterial infection, immune responses, intrinsic tumor suppression and anti-cancer therapy. This family functions as a network of interacting proteins where anti-apoptotic proteins oppose multidomain and BH3-only pro-apoptotic proteins. Anti-apoptotic proteins (including BCL-2, BCL-xL, MCL-1) share four BCL-2 homology domains (BH1-4). They localize preferentially at intracellular membranes, predominantly the outer mitochondrial membrane, due to their hydrophobic C-terminal anchor (Juin et al., 2013). Multi-domain pro-apoptotic proteins (BAX, BAK) only have three BH domains (BH1-3). They are produced mainly as inactive proteins that localize either in the cytosol or at the mitochondria and that, upon activation, insert into mitochondrial membranes where they trigger MOMP. BH3-only proteins (including BIM, BID and, PUMA) trigger apoptosis upstream of BAX/BAK. Some of them (such as BIM or PUMA) interact with mitochondria by themselves as they harbor specific targeting domains in their sequence (Wilfling et al., 2012). BH3-only proteins act as stress sensors and are activated transcriptionally, translationally and/or post-translationally by numerous stimuli.

Induction of MOMP by pro-apoptotic BCL-2 members occurs through an ordered series of molecular events in which BH3 domains play a critical role. BAX/BAK, essential effectors of MOMP in mammalian cells, permeabilize mitochondrial membranes as active oligomers. Oligomerization is initiated by a nucleating dimer formed by the binding of the BH3 domain of one molecule into a hydrophobic groove formed by the BH1, 2 and 3 domains of a second molecule (Dewson et al., 2009, 2012). The BH3 domain is buried in inactive BAX/BAK and its exposure is required for this dimerization (Czabotar et al., 2013, Moldoveanu et al., 2014). Such exposure is favored by the direct interaction of the BH3 domain of a subset of «activator» BH3-only proteins (namely these of BID, BIM or PUMA), with BAX (possibly at two sites: Gavathiotis et al., 2008, Czabotar et al., 2013) and BAK. Activation of BAX/BAK is thus initiated by a ligand-induced process that mitochondrial membranes also contribute to (Leber et al., 2010).

Anti-apoptotic BCL-2 proteins inhibit MOMP by competing with BAX/BAK for binding to activator BH3-only proteins and to themselves (Billen et al., 2008; Chen et al., 2015). They do so in great part by engaging BH3 domains of the former and the latter, at the level of a hydrophobic groove that is structurally similar to that mentioned above in BAX/BAK, yet forms a more stable

complex upon binding. This is negatively regulated by «sensitizer» BH3-only proteins that only interact with the BH3 binding sites of BCL-2 homologues, but not with BAX/BAK. There are notable differences in the BH3 binding sites of BCL-2, BCL-xL and MCL-1 which explain that they engage into preferential interactions with sensitizer BH3-only proteins and with BAX/BAK. Therefore they exert complementary, differentially regulated survival activities. These proteins are frequently overexpressed in cancer cells, so that intrinsic tumor suppressor pathways and conventional therapy fail to trigger BAX/BAK activation. Compounds that would overcome these effects are thus of major interest. «BH3 mimetics» inhibitors (ABT-737 or ABT-263 that target BCL-2, BCL-xL and BCL-w or WEHI-539 that selectively targets BCL-xL) have been designed based on their ability to selectively occupy the BH3 binding sites of specific subsets of BCL-2 homologs and some have entered clinical trials. These compounds are also powerful cell-permeant probes to understand how the BH3 binding activities of distinct BCL-2 homologs regulate survival in a whole cell context.

Targeting BCL-xL is critical for cancer treatment because this protein is widely overexpressed in cancers, because it binds to a wider range of pro-apoptotic proteins than any other known BCL-2 homologs and because its expression is a marker of chemoresistance (Amundson et al., 2000, Wei et al., 2012). The on-target, dose-limiting effects of BH3-mimetics on platelet survival indicate that pharmacological inhibition of BCL-xL can be achieved by these compounds in vivo (Wilson et al., 2010). However, some studies hinted that BH3 mimetics might not fully inhibit intracellular BCL-xL in cancer cells (Mérino et al., 2012, Rooswinkel et al., 2012). The reason for this lack of efficiency, which implies that survival regulation by BCL-xL is tighter than expected, is currently unclear. In this study, using whole cell systems, we show that the cell survival activity of BCL-xL is only partly antagonized by BH3 mimetics. Intracellular interactions between BCL-xL and a subset of pro-apoptotic proteins (including the activators PUMA and BIM) resist more to BH3 binding inhibition than anticipated from preceding studies using soluble forms of BCL-xL generally assumed to be fully BH3 binding competent. The robustness of PUMA/BCL-xL interactions, in particular, prevents BH3 mimetics from exploiting PUMA's ability to trigger BAX dependent cell death and this is likely to limit their effect in a chemotherapeutic setting, since PUMA and BAX play a role in chemotherapy induced apoptosis (Jeffers et al., 2003). We show that sequestration of pro-apoptotic proteins by BCL-xL is favored by its membrane binding and low level mitochondrial translocation dynamics. This explains why membrane-localized BCL-xL has enhanced anti-apoptotic properties (including in response to BH3 mimetics) and establishes that intracellular localization of BCL-xL per se is critical for survival regulation.

RESULTS

BCL-xL mediated inhibition of PUMA-induced BAX-mediated cell death is only partly de-repressed by BH3 mimetics

To investigate how efficiently the anti-apoptotic function of intracellular BCL-xL is antagonized by inhibition of its BH3 binding, we first evaluated how variations in BCL-xL expression impact on cell death induction by cell permeant BH3 mimetics. We essentially employed HCT116 p21^{-/-} cells: these cells die upon depletion of BCL-xL by RNA interference and thus represent a model of BCL-xL dependent cells (Cartron et al., 2004, Gallenne et al., 2009). We used a HCT116 p21^{-/-} cell line expressing endogenous BCL-xL (“control cells”: HCT116 p21^{-/-} pLVX) and a cell line stably expressing an average 4-fold increase in BCL-xL expression (“BCL-xL high expresser cells”: HCT116 p21^{-/-} pLVX(BCL-xL) (Figure S1). BH3 profiling assays support earlier findings that these cells are dependent on BCL-xL survival function (Figure S1).

As shown in Figure 1A, treatment with WEHI-539 triggered cell death in a fraction of control HCT116 p21^{-/-} cells. BCL-xL high expresser cells resisted significantly more, even when concentrations of WEHI-539 as high as 10 μ M were used (Figure 1A). Although the survival activity of BCL-xL can be derepressed by BH3 mimetics treatment of whole cells, derepression is therefore only partial and it is counteracted by a relatively modest enhancement of BCL-xL expression.

We explored further whether cell-to-cell variations in BCL-xL expression might account for fractional killing by BH3 mimetic treatment. To investigate this, we performed intracellular immunostaining of HCT116 p21^{-/-} pLVX cells to concomitantly measure BCL-xL expression and cleavage of Caspase-3 (as a marker of apoptosis induction) on a single cell basis after their treatment with WEHI-539. As shown in Figure 1B, no detectable cleaved Caspase-3 was measured in untreated HCT116 p21^{-/-} pLVX cells, with an immunostaining that was equivalent to that obtained with a negative isotopic control (data not shown). Treatment with WEHI-539 of HCT116 p21^{-/-} pLVX cells lead to the emergence of a subpopulation that stained positive for cleaved Caspase 3, not observed when HCT116 p21^{-/-} pLVX(BCL-xL) were treated (Figure 1B). Treatment with WEHI-539 of the sensitive HCT116 p21^{-/-} pLVX cell population did not change the global log-normal distribution of BCL-xL expression levels (data not shown). Yet, thorough single-cell examination of the percentage of cleaved Caspase 3 positive cells as a function of the range of BCL-xL expression showed that activation of Caspase 3 occurred preferentially in cells expressing BCL-xL levels below the mean level (Figure 1C). Thus, cell-to-cell differences in the expression of BCL-xL levels, even in an apparently « homogenous » cell population, determine the

response to a given BH3 mimetic treatment over a defined period of time.

To investigate at what level of the apoptotic cascade BCL-xL exerts a BH3 mimetic resistant control, we investigated the effects of varying levels of BCL-xL on BAX activation. The latter pro-apoptotic multi-domain effector plays indeed a major role in cell death induction in our model HCT116 p21^{-/-} cell line upon BCL-xL depletion, and ABT-737 or WEHI-539 treatment (Gallenne et al. 2009 and data not shown). When we performed BAX intracellular staining assays, we found that treatment of control HCT116 p21^{-/-} pLVX cells lead to the generation of a new population of cells that were strongly stained with the anti-BAX antibody (Figure 1D). This was not inhibited by treatment with the caspase inhibitor QVD-Oph (data not shown). We assume that this qualitative change in BAX immunostaining illustrates a change in the nature of its interaction with subcellular membranes and thus in its activation status, as previously described for BAK (Griffiths et al., 1999). We found that overexpression of BCL-xL prevented a change of BAX immunostaining profile upon treatment (Figure 1D). Moreover, we performed intracellular immunostaining to concomitantly measure BAX activation and BCL-xL expression on a single cell basis in WEHI-539-treated control HCT116 p21^{-/-} cells. Single-cell examination, in WEHI-539 treated HCT116 p21^{-/-} pLVX populations, of the percentage of cells highly positive for BAX as a function of the range of BCL-xL expression showed that qualitative changes in BAX immunostaining occurred preferentially in cells of the population that expressed the lowest levels of BCL-xL (Figure 1E). The influence of BCL-xL on conformational changes in BAX upon BH3 mimetic treatment was further documented by monitoring changes in the amino-terminus domain of BAX (that accompany its activation, Hsu and Youle, 1997) by immunoprecipitation assays with the 6A7 antibody (Figure 1F). As shown in Figure 1G, BH3 mimetic treatment enhanced the amount of 6A7 positive BAX molecules in control but not in BCL-xL high expresser cells (Figure 1G). Thus, inhibition of the BH3 binding of BCL-xL does not efficiently relieve its control over BAX activation.

To understand what exact mechanism BCL-xL counteracts to prevent BH3-mimetic induced BAX activation in our model cell line, it should be recalled that we showed that endogenous PUMA, but neither BID nor BIM, plays a key role upstream of BAX during cell death induced by BCL-xL depletion in HCT116 p21^{-/-} cells (Gallenne et al., 2009). PUMA can directly promote BAX activation (Cartron et al., 2004, Ren et al., 2010, Du et al., 2011, Edwards et al., 2013, Hockings et al., 2015). Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) assays (as described below) to monitor BAX oligomerization in whole cells, we found that PUMA favors, whereas BCL-xL prevents, such

assembly in a whole cell context (Data not shown). Moreover, BH3 profiling of HCT116 p21^{-/-} PUMA ^{-/-} pLVX and HCT116 p21^{-/-} PUMA ^{-/-} pLVX(BCL-xL) cells compared to that of PUMA-proficient cells showed differential and additive effects of enhanced BCL-xL expression and PUMA depletion on the apoptotic priming of HCT-116 p21^{-/-} cells, arguing that PUMA provides an « activating » death signal that BCL-xL has to counteract as a BH3 binding protein to maintain survival (Figure S1). Consistently, PUMA deficient cells showed decreased cell death rates (Figure 1A) and less BAX activation (Figure 1D, 1F) upon treatment with BH3 mimetics. As a whole, these data indicate that BCL-xL counteracts PUMA induced BAX mediated cell death by a process that BH3 mimetics only partly derepress. This was further substantiated by experiments using a PUMA inducible cell line or cells where PUMA expression was induced by a genotoxic treatment (Figure S1).

Interactions of BCL-xL with PUMA or BAX in intact cells show differing sensitivity to BH3 binding inhibition

The resistance of cells expressing the highest levels of BCL-xL to BH3 mimetic induction of cell death may simply reflect the fact that these compounds act as competitive inhibitors. Alternatively, it may result from the fact that BCL-xL exerts BH3 mimetic resistant functions to prevent cell death, and in particular antagonize PUMA induced BAX activity. To explore this, we investigated whether some molecular interactions engaged by intracellular BCL-xL would be particularly resistant to derepression using a Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) approach. BRET assays allow to evaluate, within whole live cells, the close proximity between two proteins by measuring energy transfer (upon addition of a Luciferase substrate) between RLuciferase (RLuc, as a donor, fused to one protein) and Yellow Fluorescent Protein (YFP, as an acceptor, fused to the other). To confirm that BRET signals testify specific interactions and do not result from random collisions, we systematically evaluated, following previously published rules (Pleger and Eidne, 2006), the saturable nature of signals observed between a given level of donor and increasing levels of acceptor. To establish the necessity for BCL-xL to have a fully intact BH3 binding site to engage in live cell interactions, we used a BCL-xL variant (BCL-xL G138E R139L I140N) carrying three mutations in the BH1 domain that is critical for BH3 binding (Kim et al., 2006).

We first focussed on interactions engaged with PUMA. As shown in Figure 2A, saturable and strong BRET signals were observed in HCT116 p21^{-/-} pLVX cells between RLuc fused to the N-terminal end of PUMA and YFP fused to the N-terminal end of BCL-xL. Interactions between corresponding proteins were confirmed in co-immunoprecipitation assays (Figure 2B). BRET signals were much weaker between PUMA and BCL-xL G138E R139L I140N (Figure 2A). Strikingly, we observed no inhibitory

effect of up to 10 μ M of WEHI-539 on PUMA/BCL-xL interactions in whole cells (Figure 2C). Likewise, ABT-737 treatment had no detectable effect (Data not shown). Similar observations were made using MCF-7 cells (Figure S2A and Figure 3B below). To further confirm the resistance of PUMA/BCL-xL interactions in a cellular context that lacks any other member of the BCL-2 family, we used yeast ectopically expressing these proteins fused to RLuc and YFP. PUMA/BCL-xL BRET signals measured in yeast were also refractory to BH3 mimetic treatment (Figure S2B).

We reasoned that since BH3 mimetic can trigger PUMA mediated BAX dependent cell death in some instances, some vulnerable complexes had to exist in the PUMA/BAX/BCL-xL network. We thus measured the effects of BH3 mimetics on BAX/BCL-xL interactions. As shown in Figure 2D, and consistent with preceding results (Bah et al., 2014), saturable BRET signals were observed in HCT116 p21^{-/-} pLVX cells between RLuc fused to the N-terminal end of BAX and increasing levels of YFP-BCL-xL. Interactions were confirmed in co-immunoprecipitation assays (Figure 2E). Saturable BRET signals were not observed between RLuc-BAX and YFP-fused BCL-xL G138E R139L I140N (Figure 2D). In contrast to what we observed with PUMA, BRET signals were inhibited by WEHI-539 in a dose dependent manner with concentrations as low as 10 nM having an effect, and an apparent median effective concentration in the 25 nM order (Figure 2F). Experiments using ABT-737 and equivalent amounts of YFP-BCL-xL gave qualitatively comparable results. They were consistent with the notion that this compound is less efficient at targeting BCL-xL than WEHI-539 (Figure S2C) (Lessene et al., 2013). ABT-199 had no detectable effect on BAX/BCL-xL BRET signals (data not shown). Similar results were obtained using MCF-7 cells instead of HCT116 cells (See below). BAX/BCL-xL interactions in yeast cells were also sensitive to BH3 mimetic treatment (Figure S2B).

Fusion of YFP, whose size is comparable to that of RLuc, to the N-terminal end of BAX generates a protein that partitions between the cytosol and the mitochondria (data not shown). We thus assume that this is also the case for RLuc-BAX. To investigate whether membrane insertion of BAX (a key step during the course of its activation) affects the nature of its interactions with BCL-xL, we used BAX S184V, a mutant that is constitutively bound to and inserted into mitochondrial membranes (Nechushtan et al., 1999, Schellenberg et al., 2013). Saturable BRET signals were still observed between BAX S184V and BCL-xL (Figure 2G). The corresponding BRET signals remained however sensitive to derepression, even if higher concentrations of compounds were required to inhibit them (Figure 2H). These data indicate that membrane-inserted BAX interact with full length BCL-xL but that sequestration can be derepressed.

Membrane-bound BCL-xL resists inhibition

When studied in solution, the interaction between PUMA and BCL-xL appears to be sensitive to BH3 mimetics (Gautier et al., 2011 and references therein). We thus reasoned that the resistance of cellular interactions revealed in the above assays might ensue from the fact that full length BCL-xL is localized at intracellular membranes. To test this hypothesis, we reiterated BRET assays using YFP-fused BCL-xL deleted in its C-terminal end. The resulting protein, in contrast to full length BCL-xL, had a cytosolic localization (BCL-xL Δ C) (Figure S3A). Saturable BRET signals were observed only between RLuc-PUMA and YFP-BCL-xL Δ C, and not between RLuc-PUMA and YFP-fused BCL-xL G138E R139L I140N Δ C (Figure 3A). Most strikingly, when we evaluated the effect of a range of WEHI-539 concentrations on PUMA/BCL-xL- Δ C BRET signals, we found that these interactions were significantly sensitive to WEHI-539 treatment, with concentrations as low as 10 nM having an effect, and an apparent median effective concentration in the 100 nM order (Figure 3B). Notably, as shown in Figure 3B and Figure S3A, WEHI-539 also affected interactions between PUMA and a cytosolic variant of BCL-xL only carrying a point mutation (A221R) in the C-terminal end ((Garenne et al., in press)). This argues that the enhanced sensitivity of BCL-xL- Δ C interactions results from a lack of membrane integration, and not from a membrane independent role the C-terminal end would play in the regulation of BH3 binding. HCT116 p21^{-/-} cells overexpressing cytosolic BCL-xL Δ C and A221R did not resist to treatment with 1 μ M of WEHI-539, establishing that membrane localization of BCL-xL significantly contributes to its resistance to derepression (Figure 3C, S3B).

Steady state levels of BCL-xL at subcellular membranes result from a dynamic equilibrium between membrane targeting and retro-translocation rates. Retro-translocation is an ill-characterized process whereby membrane bound BCL-xL is shuttled back to the cytosol (Edlich et al. 2011). BRET signals between RLuc-PUMA and YFP- fused to variant of BCL-xL (BCL-xL \square 2) that exhibited partial mitochondrial localization and increased retrotranslocation rates (Figure S3A and Todt et al., 2011) were nearly as sensitive to WEHI-539 treatment than these observed using cytosolic variants of BCL-xL (Figure 3B). Moreover, HCT116 p21^{-/-} cells overexpressing cytosolic BCL-xL \square 2 did not resist to treatment with 1 μ M of WEHI-539. Thus, membrane localization dynamics influence the tightness of BCL-xL BH3-binding.

Of note, the fact that PUMA/BCL-xL interactions may only be sensitive to derepression when interactions with membranes are weakened implies that cell solubilization used in classical co-immunoprecipitation assays can artificially impair these

interactions, leading to an overestimation of the effects of derepression. In agreement with this, and consistent with preceding data (Gautier et al., 2011), an effect of BH3 mimetic treatment on PUMA/BCL-xL interactions was detected upon co-immunoprecipitation from HCT116 p21^{-/-} cells lysates but not when more abundant complexes were investigated using HCT116 p21^{-/-} pLVX(BCL-xL) cell lysates (Figure S3C).

We eventually investigated whether membrane localization impacts on the intracellular interactions BCL-xL engages with other pro-apoptotic proteins of the BCL-2 family (namely BAX, BAK, BIM_L, BAD and tBID). We compared sensitivities to BH3 mimetics of corresponding validated BRET signals obtained with full length or C-terminal deleted BCL-xL (Figure 4A, Figure S4). We made two findings. Firstly, we observed that BIM_L/BCL-xL interactions are, akin to PUMA/BCL-xL ones, almost completely resistant to derepression by BH3 mimetics. In contrast, interactions with BAD, BAK and tBID showed differing sensitivities, with the latter interaction being the most sensitive one. To confirm that the prevalence of sensitive protein complexes impacts on sensitivity to death induced by BCL-xL inhibition, we used recently described « mito-primed » cells engineered to coexpress ectopic BCL-xL and either tBID or PUMA (Lopez et al., 2016) and we challenged them with WEHI-539. As shown in Figure 4B, BCL-xL addicted, tBID expressing cells were significantly more sensitive than PUMA expressing ones, despite enhanced expression of the latter pro-apoptotic protein compared to the former (see Lopez et al., 2016). Secondly, we observed that enforcing a cytosolic localization for BCL-xL sensitised to derepression interactions with BAK, BAD and BIM_L. This argues that membrane localization of BCL-xL has a general impact on its BH3 binding properties. Two notable exceptions were interactions with tBID and BAX, that were almost equally sensitive to BH3 mimetic treatment regardless of BCL-xL localization. The inherent cytosolic localization of BAX may play a role in the latter case, since interactions of membrane inserted BAX S184V with BCL-xL Δ C were more sensitive to derepression than these with full length BCL-xL (Figure 4A).

DISCUSSION

In order to understand what determines MOMP onset, there is a need to understand how BCL-2 homologs respond to perturbations of their BH3 binding activity downstream of multiple stress signals. Our study points out that some anti-apoptotic effects of BCL-xL resist direct perturbations by BH3 mimetics. BH3-binding site independent survival properties of BCL-xL have been described and might contribute to this resistance (Follis et al., 2013 and references therein). BCL-xL may also impact on the apoptotic balance by influencing the expression levels of its pro-

Annexe 2 – Tight sequestration of BH3 proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes Contributes to Apoptotic Resistance

apoptotic binding partners (Bertin-Ciftci et al., 2013). Consistent with this notion, we found a slight but significant decrease in BAX expression upon BCL-xL overexpression. This is however reverted by BH3 mimetic treatment, and it is therefore unlikely to fully account for resistance (Data not shown). We herein establish one more level of resistance by showing, using whole cell assays that take into account membrane contribution, that intracellular interactions between BCL-xL and a subset of pro-apoptotic counterparts are more robust than preceding assays using soluble forms of BCL-xL lead us to expect.

Since PUMA and BIM_L can function as pro-apoptotic activators upstream of multi-domain proteins, their maintained sequestration by full length BCL-xL during BH3 mimetics treatment is expected to contribute to resistance. Our observations have therapeutic implications due to the role played by PUMA in the apoptotic response to genotoxic treatments, and the contribution of BCL-xL to chemoresistance. They indicate that the anti-apoptotic activity exerted by overexpressed BCL-xL in chemotherapy challenged cancer cells is not as pharmacologically tractable as anticipated from the cell-free performances of currently available BH3 mimetics. In fact, these efficiently target BCL-xL only in some contexts (including in platelets, owing to their dose-limiting thrombopenic effects, Mason et al., 2007, Lessene et al., 2013) and not in others, especially when BCL-xL expression is high in cells in receipt of a genotoxic treatment (van Delft et al., 2006, Rooswinkel et al., 2012, Mérimo et al., 2012, Vogler et al., 2009, Colak et al., 2014, and this study). We propose that this inefficiency ensues, at least in part, from the fact that intracellular BCL-xL sequesters PUMA in a BH3-mimetic resistant manner.

The binding of BCL-xL to subcellular membranes appears critical for its sequestration of PUMA and BIM_L as corresponding interactions are profoundly affected by alterations in the C-terminal end of BCL-xL that render this protein cytosolic, and concomitantly relieve resistance to cell death induction by BH3 mimetics. It is sufficient to increase the retro-translocation rates of BCL-xL to decrease its anti-apoptotic BH3-binding, underscoring that the BCL-xL network has to be considered as a dynamically evolving one, in which synthesis and shuttling kinetics need to be taken into account. Our observations evoke the suggested enhanced sensitivity of cytosolic (compared to mitochondrial) pools of BIM_L/BCL-xL complexes to BH3 mimetics (Aranovich et al., 2012; Liu et al Cell Cycle, 2012). Preceding studies had proposed that membrane-bound BCL-xL would display a loosened groove structure in a hydrophobic environment, and a lower affinity for BH3 domains (Bhat V et al., 2012). Our data are more in agreement with a recent study which established that membrane-anchored BCL-xL binds better to BH3 domains than its isolated water-soluble moiety (Yao et al. 2015),

possibly because the membrane environment of BCL-xL limits the k off rate of its interactions. Cooperative interactions of BCL-xL and apoptotic ligands with the lipid bilayer membrane, and cellular events that regulate BCL-xL integration in membranes may thus contribute to enforce BH3 binding (and to BH3 mimetic resistance). Membrane localization of full length BCL-xL in a whole cell context may also permit post-translational modifications that contribute to this enhancement, and that cell free assays and recombinant proteins overlook. Importantly, membranes also appear to tighten the control BCL-2 exerts over cell death, since whole cell interactions with PUMA, BIM_L and BAD were sensitized to ABT-199 by deletion of BCL-2 C-terminal end (Figure 5, Figure S5).

The BCL-xL network of interactions has vulnerabilities, since BH3 mimetics selectively targeting BCL-xL trigger cell death in some instances. Interactions of intracellular full length BCL-xL with tBID (consistent with Aranovich et al., 2012), or BAX (this study) are indeed particularly sensitive to derepression. These interactions are not further sensitized to BH3 mimetic treatment when BCL-xL is cytosolic. This suggests that their weakness might be due to a lack of membrane contribution to complex formation. Somehow consistent with this, BCL-xL interactions with membrane embedded BAX S184V showed a resistance to derepression that was relieved by deletion of BCL-xL C terminal end. Intracellular BAX S184V/BCL-xL interactions remained however more sensitive than most other interactions. Thus the controls BCL-xL exerts over retrotranslocation competent BAX (Edlich et al., 2011) and over membrane embedded BAX (Subburaj et al., 2015) can both be derepressed.

Our data are mostly consistent with the dual engagement model proposed by Llambi et al (Llambi et al., 2011), wherein anti-apoptotic proteins interact with distinct pro-apoptotic proteins by modes that differ in their anti-apoptotic efficiency and sensitivity to derepression. Inhibition of BH3 binding leads to cell death only when the balance between pro-apoptotic members and BCL-xL favors « fragile » complexes instead of « refractory » ones. These authors suggested that interactions with multi-domain proteins (MODE 2) are less easily derepressed than interactions with BH3 activators (MODE 1) using tBID as a BH3 activator. As interactions with PUMA or BIM_L are significantly more robust than these with tBID and with BAX or BAK, the sensitivity of MODE 1 may in fact strongly depend on the main activator BH3-only protein involved. In the specific case of PUMA driven BAX activation, interactions engaged by BCL-xL are not equally well inhibited and PUMA is less efficiently released from BCL-xL than BAX. As a result, enhanced BCL-xL, most likely by competing with BAX for binding to PUMA in a BH3 mimetic resistant manner, prevents these compounds from fully exploiting PUMA's ability to induce BAX oligomerization and activation. This appears

to be so critical that cell to cell variations in BCL-xL expression levels critically determine the fate of cells upon derepression.

Understanding the molecular basis of fractional resistance to derepression, and how sustainable this is, is all the more relevant as non-lethal perturbation of the BCL-2 network may lead to genomic instability (Ichim et al., 2015). Our work shows that experimental systems that take into account membrane contribution in a whole cell configuration are required to fully appreciate how stimulation of the dynamic BCL-2 network of functionally distinct interacting partners leads to cell death. The BRET approach we describe is particularly apposite to do so and to define a model that incorporates the differences in binding affinities into the consequences for the cell response.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and cell culture materials, including mito-primed SVEC cells coexpressing BCL-xL and either tBID or PUMA using a 2A self-cleaving peptide sequence and BH3 profiling assays are described in Supplementary Data.

Flow cytometry intracellular staining

Cells were fixed in 1% paraformaldehyde (in PBS) for 10 min at RT and permeabilized in cold methanol for 30 min at 4°C. Next, cells were incubated with antibodies for 1 h at 4°C in the dark : Rabbit IgG isotype control Alexa-488 (#4340S), BCL-xL-Alexa-488 (#2767S), Mouse IgG isotype control Alexa 647 (sc-24636), IgG Bax-647 (sc-20067), Rabbit IgG isotype control Alexa-647 (USBio I1903-93), Caspase 3 Alexa-647 (Cell Signaling 9602), Mouse IgG isotype control Alexa 488 (BioLegend 400129), IgG Bax Alexa 488 (NBP233092), Mouse IgG isotype control Alexa 647 (NBP2-24979), IgG Mouse Bax6A7 Alexa 647 (NBP1-28566) were used. Cells were washed twice in PBS containing 0,5% BSA. Flow cytometry analysis was performed just following staining.

BRET assays

RLuc expression plasmids were constructed by subcloning coding sequences into the pRLuc-C2 vector (BioSignal Packard). eYFP expression plasmids were constructed by subcloning coding sequences into the pEYFP-C1 vector (BD Biosciences). All constructs were sequenced before use. BRET saturation curve assays and concentration/response curve assays are described in Supplementary Material.

Immunoprecipitation assays

Cells treated in 10 cm petri dishes were collected and washed with PBS. Cell lysis was performed using PBS-1%CHAPS buffer (plus a cocktail of protease and phosphatase inhibitors) and

cellular suspensions were sonicated for 15 min thrice. Immunoprecipitations were performed as described in the PureProteome™ Protein G Magnetic Beads protocol (Millipore). Briefly, 10 µl of anti-BCL-xL, 5 µl of anti-BAX antibody (Dako), 10 µl of anti-BAX 6A7 antibody (Abcam), 2 µl of anti-GFP antibody (Abcam) or 5 µl of anti-Flag (Sigma) antibody were used for 500 µg of cell extract.

Data analysis

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

Contributions

J.P., L.M., J.LP., C.V., S. C. T., A.F., K.S., F.J.B., F.B., F.G. and P.J. conducted experiments. L.M., K.S., A.L., S.W.G.T., F.G. and P.J. designed the experiments. J.P., L.M., K.S., A.L., S.W.G.T., F.G. and P.J. analyzed the data. L.M., F.G. and P.J. wrote the paper. F.G. and P.J. conceived the study. P.J. supervised it and obtained funding.

Acknowledgements

We thank members of the “Cell Survival and Tumor Escape in Breast Cancer” laboratory for their technical advice, fruitful comments and enthusiasm. We thank C. Couriaud for her technical help in the preparation of lentivirus particles, and Dr F. Edlich for the generous gift of BCL-xL D2 allele. We are grateful for technical support from the Cellular and Tissular Imaging (MicroPICell) and from the Molecular Interactions and Protein Activities (IMPACT) Core Facilities of Nantes University. J. Pécot and C. Vuillier are supported by grants from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, and J. Le Pen by a grant from INSERM Region. This work was supported by Région Pays de la Loire (CIMATH2), Ligue contre le Cancer (R13137), ARC (R15083NN), and INCA PLBio 2013 (R12134NN).

BIBLIOGRAPHY

- Amundson, S.A., Myers, T.G., Scudiero, D., Kitada, S., Reed, J.C., and Fornace, A.J. (2000). An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 60, 6101–6110.
- Aranovich, A., Liu, Q., Collins, T., Geng, F., Dixit, S., Leber, B., and Andrews, D.W. (2012). Differences in the mechanisms of proapoptotic BH3 proteins binding to Bcl-XL and Bcl-2 quantified in live MCF-7 cells. *Mol. Cell* 45, 754–763.
- Bah, N., Maillet, L., Ryan, J., Dubreil, S., Gautier, F., Letai, A., Juin, P., and Barillé-Nion, S. (2014). Bcl-xL controls a switch between cell death modes during mitotic arrest. *Cell Death Dis.* 5, e1291.

Annexe 2 – Tight sequestration of BH3 proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes Contributes to Apoptotic Resistance

- Bertin-Ciftci J, Barré B, Le Pen J, Maillet L, Couriaud C, Juin P, Braun F. (2013) Cell Death Differ. 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* May;20(5):755-64.
- Bhat V, McDonald CB, Mikles DC, Deegan BJ, Seldeen KL, Bates ML, et al. (2012) Ligand binding and membrane insertion compete with oligomerization of the BclXL apoptotic repressor. *J Mol Biol* 2012;416:57–77
- Billen, L.P., Kokoski, C.L., Lovell, J.F., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol.* 6, e147.
- Cartron, P.-F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M., and Juin, P. (2004). The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol. Cell* 16, 807–818.
- Chen, H.C., Kanai, M., Inoue-Yamauchi, A., Tu, H.C., Huang, Y., Ren, D., Kim, H., Takeda, S., Reyna, D.E., Chan, P.M., Ganesan, Y.T., Liao, C.P., Gavathiotis, E., Hsieh, J.J., Cheng, E.H. (2015) An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family. *Nat Cell Biol.* 17, 1270-81.
- Colak, S., Zimmerlin, C.D., Fessler, E., Hogdal, L., Prasetyanti, P.R., Grandela, C.M., Letai, A., and Medema, J.P. (2014). Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. *Cell Death Differ.* 21, 1170–1177.
- Czabotar, P.E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Yao, S., Robin, A.Y., Smith, B.J., et al. (2013). Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* 152, 519–531.
- van Delft, M.F., Wei, A.H., Mason, K.D., Vandenberg, C.J., Chen, L., Czabotar, P.E., Willis, S.N., Scott, C.L., Day, C.L., Cory, S., et al. (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 10, 389–399.
- Dewson, G., Kratina, T., Czabotar, P., Day, C.L., Adams, J.M., and Kluck, R.M. (2009). Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their alpha6 helices. *Mol. Cell* 36, 696–703.
- Dewson, G., Ma, S., Frederick, P., Hockings, C., Tan, I., Kratina, T., and Kluck, R.M. (2012). Bax dimerizes via a symmetric BH3:groove interface during apoptosis. *Cell Death Differ.* 19, 661–670.
- Ding, J., Mooers, B.H.M., Zhang, Z., Kale, J., Falcone, D., McNichol, J., Huang, B., Zhang, X.C., Xing, C., Andrews, D.W., et al. (2014). After embedding in membranes antiapoptotic Bcl-XL protein binds both Bcl-2 homology region 3 and helix 1 of proapoptotic Bax protein to inhibit apoptotic mitochondrial permeabilization. *J. Biol. Chem.* 289, 11873–11896.
- Du, H., Wolf, J., Schafer, B., Moldoveanu, T., Chipuk, J.E., and Kuwana, T. (2011). BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *J. Biol. Chem.* 286, 491–501.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145, 104–116.
- Edwards, A.L., Gavathiotis, E., LaBelle, J.L., Braun, C.R., Opoku-Nsiah, K.A., Bird, G.H., and Walensky, L.D. (2013). Multimodal interaction with BCL-2 family proteins underlies the proapoptotic activity of PUMA BH3. *Chem. Biol.* 20, 888–902.
- Follis, A.V., Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Yun, M.-K., Grace, C.R., Nourse, A., Baran, K., Ou, L., Min, L., White, S.W., et al. (2013). PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis. *Nat. Chem. Biol.* 9, 163–168.
- Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., Noël, B., Hickman, J.A., Geneste, O., Cartron, P.-F., Vallette, F.M., Manon, S., et al. (2009). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J. Cell Biol.* 185, 279–290.
- Gautier, F., Guillemin, Y., Cartron, P.F., Gallenne, T., Cauquil, N., Le Diguarher, T., Casara, P., Vallette, F.M., Manon, S., Hickman, J.A., et al. (2011). Bax activation by engagement with, then release from, the BH3 binding site of Bcl-xL. *Mol. Cell Biol.* 31, 832–844.
- Garenne, D., Renault, T. and Manon S. (in press, 2016) Bax mitochondrial relocation is linked to its phosphorylation and its interaction with Bcl-xL. *Microbial Cell*
- Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M.L., Pitter, K., Bird, G.H., Katz, S.G., Tu, H.-C., Kim, H., Cheng, E.H.-Y., Tjandra, N., et al. (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 455, 1076–1081.
- Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, Hickman JA. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. (1999) *J Cell Biol.* Mar 8;144(5):903-14.
- Hockings, C., Anwari, K., Ninnis, R.L., Brouwer, J., O’Hely, M., Evangelista, M., Hinds, M.G., Czabotar, P.E., Lee, E.F., Fairlie, W.D., et al. (2015). Bid chimeras indicate that most BH3-only proteins can directly activate Bak and Bax, and show no preference for Bak versus Bax. *Cell Death Dis.* 6, e1735.
- Hsu, Y.-T., and Youle, R.J. (1997). Nonionic Detergents Induce Dimerization among Members of the Bcl-2 Family. *J. Biol. Chem.* 272, 13829–13834.
- Ichim, G., Lopez, J., Ahmed, S.U., Muthalagu, N., Giampazolias, E., Delgado, M.E., Haller, M., Riley, J.S., Mason, S.M., Athineos, D., et al. (2015). Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Mol. Cell* 57, 860–872.
- Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K.H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J.N., et al. (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 4, 321–328.
- Juin P, Geneste O, Gautier F, Depil S, Campone M. (2013) Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat Rev Cancer.* Jul;13(7):455-65.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.-C., Jeffers, J. R., Zambetti, G.P., Hsieh, J. J.-D. and Cheng E. H.-Y. (2006) Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies *Nature Cell Biology* 8, 1348 - 1358.
- Leber, B., Lin, J., and Andrews, D.W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene* 29, 5221–5230.
- Le Pen J, Maillet, L., Sarosiek K, Vuillier C, Gautier F, Montessuit S, Martinou JC, Letai A, Braun F, Juin PP. Constitutive p53 heightens mitochondrial apoptotic priming and favors cell death induction by BH3 mimetic inhibitors of BCL-xL. *Cell Death Dis.* 2016 Feb 4;7:e2083.
- Lessene, G., Czabotar, P.E., Sleebs, B.E., Zobel, K., Lowes, K.N., Adams, J.M., Baell, J.B., Colman, P.M., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., et al. (2013). Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* 9, 390–397.
- Liu Q, Leber B, Andrews DW. (2012) Interactions of pro-apoptotic BH3 proteins with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins measured in live MCF-7 cells using FLIM FRET. *Cell Cycle.* Oct 1;11(19):3536-42.
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A Unified Model of Mammalian BCL-2 Protein Family Interactions at the Mitochondria. *Mol. Cell* 44, 517–531.
- XII. Lopez J, Bessou M, Riley JS, Giampazolias E, Todt F, Rochegüe T, Oberst A, Green DR, Edlich F, Ichim G, Tait SW. (2016) Mito-priming as a method to engineer Bcl-2 addiction. *Nat Commun.* Feb 2;7:10538
- Mason, K.D., Carpinelli, M.R., Fletcher, J.L., Collinge, J.E., Hilton, A.A., Ellis, S., Kelly, P.N., Ekert, P.G., Metcalf, D., Roberts, A.W., et al. (2007). Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 128, 1173–1186.

Annexe 2 – Tight sequestration of BH3 proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes Contributes to Apoptotic Resistance

- Mérino, D., Khaw, S.L., Glaser, S.P., Anderson, D.J., Belmont, L.D., Wong, C., Yue, P., Robati, M., Phipson, B., Fairlie, W.D., et al. (2012). Bcl-2, Bcl-x(L), and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells. *Blood* 119, 5807–5816.
- Moldoveanu, T., Follis, A.V., Kriwacki, R.W., and Green, D.R. (2014). Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem. Sci.* 39, 101–111.
- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* 7, 683–694.
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Hsu, Y.-T., and Youle, R.J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J.* 18, 2330–2341.
- Pflegler KD, Eidne KA. (2006) Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods.* Mar;3(3):165-74.
- Ren, D., Tu, H.-C., Kim, H., Wang, G.X., Bean, G.R., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., and Cheng, E.H.-Y. (2010). BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science* 330, 1390–1393.
- Rooswinkel, R.W., van de Kooij, B., Verheij, M., and Borst, J. (2012). Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B. *Cell Death Dis.* 3, e366.
- Schellenberg B, Wang P, Keeble JA, Rodriguez-Enriquez R, Walker S, Owens TW, Foster F, Tanianis-Hughes J, Brennan K, Streuli CH, Gilmore AP. (2013) Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Mol Cell.* Mar 7;49(5):959-71.
- Subburaj, Y., Cosentino, K., Axmann, M., Pedrueza-Villalmanzo, E., Hermann, E., Bleicken, S., Spatz, J., and García-Sáez, A.J. (2015). Bax monomers form dimer units in the membrane that further self-assemble into multiple oligomeric species. *Nat. Commun.* 6.
- Todt F, Cakir Z, Reichenbach F, Youle RJ, Edlich F. (2013) The C-terminal helix of Bcl-x(L) mediates Bax retrotranslocation from the mitochondria. *Cell Death Differ.* Feb;20(2):333-42.
- Vogler, M., Butterworth, M., Majid, A., Walewska, R.J., Sun, X.-M., Dyer, M.J.S., and Cohen, G.M. (2009). Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 113, 4403–4413.
- Wei G, Margolin AA, Haery L, Brown E, Cucolo L, Julian B, Shehata S, Kung AL, Beroukhim R, Golub TR. Chemical genomics identifies small-molecule MCL1 repressors and BCL-xL as a predictor of MCL1 dependency. *Cancer Cell.* 2012 Apr 17;21(4):547-62.
- Wilfling, F., Weber, A., Potthoff, S., Vögtle, F.-N., Meisinger, C., Paschen, S.A., and Häcker, G. (2012). BH3-only proteins are tail-anchored in the outer mitochondrial membrane and can initiate the activation of Bax. *Cell Death Differ.* 19, 1328–1336.
- Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, LaCasce AS, Gerecitano JF, Leonard JP, Tulpule A, Dunleavy K, Xiong H, et al.. (2010). Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol.* Dec;11(12):1149-59.
- Yao Y, Fujimoto LM, Hirshman N, Bobkov AA, Antignani A, Youle RJ, Marassi FM. (2015) Conformation of BCL-XL upon Membrane Integration. *J Mol Biol.* Jul 3;427(13):2262-70.
- Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Zhang, L. (2003). PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1931–1936.

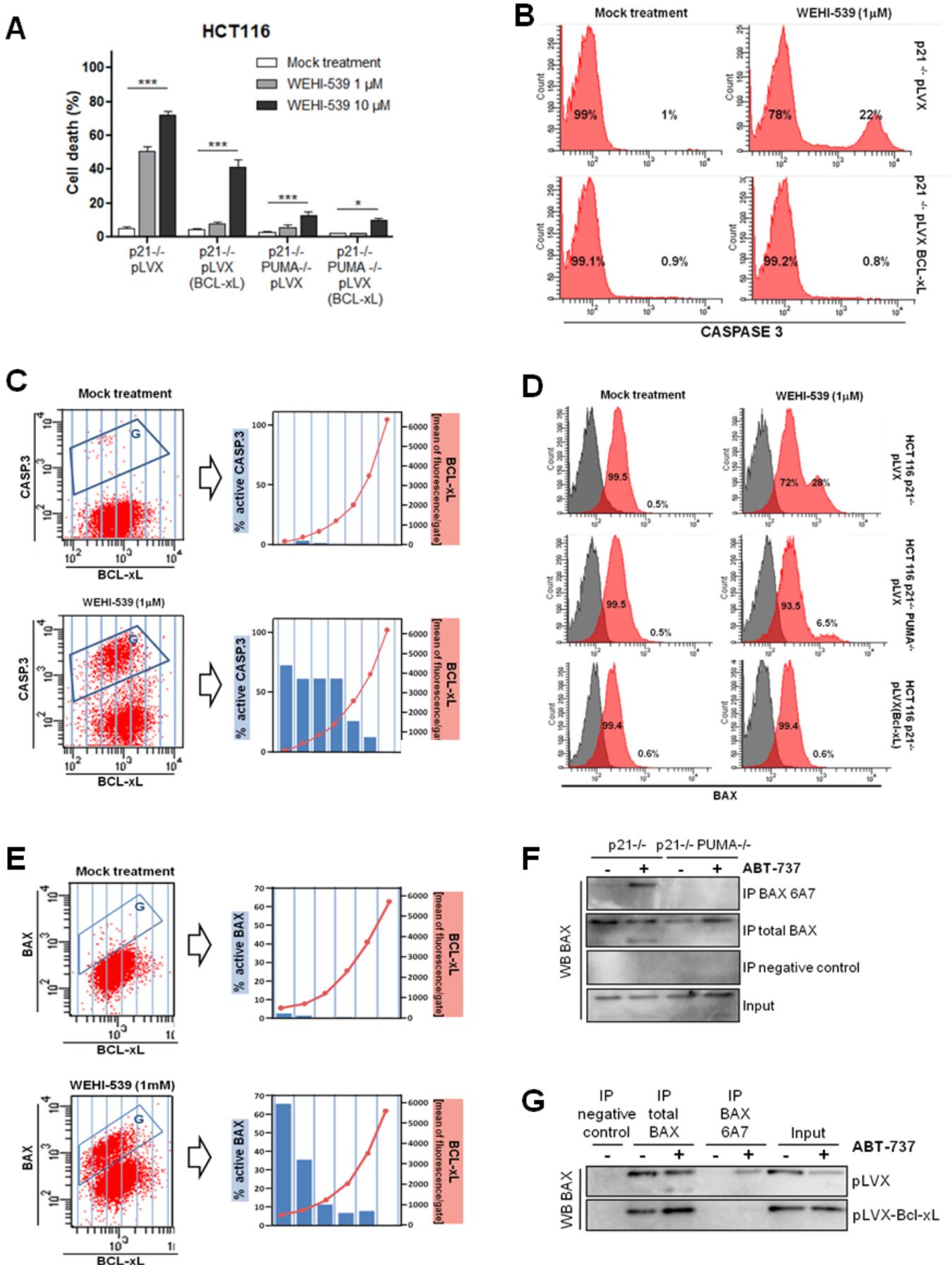


Figure 1.

Annexe 2 – Tight sequestration of BH3 proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes
Contributes to Apoptotic Resistance

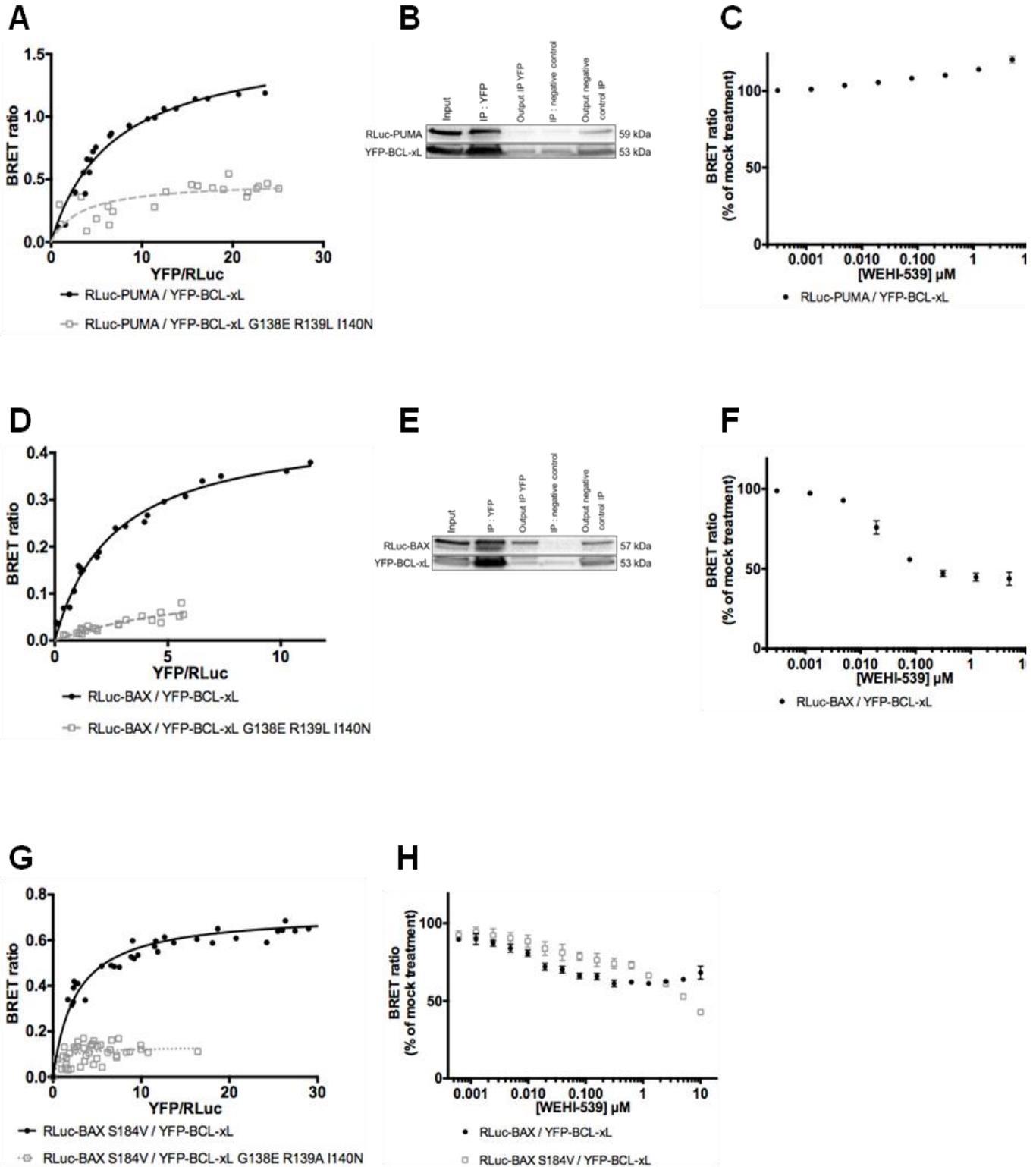


Figure 2

Annexe 2 – Tight sequestration of BH3 proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes
Contributes to Apoptotic Resistance

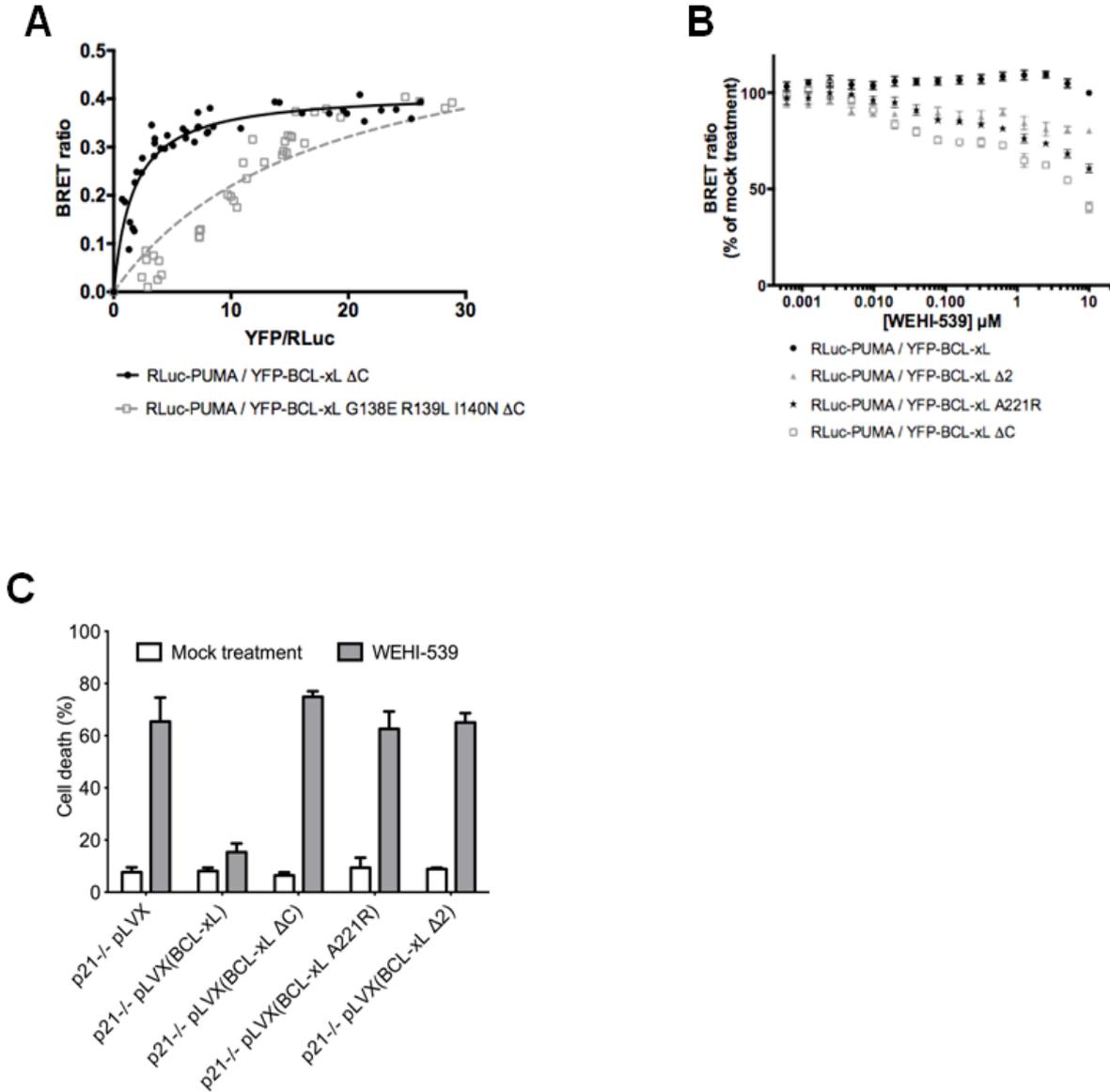


Figure 3.

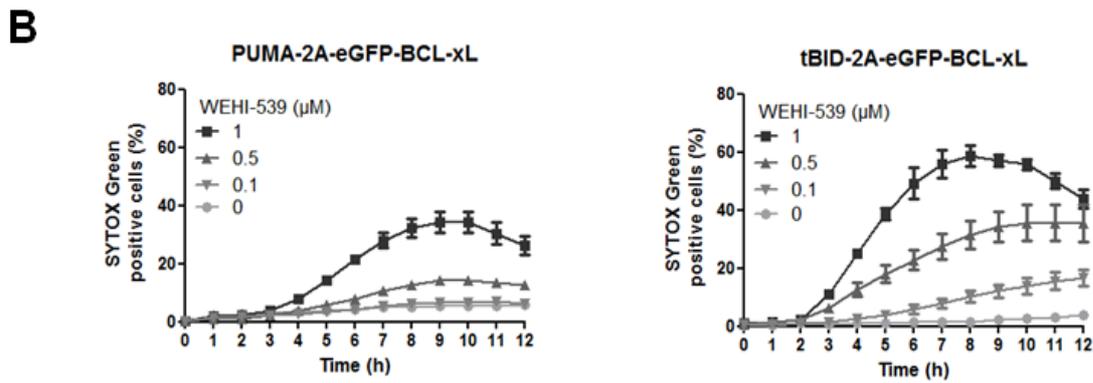
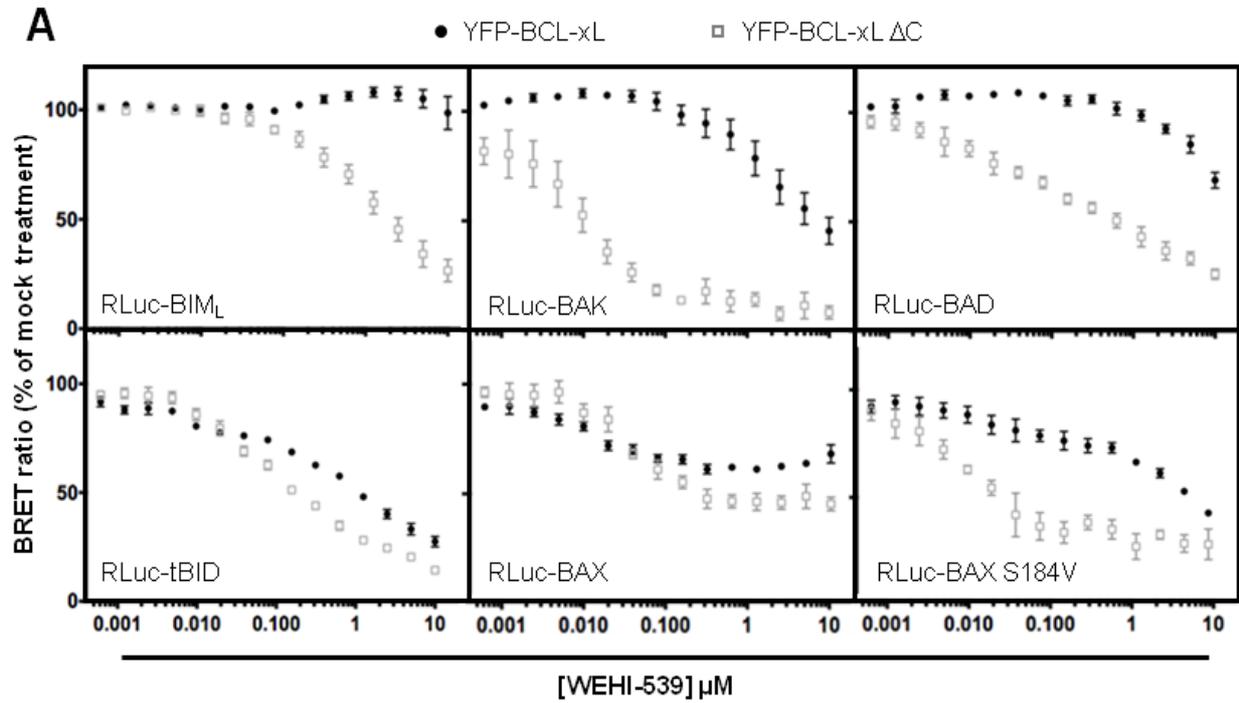


Figure 4.

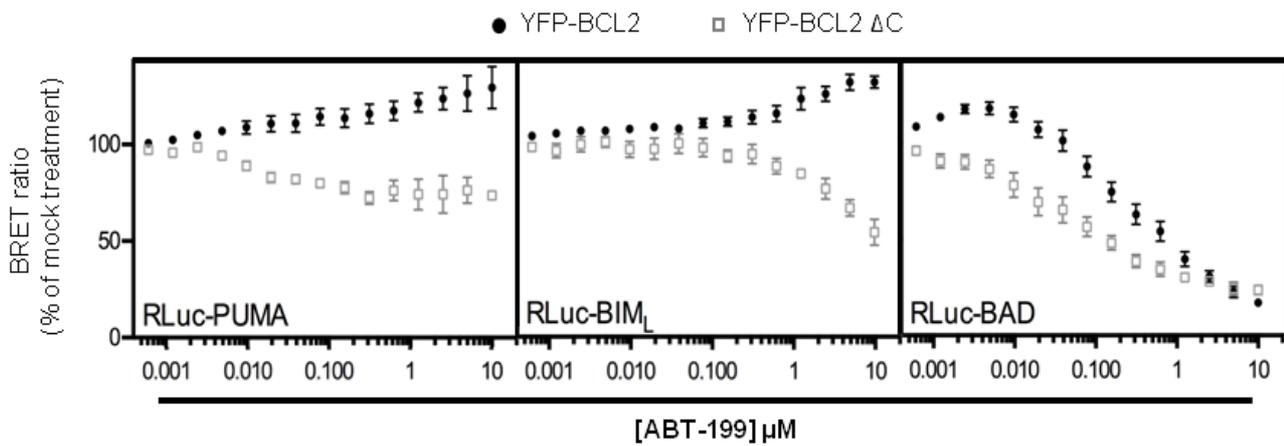


Figure 5.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *BCL-xL levels critically determine induction of PUMA dependent cell death by BH3 mimetics*

(A) The indicated HCT116 cell lines were treated with WEHI-539 (48 h) and cell death was assessed using trypan blue exclusion assays. (B) Flow cytometry analysis of the indicated HCT116 cell lines treated with WEHI-539 (1 μ M, 24 h) and stained using anti active CASPASE-3-Alexa-647 antibodies. (C) Relationship between BCL-xL expression and active CASPASE 3 was determined by dividing dot plots resulting from intracellular immunostaining for BCL-xL and active CASPASE-3 of HCT116 p21^{-/-} pLVX cells (treated with WEHI-539 as in B) into vertical gates to grade BCL-xL expression (Red line indicates [Mean of fluorescence per gate]). % active CASPASE 3 was defined for each vertical gate by enumerating the number of cells in the gate G intersected with each of the vertical gates. Data presented are representative of three independent experiments. (D) Flow cytometry analysis of the indicated HCT116 cell lines treated with WEHI-539 (1 μ M, 24 h) and stained with anti-BAX-Alexa-647 antibodies. (E) Relationship between BCL-xL expression and subset of active BAX was determined by double intracellular staining as described in Figure 1C. (F) The indicated HCT116 cell lines were treated with ABT-737 (1 μ M, 16 h) prior to immunoprecipitation with a control, an anti-BAX or an anti-BAX 6A7 antibody and western-blot analysis. (G) HCT116 p21^{-/-} PUMA^{-/-} pLVX and HCT116 p21^{-/-} PUMA^{-/-} pLVX(BCL-xL) were treated with ABT-737 (1 μ M, 16 h) before immunoprecipitation with a control, an anti-BAX or an anti-BAX6A7 antibody and western-blot analysis.

Figure 2. *BH3-mimetics do not inhibit interactions of full length BCL-xL with PUMA*

(A) BRET saturation assay analysis was performed in HCT116 p21^{-/-} pLVX cells using increasing amount of vectors encoding for YFP-BCL-xL, or YFP-BCL-xL G138E, R139L, I140N in the presence of a fixed amount of the vector-encoding RLuc-PUMA. BRET ratios are measured for every YFP-BCL-xL plasmid concentrations and are plotted as a function of the ratio of total acceptor fluorescence to donor luminescence. The data were fitted using a nonlinear regression equation assuming a single binding site. (B) HCT116 p21^{-/-} pLVX were transfected with vectors encoding RLuc-PUMA and YFP-BCL-xL, before lysis and immunoprecipitation with a negative control or an anti-GFP antibody and western-blot analysis with RLuc and YFP antibodies. (C) WEHI-539 response of RLuc-PUMA / YFP-BCL-xL BRET signals was assessed by concentration curve

experiments in the HCT116 p21^{-/-} pLVX cell line. Data presented are means \pm S.E.M of three independent experiments. (D) BRET saturation assay analysis was performed as described in Figure 2A using YFP-BCL-xL and RLuc-BAX (E) Immunoprecipitation assays were performed as in Figure 2B. (F) Response of RLuc-BAX / YFP-BCL-xL to WEHI-539 treatment was assessed as described in Figure 2C. (G) BRET saturation assay analysis was performed in MCF-7 cells as described in Figure 2A using RLuc-BAX S184V as a donor. (H) WEHI-539 response of RLuc-BAX / YFP-BCL-xL and RLuc-BAX S184V / YFP-BCL-xL was assessed by concentration curve experiments in the MCF-7 cell line.

Figure 3. *Membrane-bound BCL-xL resists to derepression*

(A) BRET saturation curve assays using RLuc-PUMA/YFP-BCL-xL Δ C or YFP-BCL-xLG138E, R139L, I140N were performed in MCF-7 cells. The data were fitted using a nonlinear regression equation assuming a single binding site. Data presented are representative of three independent experiments. (B) Sensitivity of interactions between RLuc-PUMA and YFP-BCL-xL or YFP fused to BCL-xL variants (A221R, \square 2 and \square C) to WEHI treatments were assessed using concentration curve experiments in MCF-7 cells. Data presented as mean \pm S.E.M of three independent experiments. (C) Cell death assays were performed as indicated in Figure 1A using the indicated HCT116 p21^{-/-} cell lines treated with WEHI-539 or ABT-199 (1 μ M, 16 h).

Figure 4. *Sensitivity to derepression of BCL-xL complexes depends on membrane localization and on the identity of the pro-apoptotic binding partner.*

(A) WEHI-539 sensitivities of interactions between YFP-BCL-xL or YFP-xL \square C and RLuc fused to BIM_L, BAK, BAD, tBID, BAX and BAX S184V were assessed by concentration curve experiments in the MCF-7 cell line as described in Figure 2C. (B) The indicated BCL-xL dependent cell lines were treated with the indicated concentration of WEHI-539 and analysed over time for cell viability by SYTOX Green dye exclusion and live-cell imaging using an InCuCyte imager. Data are means \pm S.E.M of three independent experiments.

Figure 5. *Deletion of BCL-2 C-terminal end sensitizes PUMA, BIM_L and BAD interactions to ABT-199 treatment.*

Sensitivities of various BCL-2 interactions to ABT-199 were assessed by concentration curve experiments in the MCF-7 cell line between YFP-BCL-2 or BCL-2 \square C and RLuc fused to PUMA, BIM_L or BAD as described in Figure 2C.

Annexe 2 – Tight sequestration of BH3 proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes
Contributes to Apoptotic Resistance

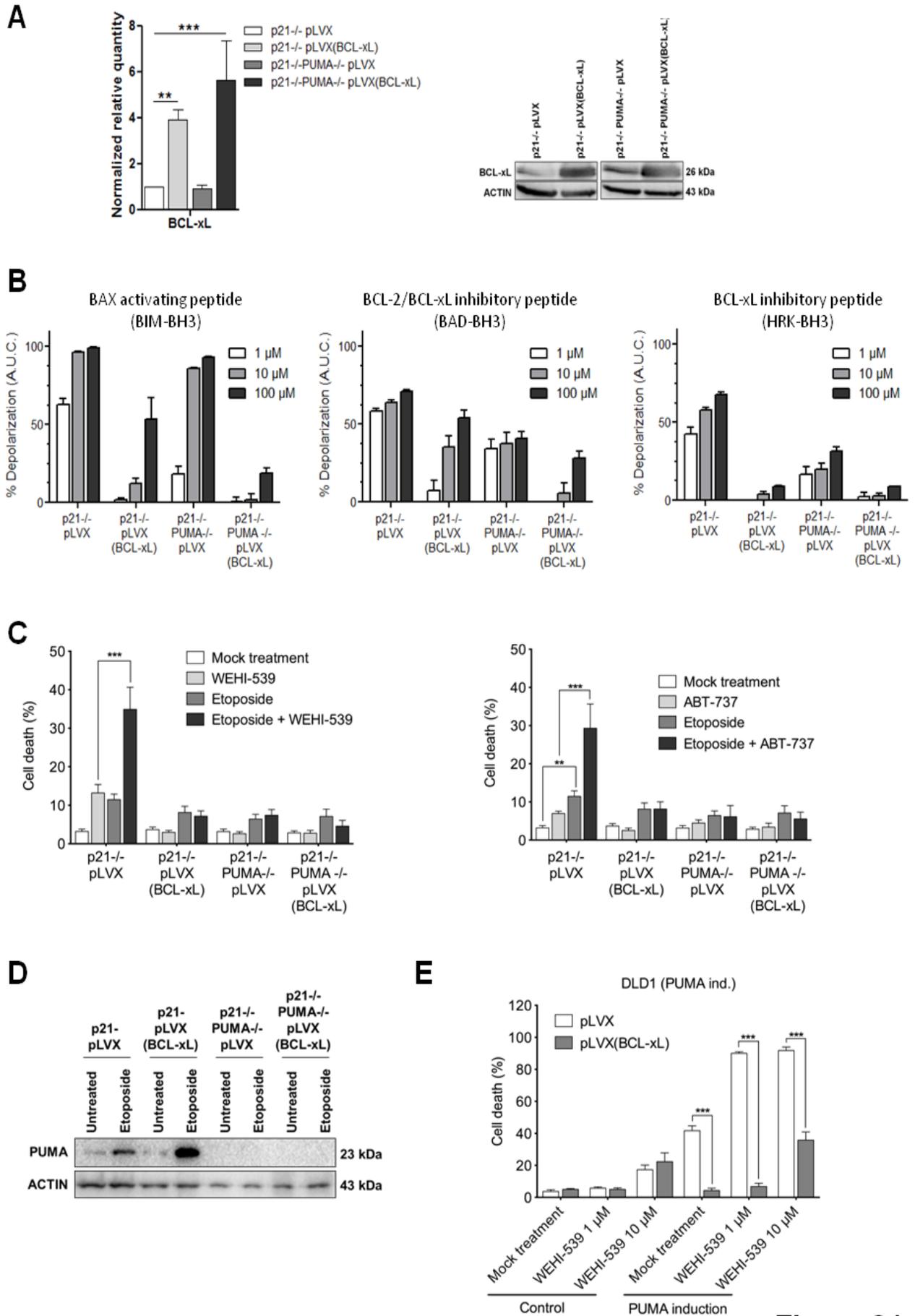


Figure S1.

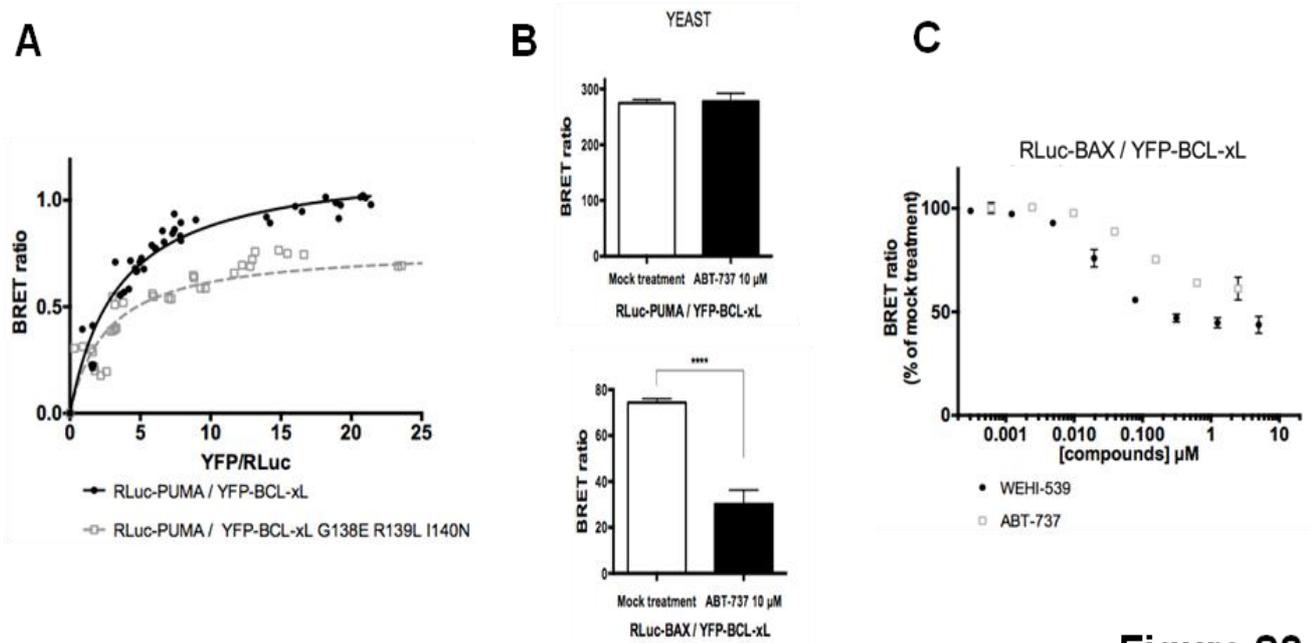


Figure S2.

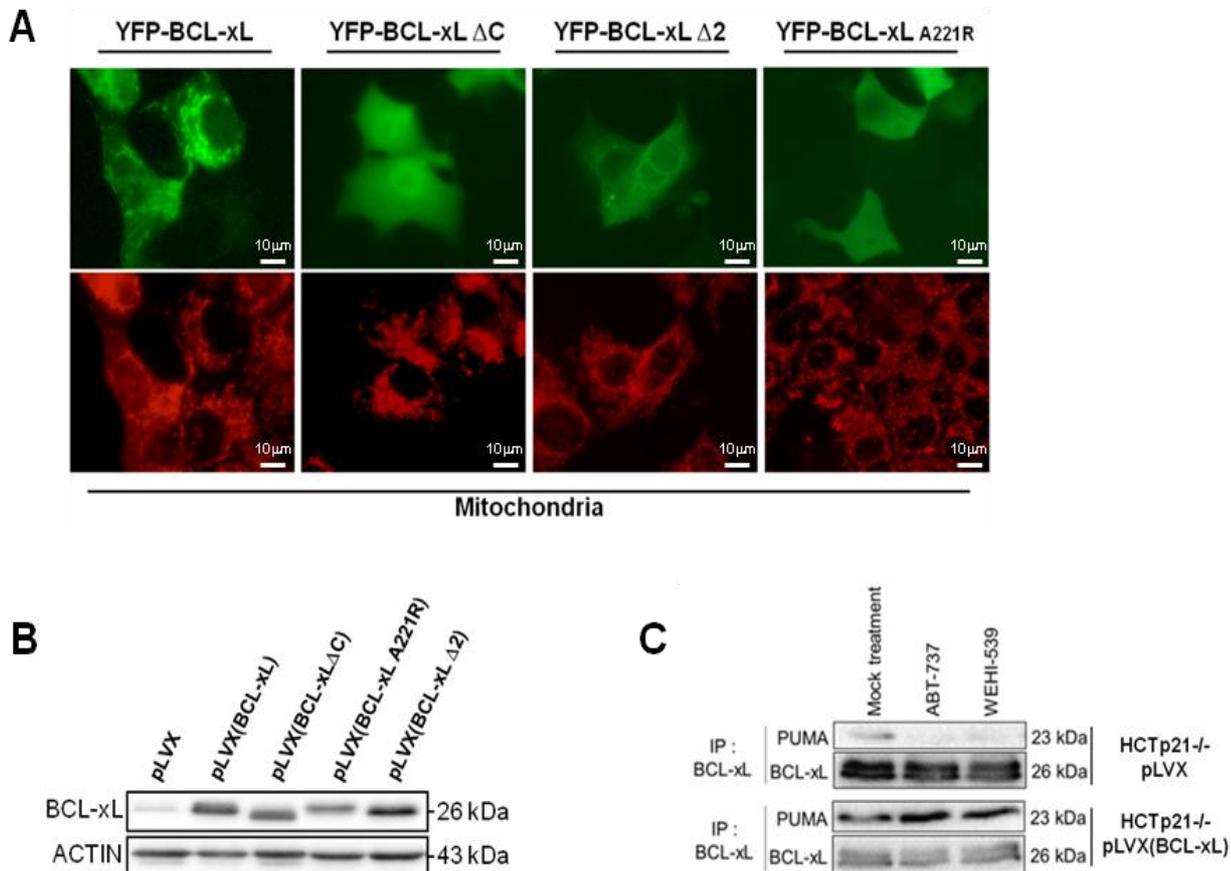


Figure S3.

Annexe 2 – Tight sequestration of BH3 proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes
Contributes to Apoptotic Resistance

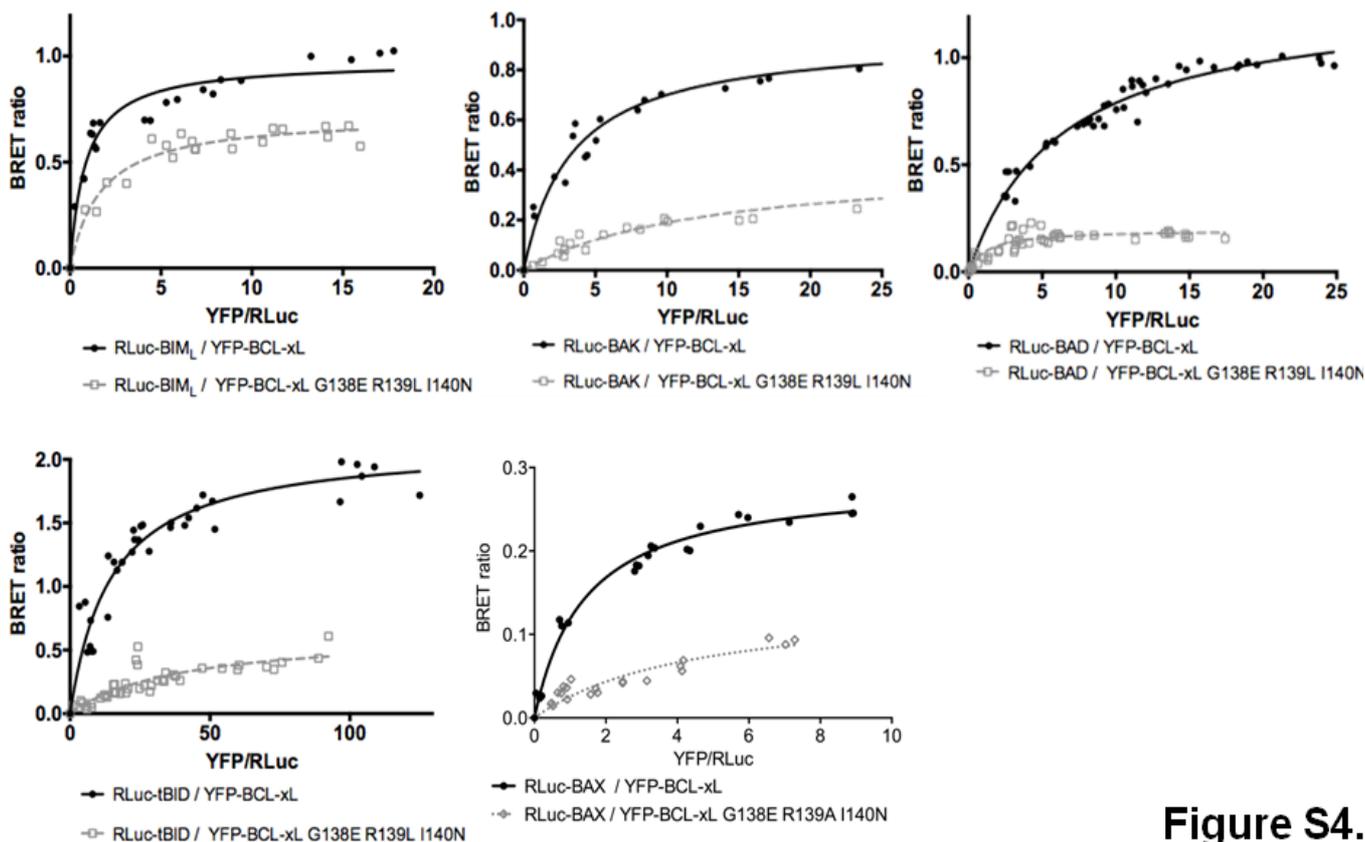


Figure S4.

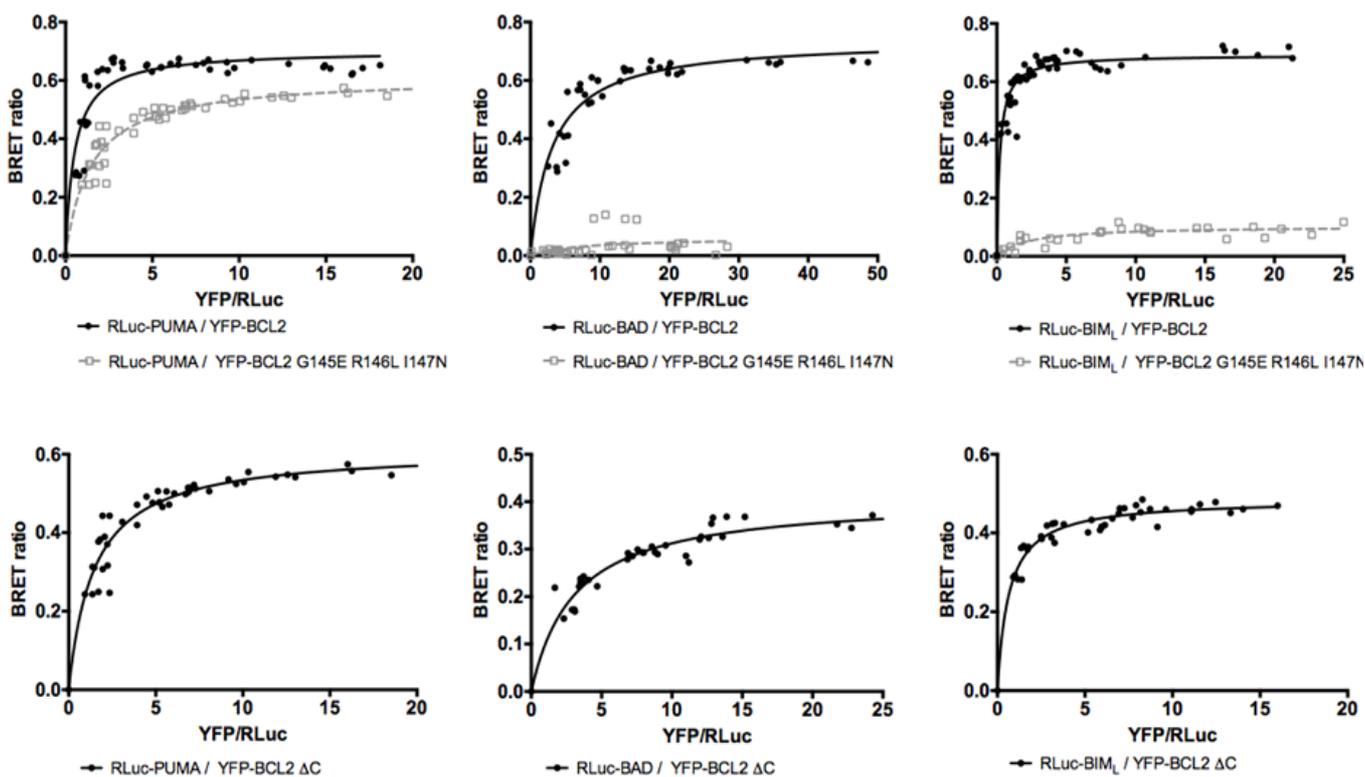


Figure S5.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1. Related to Figure 1.

BCL-xL counteracts PUMA dependent mitochondrial apoptotic priming of HCT116 p21^{-/-} cells as a BH3 binding protein.

(A) Protein quantities were normalized to quantities measured in HCT116 p21^{-/-} pLVX. All data are presented as mean ± S.E.M. of three independent experiments. Western blot data shown represent results from one of three separate experiments. (B) BH3 profiling assays were performed using the indicated HCT116 cells and BAX activating peptide (BIM-BH3), BCL-2/BCL-xL inhibitory peptide (BAD-BH3), and BCL-xL inhibitory peptide (HRK-BH3). Mitochondrial potential dependent JC-1 red fluorescence staining was used as a readout (Ryan and Letai, 2013). Percent depolarization is shown as the area under the curve (AUC) normalized to positive control fully depolarized mitochondria (treated with FCCP). All data are representative of three independent experiments. Control, BCL-xL low expresser cells responded, and BCL-xL high expresser cells resisted, to all three BIM, BAD and HRK BH3 peptides (S1B). This indicates that BCL-xL, as a BH3 binding protein, counteracts constitutive death signals in these cells. BH3 profiling of HCT116 p21^{-/-} PUMA^{-/-} pLVX and HCT116 p21^{-/-} PUMA^{-/-} pLVX(BCL-xL) cells argued that endogenous PUMA provides an « activating » death signal that significantly contributes to the response to BCL-xL inhibitory peptides. In sum, BH3 profiling assays reveal, in these specific cells, a role played by BCL-xL as a BH3 binding inhibitor of mitochondrial damaging signals to which PUMA significantly participates. (C) The indicated HCT116 cells were treated by etoposide (50 !M, 16h) +/- WEHI-539 (1 !M, 3 h) (left panel), +/- ABT-737 (1 !M, 3 h) (right panel) before cell death analysis. Enhancing endogenous PUMA levels by pretreatment with etoposide (see 1D) enhanced the sensitivity to BCL-xL derepression by WEHI-539 or ABT-737 of BCL-xL low expresser, PUMA proficient, cells but not that of BCL-xL high expressers. (D) Western blot analysis of the indicated HCT116 cells lines treated or not by etoposide (50 !M, 16 h) show. Data shown represent results from one of three separate experiments. (E) PUMA-inducible DLD1 (doxycycline controlled repression system) overexpressing BCLxL (pLVX(BCL-xL) or not (pLVX), as indicated, were induced for PUMA by doxycycline withdrawal and treated with WEHI-539 (48 h) before cell death analysis. Data presented are mean ± S.E.M. of three independent experiments. Overexpression of BCL-xL inhibited cell death induced upon PUMA expression, and this was only slightly derepressed by the highest concentrations of BH3 mimetic used.

Figure S2. Related to Figure 2

(A) BRET saturation curves between RLuc-PUMA and YFP-BCL-xL or YFP-BCL-xL G138E R139A I140N in MCF-7 cells. Data presented are representative of three independent experiments.

(B) Effect of ABT-737 treatment on RLuc-BAX or RLuc PUMA/YFP-BCL-xL using BRET assays in yeast. (C) ABT-737 response of the BRET couple RLuc-BAX / YFP-BCL-xL was assessed by concentration curve experiments in HCT116 p21^{-/-}pLVX cells. WEHI-539 concentration curve was reproduced from Figure 2F for illustrative purposes. Data presented as mean ± S.E.M of three independent experiments.

Figure S3. Related to Figure 3

(A) Fluorescence microscopy image of MCF-7 cells transfected with YFP-BCL-xL, YFP-BCL-xLΔC, YFP-BCL-xLA221R or YFP-BCL-xLΔ2 (green). Mitochondria were visualized using MitoTracker Red CMXRos probe (red). (B) BCL-xL expression was evaluated by western blot analysis of the indicated HCT116 p21^{-/-} cells lines stably transduced with the corresponding plasmid. Data shown represent results from one of three separate experiments. (C) The indicated HCT116p21^{-/-} cells were treated by ABT-737 or WEHI-539 (1μM, 16h) before immunoprecipitation with an anti-BCL-xL antibody and western blot analysis. Data presented are representative of three independent experiments.

Figure S4. Related to Figure 4

Specificities of interactions between BCL-xL and BIM_L, BAK, BAD or tBID were assessed using BRET saturation curves assays between YFP-BCL-xL, YFP-BCL-xL G138E R139A I140N and RLuc fused to BIM_L, BAK, BAD or tBID in MCF-7 cells.

Figure S5. Related to Figure 5

Specificities of interactions between BCL-2 and PUMA, BAD or BIM_L were assessed using BRET saturation curves performed between YFP-BCL-2, YFP-BCL-2 G145E, R146L, I147N or YFP-BCL-2 ΔC and RLuc fused to PUMA, BAD or BIM_L in MCF-7 cells.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents

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

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

Annexe 2 – Tight sequestration of BH3 proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes Contributes to Apoptotic Resistance

Cell culture

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

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

Mito-primed BCL-xL addicted SVEC cells expressing EGFP-fused BCL-xL and tagged tBID or PUMA were obtained as described in Lopez et al.(2016). These cells were confirmed to express comparable levels of BCL-xL and were shown to express higher levels of PUMA than of tBID. Kinetic cell viability assays were monitored using SYTOX Green stain coupled to Incucyte imaging system (Essen bioscience). Percentage cell death was calculated as described in Lopez et al. (2016) by normalizing against maximal cell death, which was defined as the SYTOX Green signal obtained following treatment of each cell line with 1 mM actinomycin D and 10 µM ABT-737 (a treatment confirmed to kill all cells by visual inspection of Incucyte images).

ΔΨ_m BH3 Profiling Using Whole Cells

Cell density was 1×10⁴ cells/well. 15 µL of peptides in T-EB (300 mM Trehalose, 10 mM hepes-KOH pH 7.7, 80 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1% BSA, 5 mM succinate) were deposited per well in a black 384-well plate (BD Falcon no. 353285). Single cell suspensions were washed in T-EB before being resuspended at 4× their final density. One volume of the 4× cell suspension was added to one volume of a 4× dye solution containing 4 µM

JC-1, 40 µg/mL oligomycin, 0.02% digitonin, 20 mM 2-mercaptoethanol in T-EB. This 2× cell/dye solution stood at RT for 5–10 min to allow permeabilization and dye equilibration. A total of 15 µL of the 2× cell/dye mix was then added to each treatment well of the plate, shaken for 15 s inside the reader, and the fluorescence at 590 nm monitored every 5 min at RT.

BRET saturation curves assays

At 24 h before transfection, cells were plated in 12-well plates. Cells were transfected with increasing amounts (50 to 1500 ng/well) of plasmids coding for a BRET acceptor (eYFP-BCL-xL, eYFP-BAX...), and constant amounts (50 ng/well) of plasmid expressing a BRET donor (RLuc-BAX, RLuc-PUMA fusion protein), using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Twenty four hours later, cells were collected and seeded in duplicates in 96-well white plates. Twenty-four hours later, cells were treated during 16 h. Prior to BRET measurement, cells were washed once with PBS. Coelenterazine H substrate (Interchim) was injected in plates, in PBS at a final molarity of 5 µM, and BRET was measured immediately and at 6 successive other times. BRET was monitored using the lumino/fluorometer Mithras LB 940 (Berthold Technologies, France), allowing for the sequential integration of luminescence with two filter settings. The emission signal values obtained at 530 nm were divided by the emission signal values obtained at 485 nm. The BRET ratio was calculated by subtracting the BRET signal value obtained with co-expressed donor and acceptor by that obtained with the donor protein co-expressed with untagged BCL-xL. Data shown are representative of at least three independent experiments.

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

BRET assays in yeast

Yeast wild-type haploid strain BY4742 (MATa his3 leu2 lys2 ura3) were transformed by the BRET donor plasmid (p415-GAL-RLuc, LEU2 as yeast selection marker, RLuc-BAX or RLuc-PUMA cDNA under the control of the inducible GAL1/10 promoter) and the BRET acceptor plasmid (p416-GPD-YFP-BCL-xL, URA3 as yeast selection marker, YFP-BCL-xL cDNA under the control of the constitutive GPD promoter).

Annexe 2 – Tight sequestration of BH3 proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes Contributes to Apoptotic Resistance

Yeast colonies were picked from selection plates (SD-Ura-Leu media; SD for Synthetic Dextrose) and overnight grown to exponential phase ($OD_{595}=0,5$) at 30°C in a synthetic medium (SR-Ura-Leu; SR for Synthetic Raffinose). Treatment with 10 μ M ABT-737 was started one hour before the induction of the GAL1 promoter, which was performed with addition of 2% galactose for three hours. The BRET signal were measured 15 minutes after addition of Coelenterazine H substrate (5 mM) using the lumino/fluorometer Mithras LB 940 (Berthold Technologies, France) as described above. As in the case of BRET in mammalian cells, to correct background signal due to the overlap

of donor emission at the acceptor emission wavelength, the BRET ratio was always determined in parallel for yeast co-expressing the BRET donor (RLuc-BAX or RLuc-PUMA) and BCL-xL untagged (from the p416-GPD-BCL-xL plasmid). Data shown are representative of at least five independent experiments.

SUPPLEMENTAL REFERENCE

Ryan, J., and Letai, A. (2013). BH3 profiling in whole cells by fluorimeter or FACS. *Methods San Diego Calif* 61, 156–164.

E2F1 interacts with BCL-xL and regulates its localization dynamics to trigger cell death

Céline Vuillier¹, Steven Lohard¹, Jenifer Cultot², Sophie Barillé-Nion¹, Frédérique Braun^{1,&}, Fabien Gautier^{1,4}, Laurence Dubrez², Andrew P. Gilmore³, Philippe Paul Juin^{1,4*} and Laurent Maillet^{1*}

¹ CRCNA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

² INSERM, UMR866, Université de Bourgogne, Dijon, France.

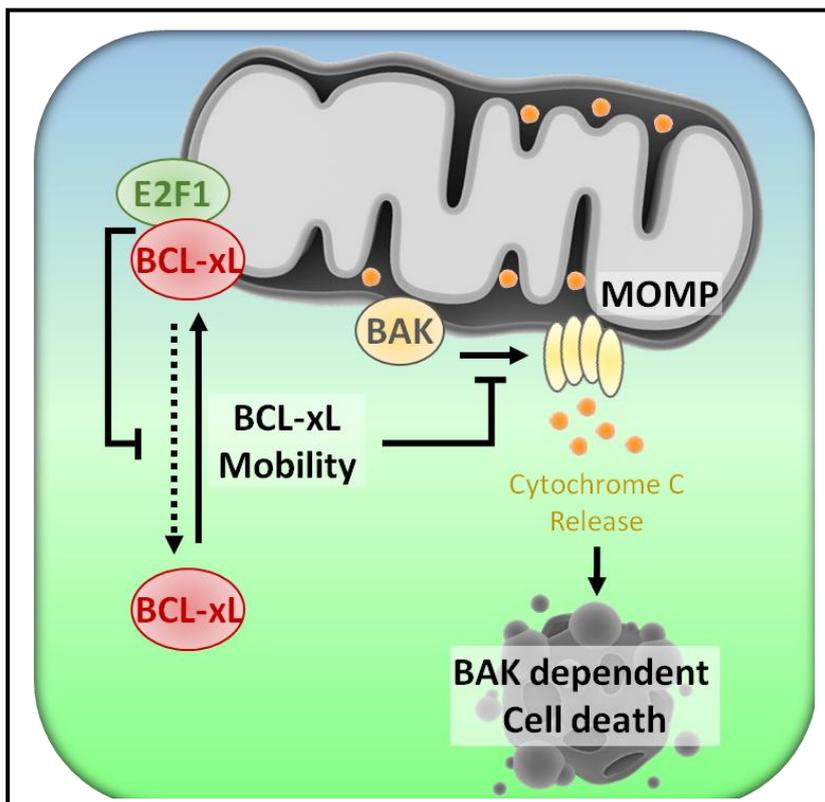
³ Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester M13 9PT, UK

⁴ ICO René Gauducheau, Saint Herblain, France

[&] current address : CNRS FRE 3630, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, France.

* co-corresponding authors

Graphical Abstract



Highlights

- E2F1 exerts a non transcriptional pro-apoptotic function at the mitochondria
- E2F1 interacts with BCL-xL
- E2F1 negatively regulates BCL-xL mobility
- BCL-xL mobility is required for efficient BAK dependant cell death inhibition

ABSTRACT

E2F1 is the main pro-apoptotic effector of the pRB regulated tumor suppressor pathway. Here we find that E2F1 partly localizes to mitochondria, where it favors BAK dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. E2F1 interacts with BCL-xL independently from its BH3 binding interface, and induces a stabilization of BCL-xL at mitochondrial membranes, which prevents complete control over BAK. We thus identify a new, non BH3-binding regulator of BCL-xL localization dynamics that influences its anti-apoptotic activity.

INTRODUCTION

Major tumor suppressor pathways, such as those relying on p53 or pRB/E2F1, promote pro-apoptotic signals that ultimately converge on Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization (MOMP) (Polager and Ginsberg, 2009). BCL-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) family proteins are critical regulators of this process (Chipuk et al., 2008; Martinou and Youle, 2011; Tait and Green, 2010). They are classified into three functionally distinct subgroups depending on their BCL-2 homology (BH) domain composition: multidomain anti-apoptotic proteins (BCL-xL, BCL-2, MCL-1...) oppose multidomain pro-apoptotic proteins (BAX, BAK...) and their upstream effectors the BH3-only pro-apoptotic members (BAD, BIM, BID, NOXA, PUMA...) (Juin et al., 2013). They do so in great part by engaging in a network of physical interactions, in which the BH3 domain of pro-apoptotic proteins is bound to the hydrophobic groove at the surface of anti-apoptotic proteins. The balance between these different interactions determines whether or not MOMP occurs due to BAX/BAK oligomerization in mitochondrial membranes.

Changes in BCL-2 protein complexes that lead to MOMP in response to tumor suppression have been extensively described. Prototypical, activated p53 molecules directly induce the transcription and expression of BH3-only proteins. Moreover, p53 also acts through a non transcriptional effect: it indeed localizes to mitochondria (Marchenko et al., 2000) where it can interact with anti-apoptotic BCL-2 proteins (Mihara et al., 2003) or with BAX to directly activate it (Chipuk et al., 2004). It therefore p53 exerts a widespread effect on mitochondrial apoptotic priming by impacting, in many ways, on the

composition and assembly of the BCL-2 network (Le Pen et al., 2016). Several BCL-2 proteins including BAK and BCL-xL localize preferentially at intracellular membranes (especially in the outer mitochondrial membrane) due to a hydrophobic C-terminal anchor (Lindsay et al., 2011). The current view is that competence to die/cell death decisions can be inferred/detected by snapshot analysis of the state of the BCL-2 network at mitochondria (Montero et al., 2015). However, recent data have highlighted that more dynamic features may also intervene. At a whole cell level, BAX, BAK and BCL-xL are not only targeted to mitochondria but their outer membrane associated and integral forms are also shuttled back (« retrotranslocated ») at varying rates (with BAX retrotranslocation being more efficient than that of BAK and BCL-xL (Todt et al., 2015). Retrotranslocation of pro-apoptotic proteins protects from cell death and it relies on the binding of their exposed BH3 domain to the hydrophobic groove of anti-apoptotic proteins, and on BCL-2 independent mechanisms involving mitochondrial proteins (Edlich et al., 2011; Lauterwasser et al., 2016; Schellenberg et al., 2013). In contrast, the mechanisms of BCL-xL retrotranslocation and its impact on MOMP onset are not yet completely understood.

E2F1 is the main pro-apoptotic effector of the pRB regulated tumor suppressor pathway. It was described to promote p53 dependent and independent apoptosis in response to either oncogenic stress or DNA damage (Polager and Ginsberg, 2009). E2F1 is recognized to mainly function as a transcription factor, inducing the expression of numerous pro-apoptotic actors, including some BH3-only proteins such as PUMA and BIM. Its transcriptional activity is negatively regulated by pRB in most cases, even though positive modulation was reported upon genotoxic

and apoptotic stress (Bertin-Ciftci et al., 2013; Poppy Roworth et al., 2015). Because some reports hinted that E2F1 might also promote apoptosis by transcription independent mechanisms (Hsieh et al., 1997; Phillips et al., 1997), we herein investigated whether it might exert a direct effect on the mitochondrial BCL-2 network, as was reported for p53 and for its binding partner pRB (Hilgendorf et al., 2013; Mihara et al., 2003). We herein show that E2F1 physically interacts with BCL-xL and that it inhibits mitochondrial BCL-xL mobility, which we establish here as critical for negative regulation of BAK mediated MOMP.

RESULTS & DISCUSSION

E2F1 pro-apoptotic activity relies on its by stabilization at the protein level in response to cell death stimuli, such as DNA damage, resulting in numerous post-translational modifications (Poppy Roworth et al., 2015). Consistent with this, treatment of pRB deficient, p53-null Saos-2 cells with the genotoxic agent etoposide led to enhanced E2F1 expression that coincided with apoptosis onset (Figure 1A). E2F1 contributed to cell death induction, since down regulation of its expression by siRNA mediated RNA interference significantly decreased cell death rates (Figure 1B). Subcellular fractionation of untreated and etoposide-treated Saos-2 cells revealed the presence of endogenous E2F1 in the mitochondrial fraction of these cells (Figure 1C). Mitochondrial E2F1 was also found in other cell types (Figure S1). Of note, E2F1 molecules electrophoretically migrated as a doublet in untreated mitochondrial fractions in contrast to a single band in treated mitochondrial fractions, probably implying a qualitative post-translational change in mitochondrial E2F1 upon treatment that we have not been able to identify so far.

To investigate whether mitochondrial E2F1 would contribute to apoptosis, we engineered a mitochondrial targeted, GFP-fused wild type E2F1 (GFP-E2F1, hereinafter named wt form) to which was fused the OTC domain (OTC-GFP-E2F1, hereinafter named OTC form), using a strategy previously used to investigate the mitochondrial effects of p53 and pRB (Hilgendorf et al., 2013; Marchenko et al., 2000) (Figure S2A, S2B). Specific mitochondrial targeting of OTC-GFP-E2F1 was confirmed by fluorescence microscopy (Figure S2C). We investigated pRB and p53 independent biological effects of mitochondrial targeted E2F1 by transient transfection of Saos-2 cells with the OTC form followed by investigation of GFP positive cells, using GFP-E2F1 as a positive control. As shown in Figure 2A, enhanced expression of either wild type or mitochondrial targeted E2F1 was sufficient per se to trigger cell death. Importantly, both E2F1 forms sensitized Saos-2 cells to etoposide-induced cell death, strongly arguing that mitochondrial E2F1 potently contributes to cell death onset (Figure 2A). As previously published, targeting GFP to mitochondria using OTC did not induce cell death (Marchenko et al., 2000) (Figure S2D). Ectopic expression of wt or OTC E2F1 forms induced caspase 3 activation and triggered caspase-dependent cell death since the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh completely protected cells (Figure S2E, S2F). To directly investigate whether enhanced E2F1 expression triggers MOMP, we used the reporter breast cancer cell line MDA-MB231 that stably expresses an OMI red fluorescent fusion protein which is degraded by the proteasome when released from mitochondria following MOMP (Tait et al., 2010). Analysis based on red fluorescence intensity of mitochondria allowed us to discriminate, among GFP- positive cells, intact cells from cells that underwent MOMP (Figure 2B). Both wild type and mitochondrial targeted E2F1 triggered MOMP

(as detected by a decrease in red fluorescence) in these cells (Figure 2B).

As expected, transient transfection of OTC-GFP-E2F1 had no detectable effect on mRNA expression of E2F1 canonical pro-apoptotic transcriptional targets such as TP73, PUMA/BBC3 or BIM/BCL2L11, whose expression was induced by GFP-E2F1 in control experiments (Figure S2G). In addition, it had no impact on HRK expression, which was reportedly induced by wild type E2F1, via the indirect inhibition of a repressor complex (Bell et al., 2006). To further substantiate that the apoptotic effects of mitochondrial E2F1 reported above ensue, at least in part, from transcription independent mechanisms, we used GFP-fused E2F1 E132 (named E132 form), a DNA binding defective mutant (Figure S2A, S2B). This E2F1 transcription deficient form induced MOMP and cell death, by itself and it sensitized cancer cells to etoposide treatment (Figure 2A, 2B). Likewise, a mitochondrial targeted, transcription deficient E2F1 mutant (OTC-GFP-E2F1 E132) induced apoptosis upon overexpression in Saos-2 cells (data not shown).

Down regulation of BAK and/or BAX expression by RNA interference showed that cell death induced by wild type or mitochondrial targeted E2F1 exclusively relied on BAK (Figure 3A and S3A). Importantly, both E2F1 forms (and the E132 form) drastically enhanced the pro-apoptotic effects of ectopically expressed BAK (Figure 3B, S3B and S3C). We observed the same effect when the upstream activators, the BH3-only proteins BIM, PUMA and truncated BID (tBID) were co-transfected with either wt or OTC forms (Figure 3B, S3B, and S3C). The identities of anti-apoptotic proteins that could prevent E2F1-induced cell death was further consistent with a critical role for BAK downstream of E2F1. Indeed, cell death induced by

either wt or OTC forms was prevented by BCL-xL and MCL-1 but not by BCL-2 (which was shown not to modulate BAK dependent cell death, most likely as a result from its lack of interaction with this pro-apoptotic protein) (Figure 3C and S3D). BH3 binding activity was required for BCL-xL to inhibit E2F1-induced cell death, since the BCL-xL R139D mutant, whose BH3 binding is impaired (Ding et al., 2014)(see also below), did not protect cells in the same settings. This was further substantiated by the observation that treatment with the BH3 mimetic inhibitor WEHI-539 (which specifically targets BCL-xL) reverted the protection afforded by overexpressed BCL-xL against E2F1 induced cell death (Figure 3C).

We then investigated whether the non transcriptional pro-apoptotic impact of E2F1 on BCL-xL-regulated BAK-mediated MOMP relied on a molecular interaction between E2F1 and BCL-xL. As shown in Figure 4A, E2F1 co-immunoprecipitated with BCL-xL in lysates from Saos-2 cells. Importantly, this interaction was detected in numerous other cell lines independently from their pRB and p53 status (Figure S4A). It was resistant to WEHI-539 treatment, suggesting a BH3 binding independent interaction between E2F1 and BCL-xL. Pulldown assays using recombinant GST fused E2F1 (obtained as described in (Cartier et al., 2011) and recombinant soluble BCL-xL demonstrated a direct interaction between both proteins (Figure 4B). Finally, bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays confirmed a specific proximity between Renilla Luciferase fused to E2F1 (RLuc-E2F1) and YFP-BCL-xL at a whole cell level (Figure 4C). Further arguing for a BH3 binding site independent interaction, BRET signals between E2F-1 and BCL-xL were left intact by the R139D mutation in BCL-xL, which significantly affected BRET signals between BAK and BCL-xL (Figure S4B and S4C).

In sharp contrast to these observations, we could not detect any proof of interaction between E2F1 and BAK by co-immunoprecipitation assays and BRET analysis (data not shown).

We observed no detectable cytochrome C release upon incubation of BAK-expressing isolated mitochondria incubated with recombinant E2F1, with or without truncated BID as a canonical activator (data not shown). We thus inferred that E2F1 might favor MOMP by impacting on a dynamic process, only patent in whole cell assays. We thus investigated its effects on the subcellular localization dynamics of BCL-xL. To this end, we used MCF-7 cells stably expressing YFP-BCL-xL and performed fluorescence recovery after bleaching (FRAP) experiments. These cells were transiently transfected with mCherry fused to wt E2F1, its E132 mutant or its mitochondrial targeted OTC-E2F1, and we investigated YFP-BCL-xL mobility between the cytosol and mitochondria in E2F1-transfected red fluorescent cells. We controlled that YFP- fused BCL-xL did interact with wt or E132 forms under these circumstances (Figure S5A). FRAP studies on cells expressing the negative control mCherry revealed that YFP-BCL-xL recovered to about 80% of its initial fluorescence. This indicates that 4/5 of BCL-xL molecules are mobile and that only the 20% remainders were stably associated with the outer mitochondrial membrane. In cells over-expressing E2F1, YFP-BCL-xL only recovered to 60% of its initial fluorescence, indicating a two-fold increase (20% to 40%) of BCL-xL molecules stably associated to the outer mitochondrial membrane compared to controls. We observed the same recovery rates for the three E2F1 forms (wt, E132 or OTC). Similar conclusions were drawn using mouse embryonic fibroblasts stably expressing GFP-BCL-xL (Figure S5B). These experiments support the notion that E2F1 decreases BCL-xL

retrotranslocation rates, independently from transcription.

Since E2F1 variants that impact on BCL-xL mitochondrial stability promote BAK-dependent apoptosis, we reasoned that BCL-xL retrotranslocation efficiency would be critical for its ability to inhibit BAK mediated apoptosis. We directly investigated this point by comparing the ability of two “mobile” variants of BCL-xL (endowed with enhanced retrotranslocation properties) BCL-xL $\Delta 2$ and BCL-xL-H9 (Todt et al., 2013) to antagonize BAK-induced cell death with that of BCL-xL. These mobile variants more efficiently prevented BAK-induced cell death. This effect was specific on BAK, since they did not counteract BAX-induced cell death better than BCL-xL (Figure 5B and S5C). Importantly, apoptosis suppression by BCL-xL required its mitochondrial localization since no protection was observed with cytosolic BCL-xL A221R under these conditions (Pécot et al., 2016).

To the best of our knowledge, our work is the first one to describe how BCL-xL subcellular localization dynamics selectively impact on its inhibition of BAK-dependent cell death, and to define one regulatory element thereof, namely E2F1. Arguably, active shuttling of BCL-xL pro-apoptotic binding partners BAX/BAK, and possibly of upstream BH3 activators, contributes to survival by keeping them away from their site of action and decreasing oligomerization rates of BAX/BAK (Edlich et al., 2011; Todt et al., 2013; Schellenberg et al., 2013). We assume that changes in BCL-xL mobility (upon E2F1 accumulation or mutations in its C-terminal end) have a stronger impact on its BH3 binding dependent control over BAK than BAX because the former is intrinsically less mobile than the latter (Todt et al., 2015). Interestingly, such changes in BCL-xL shuttling may also influence the cell response to BH3 mimetics, since membrane

localization of BCL-xL selectively influences its binding to the BH3 domains of apoptotic effectors (Pécot et al., 2016). Thus, modifications in the respective amounts of mobile versus mitochondrial-stable BCL-xL molecules are functionally relevant and they represent a critical level of regulation of BCL-xL survival function. We show here that these changes can be modulated independently from BCL-xL BH3 binding as E2F1 impacts on BCL-xL localization dynamics while interacting with it at a site that appears different from its BH3 binding one. We are currently investigating the regions involved in the E2F1/BCL-xL interaction to understand the molecular basis of BCL-xL shuttling regulation by E2F1. This regulation might extend to retrotranslocation of the other inhibitor of BAK, MCL-1 (Xu et al., 2011) with whom we found E2F1 to interact, and whose localization dynamics are also affected by E2F1 (data not shown). Of note, another implication of our work is that differences in BCL-xL motility may be found between cancer versus normal cells due to differences in E2F1 expression and activity (Hsu et al., 1997). In all cases, it underscores that the BCL-2 regulated apoptotic network has to be considered as a dynamically evolving one, which is influenced by tumor suppressor pathways not only at the level of synthesis rates and protein complex formation but also at the level of shuttling kinetics between subcellular membranes and the cytosol.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture

The Saos-2 osteosarcoma cell line was obtained from ATCC and cultured in Mc Coy's 5A medium (Life Technologies), supplemented with 20% of fetal bovine serum (FBS). The breast cancer cell lines, from ATCC, MCF-7 and BT-549 were cultured in RPMI₁₆₄₀ medium (Life Technologies), supplemented with L-Glutamine (Invitrogen) and 10% of FBS. The MDA-MB-231 breast cancer cells and U251 glioblastoma cells, also from ATCC were cultured in DMEM (Gibco), supplemented with L-

Glutamine and 5% of FBS. The colorectal cancer cell line HCT116 p21^{-/-} was kindly provided by Dr Volgenstein (John Hopkins Kimmel Cancer Center, Baltimore, MD, USA) and cultured in Mc Coy's 5A medium, supplemented with 10% of FBS. All cells were cultured in media supplemented with penicillin/streptomycin (Invitrogen) at 37°C.

The MCF-7 cell line stably overexpressing YFP-BCL-xL was obtained after transfection of MCF-7 cells with peYFP-BCL-xL, using Lipofectamine 2000 as transfecting agent. Selection was performed 48h after, by culturing cells in RPMI₁₆₄₀ medium containing 1 mg/ml of G418 for several weeks.

The MDA-MB-231 OMI-mCherry cell line was obtained after infection of MDA-MB-231 at MOI 3 with retroviruses containing the expression vector harboring the human OMI coding sequence fused to the mCherry sequence. Selection was performed by culturing cells in DMEM medium containing 1,5 µg/mL of puromycin for several weeks. Cells harboring a moderate expression of OMI-mCherry were sorted with the BD-FACS ARIA III sorter.

Unless indicated otherwise, treatments were used at the following concentrations: 2µM of Wehi-539 (ApexBio), 50µM of Etoposide (Sigma) and 5µM de Q-VD-OPh (R&D System).

Plasmids, siRNAs and transfection

The pcDNA3.1 expression vector (Invitrogen) was used to express untagged BCL-2 family proteins. BCL-xL $\Delta 2$ and BCL-xL-H9 expression vectors were kindly provided by F. Edlich. GFP encoding sequence from pcDNATM 6.2/ C-EmGFP-GW/TOPO® (Life Technologies) was cloned into pcDNA3.1 vector harboring human E2F1 sequence. To this resulting construct was fused the mitochondrial targeting sequence of OTC: OTC-GFP-E2F1 and/or introduced L132E N133F point mutations: GFP-E2F1 E132. Human E2F1 sequence was also cloned into the mcherry-C1 expression vector (Clontech) and directed mutagenesis was used to introduce the L132E N133F point mutations: mCherry-E2F1 E132. Exchange of GFP by mCherry sequence into the OTC-GFP-E2F1 resulted in OTC-mCherry-E2F1 construct. RLuc expression plasmids were constructed by subcloning E2F1 or BAK coding sequences into the pRLuc-C1 or pRLuc-C3 vector (BioSignal Packard), respectively. YFP expression plasmids were constructed by subcloning BCL-xL coding sequences into the peYFP-C1 vector (BD Biosciences). R139D point mutation was introduced by directed mutagenesis: YFP-BCL-xL R139D. YFP-TM_{BCL-xL} only contains the 209 to 233 amino acid of BCL-xL.

The following siRNAs were used: siE2F1 (HSC.RNAI.N005225.10.3), siBAX (ON-TARGETplus BAX siRNA smart pool L-003308-01),

siBAK (ON-TARGETplus BAK1 siRNA smart pool L-003305-00), and SiControl (ON-TARGETplus Non-targeting pool D-001810-10-20).

Plasmids and siRNAs were transfected according to manufacturer's instructions (Invitrogen) using Lipofectamine 2000 and lipofectamine RNAi Max, respectively.

Immunoblot analysis and antibodies

Protein lysates were obtained by lysing cells with CHIP buffer (SDS 1%, EDTA 10nM, Tris-HCl [pH 8,1] 50nM and proteases/phosphatases inhibitor Pierce) and after extract sonication. Protein separation was performed by SDS-PAGE. The following antibodies were used: ACTIN (MAB1501R) and BIM (AB17003) from Millipore, E2F1 (3742), COXIV (4850), PUMA (4976), BID (2002S) and BAK (3814) from Cell Signaling, BAX (A3533) and BCL-2 (M0887) from Dako, BCL-xL ([E18] Ab32370) and GFP (Ab290) from Abcam, MCL-1 (sc-819) and LAMIN A/C (sc-376248) from Santa Cruz, PARP (#AM30) from Calbiochem. Clarity™ western ECL kit (Biorad) was used for Immunoblot revelation.

Cell fractionation

Cells were incubated 30 min on ice with CEB buffer (250mM sucrose, 50mM HEPES [pH7,4], 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, 10M cytochalasin B, 1mM EGTA and proteases/phosphatases inhibitor) before cell disruption using Potter. Sequential centrifugation: 750g 10 min 4°C and 13000g 20 min 4°C leads to pellet the heavy membrane fraction. Pellet was resuspended with CHIP buffer. Additional centrifugation of supernatant at 100000g 30 min 4°C allow to purify cytoplasmic fraction. Saos-2 fractionation was performed using Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Thermo Scientific). Total extract was obtained by directly lysing cells in CHIP buffer.

Immunoprecipitation assay

Protein lysates were obtained by lysing cells with PBS-1%CHAPS buffer containing proteases/phosphatases inhibitor, after extract sonication and clarification at 13 000g 15 min 4°C. Immunoprecipitation was performed on 500µg of protein lysates incubated with 10µl of Anti-BCL-xL or anti-E2F1 antibodies by using the PureProteome™ Protein G Magnetic Beads protocol (Millipore).

Pull Down assay

Recombinant proteins: GST, GST-E2F1 or GST-E2F1₍₁₋₁₂₅₎ were produced with *Escherichia Coli*, prior immobilization on glutathionne-sepharose (Amersham Biosciences), followed by incubation with 100ng of recombinant BCL-xL (Biorbyt).

Interactions were evaluated by immunoblotting anti-BCL-xL ([E18] Ab32370) or anti-GST (Rockland).

BRET saturation curves assays

Cells were plated in 12-well plates and transfected with increasing amounts (50 to 1500 ng/well) of plasmids coding for a BRET acceptor (YFP-BCL-xL, YFP-BCL-xL R139D or YFP-TM_{BCL-xL}), and constant amounts of plasmid expressing a BRET donor (50 ng/well for RLuc-E2F1 or 100 ng/well for RLuc-BAK fusion proteins), using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. After 16h, cells were collected and seeded in duplicates in 96-well white plates. BRET measurement was performed 24h after using the lumino/fluorometer Mithras LB 940 (Berthold Technologies, France). First, cells were washed once with PBS and Coelenterazine H substrate (Interchim) was injected in plates, in PBS at a final molarity of 5 µM. BRET was measured immediately after, during 6 successive times. Two filters allow sequential integration of luminescence at 485 nm and 530 nm. BRET signal corresponds to the emission signal values (530 nm) divided by the emission signal values (485 nm). The BRET ratio was calculated by subtracting the BRET signal value obtained with co-expressed donor and acceptor by that obtained with the donor protein co-expressed with untagged BCL-xL. Data shown are representative of at least three independent experiments.

RNA Extraction, reverse Transcription and real-time quantitative qPCR

RNAs were extracted using Nucleospin® RNA (Macherey Nagel). Reverse transcription was performed using Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for qPCR (Thermo Scientific). qPCR was realized on Stratagene Mx3005P thermocycler (Agilent Technologies) using Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) ROX kit (Thermo Scientific). The following couple of primers were used:

TP73: 5'- CTTCAACGAAGGACAGTCTG /
AAGTTGTACAGGATGGTGGT-3'
BBC3: 5'- ACCTCAACGCACAGTACGA /
GCACCTAATTGGGCTCCATC-3'
BCL2L11: 5'- GCCTTCAACCACTATCTCAG /
TAAGCGTTAAACTCGTCTCC-3'
HRK: 5'- CAGGCGGAAGTGTAGGAAC /
AGGACACAGGGTTTTCCACCA-3'

Flow cytometry

Apoptosis analysis was evaluated by staining cells with Annexin V-APC (BD Pharmingen). Caspase 3 cleavage was evaluated by staining cells with anti-cleaved caspase3-AlexaFluor 647 antibody (9602, Cell Signaling). Briefly cell fixation was performed in 1% Paraformaldehyde-PBS 15 min RT, followed by cell permeabilization with 5%SVF-0,5%Saponine-

PBS solution 15 min RT. Staining was realized according to the manufacturer's instructions. Flow cytometry analysis was performed on a FACS Calibur (BD Biosciences) using the CellQuestPro software (Becton–Dickinson).

Microscopy and FRAP assay

MOMP analysis was performed using HCS Array Scan Thermo. Prior fluorescence images of Saos-2, cells were incubated with 100nM Mitotracker Red CMXRos (Life Technologies, M7512) and 1µg/mL Hoescht, 20 min 37°C. Acquisition was realized using Zeiss Axio Observer Z1. Live imaging was performed on a Zeiss Axio Observer Z1 with a CSU-X1 spinning disk (Yokogawa), using a 63x/1.40 Plan Apo lens, an Evolve EMCCD camera (Photometrics), and a motorized XYZ stage (Applied Scientific Instrumentation) driven by Marianas hardware and SlideBook 5.0 software (Intelligent Imaging Innovations). FRAP implies one region reach in BCL-xL fluorescence was bleached (one iteration, 488nm, 100%, 10ms) and images were captured every 5 sec. FIJI software was used for analysis. Fluorescence background was subtracted, prior quantifying fluorescence of the FRAP region using ROI manager plugging in FIJI. Data were normalized to 100% fluorescence prebleaching. Statistical analysis was calculated using non-linear regression analysis in GraphPad Prism 5.0.

Statistical Analysis

Student's *t* test was used for statistical analysis with GraphPad Prism 5.0 Software. Errors bars represent standard errors of mean (SEM). The symbols correspond to a P-value inferior to *0.05, **0.01, ***0.001 and **** 0.0001.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank members of the “Stress Adaptation and Tumor Escape in breast cancer” laboratory for their technical advice, fruitful comments and enthusiasm.

We thank Dr S. Tait for the generous gift of the OMI-Cherry plasmid and Dr F. Edlich for the BCL-xL $\Delta 2$ and BCL-xL H9 constructs. We thank A. Fétiveau for her technical help.

We are grateful for technical support from the Cellular and Tissular Imaging (MicroPICell) and from the Molecular Interactions and Protein Activities (IMPACT) Core Facilities of Nantes University. We thank S. Montessuit and Dr J.C. Martinou for cytochrome C release assay on isolated mitochondria. C. Vuillier and S. Lohard are supported by grants from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur and Ligue contre le cancer 44, respectively. This work was supported by Région Pays de la Loire (CIMATH2), Ligue contre le Cancer (R13137), ARC (R15083NN), and INCA PLBio 2013 (R12134NN).

REFERENCES

- Bell, L.A., O'Prey, J., and Ryan, K.M. (2006). DNA-binding independent cell death from a minimal proapoptotic region of E2F-1. *Oncogene* 25, 5656–5663.
- Bertin-Ciftci, J., Barré, B., Le Pen, J., Maillet, L., Couriaud, C., Juin, P., and Braun, F. (2013). 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.
- Cartier, J., Berthelet, J., Marivin, A., Gemble, S., Edmond, V., Plenchette, S., Lagrange, B., Hammann, A., Dupoux, A., Delva, L., et al. (2011). Cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP1) can regulate E2F1 transcription factor-mediated control of cyclin transcription. *J. Biol. Chem.* 286, 26406–26417.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010–1014.
- Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Dillon, C.P., Kriwacki, R.W., Kuwana, T., and Green, D.R. (2008). Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20327–20332.
- Ding, J., Mooers, B.H.M., Zhang, Z., Kale, J., Falcone, D., McNichol, J., Huang, B., Zhang, X.C., Xing, C., Andrews, D.W., et al. (2014). After embedding in membranes antiapoptotic Bcl-XL protein binds both Bcl-2 homology region 3 and helix 1 of proapoptotic Bax protein to inhibit apoptotic mitochondrial permeabilization. *J. Biol. Chem.* 289, 11873–11896.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145, 104–116.
- Hilgendorf, K.I., Leshchiner, E.S., Nedelcu, S., Maynard, M.A., Calo, E., Ianari, A., Walensky, L.D., and Lees, J.A. (2013). The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria. *Genes Dev.* 27, 1003–1015.
- Hsieh, J.K., Fredersdorf, S., Kouzarides, T., Martin, K., and Lu, X. (1997). E2F1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction. *Genes Dev.* 11, 1840–1852.
- Hsu, Y.-T., Wolter, K.G., and Youle, R.J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3668–3672.
- Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., and Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 13, 455–465.
- Lauterwasser, J., Todt, F., Zerbes, R.M., Nguyen, T.N., Craigen, W., Lazarou, M., van der Laan, M., and Edlich, F. (2016). The porin VDAC2 is the mitochondrial platform for Bax retrotranslocation. *Sci. Rep.* 6, 32994.
- Le Pen, J., Laurent, M., Sarosiek, K., Vuillier, C., Gautier, F., Montessuit, S., Martinou, J.C., Letai, A., Braun, F., and Juin, P.P. (2016). Constitutive p53 heightens mitochondrial apoptotic priming and favors cell death induction by BH3 mimetic inhibitors of BCL-xL. *Cell Death Dis.* 7, e2083.
- Lindsay, J., Esposti, M.D., and Gilmore, A.P. (2011). Bcl-2 proteins and mitochondria--specificity in membrane targeting for death. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 532–539.
- Marchenko, N.D., Zaika, A., and Moll, U.M. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* 275, 16202–16212.
- Martinou, J.-C., and Youle, R.J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell* 21, 92–101.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* 11, 577–590.
- Montero, J., Sarosiek, K.A., DeAngelo, J.D., Maertens, O., Ryan, J., Ercan, D., Piao, H., Horowitz, N.S., Berkowitz, R.S., Matulonis, U., et al. (2015). Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. *Cell* 160, 977–989.
- Phillips, A.C., Bates, S., Ryan, K.M., Helin, K., and Vousden, K.H. (1997). Induction of DNA synthesis and apoptosis are separable functions of E2F-1. *Genes Dev.* 11, 1853–1863.
- Polager, S., and Ginsberg, D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. *Nat. Rev. Cancer* 9, 738–748.
- Poppy Roworth, A., Ghari, F., and La Thangue, N.B. (2015). To live or let die - complexity within the E2F1 pathway. *Mol. Cell. Oncol.* 2, e970480.
- Schellenberg, B., Wang, P., Keeble, J.A., Rodriguez-Enriquez, R., Walker, S., Owens, T.W., Foster, F., Taniaris-Hughes, J., Brennan, K., Streuli, C.H., et al. (2013). Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Mol. Cell* 49, 959–971.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Cell survival in tough times: The mitochondrial recovery plan. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 4254–4255.
- Tait, S.W.G., Parsons, M.J., Llambi, F., Bouchier-Hayes, L., Connell, S., Muñoz-Pinedo, C., and Green, D.R. (2010). Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Dev. Cell* 18, 802–813.
- Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Youle, R.J., and Edlich, F. (2013). The C-terminal helix of Bcl-x(L) mediates Bax retrotranslocation from the mitochondria. *Cell Death Differ.* 20, 333–342.
- Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Emschermann, F., Lauterwasser, J., Kaiser, A., Ichim, G., Tait, S.W.G., Frank, S., Langer, H.F., et al. (2015). Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. *EMBO J.* 34, 67–80.
- Xu, S., Peng, G., Wang, Y., Fang, S., and Karbowski, M. (2011). The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover. *Mol. Biol. Cell* 22, 291–300.

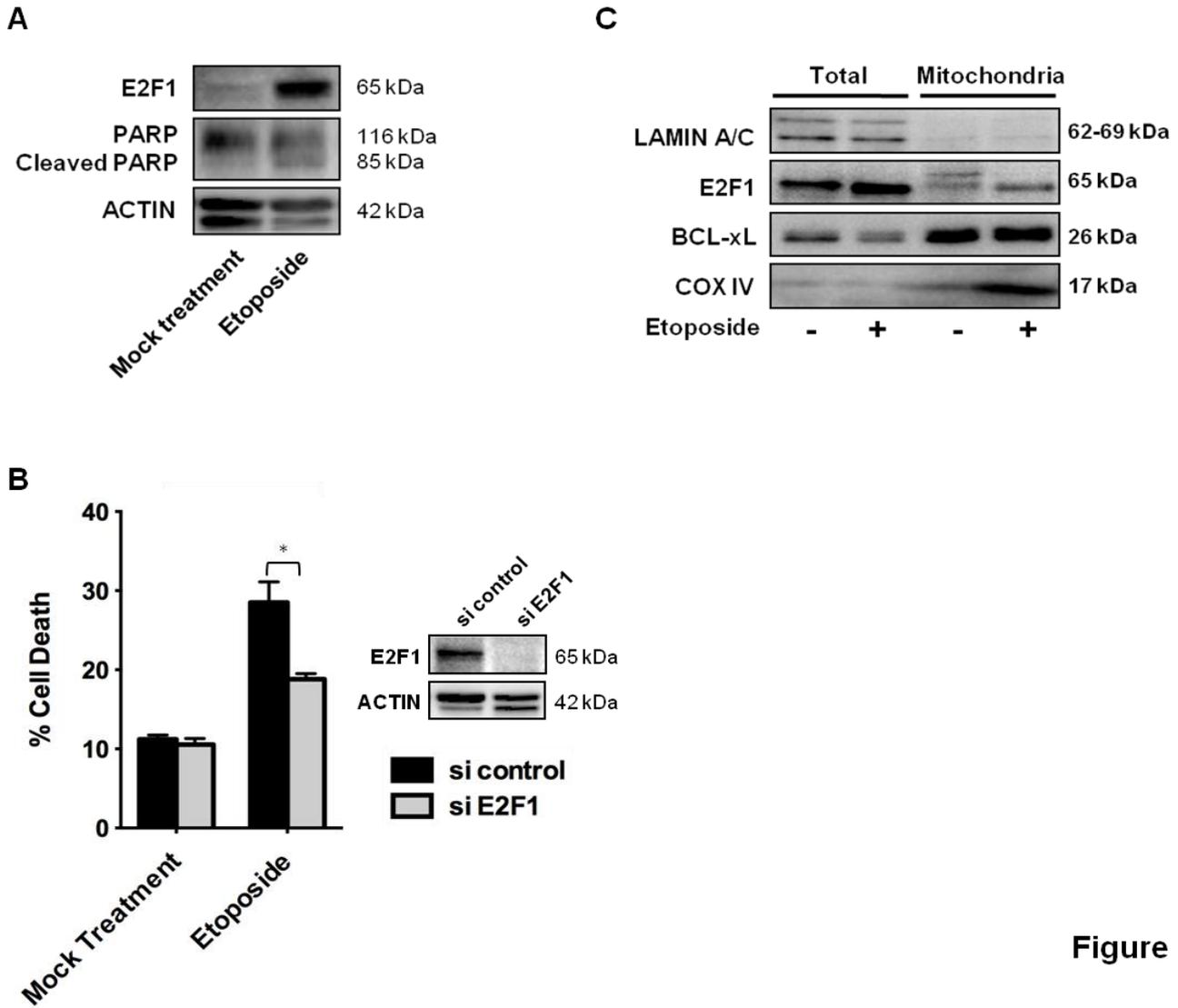


Figure 1.

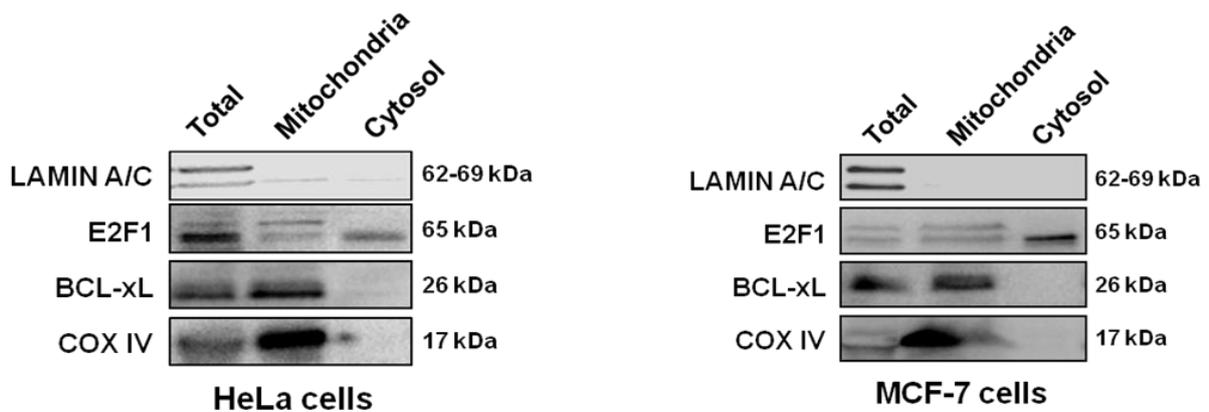
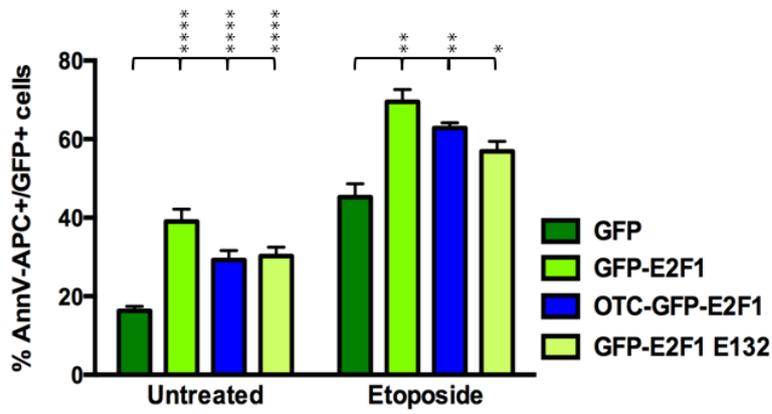


Figure S1.

A



B

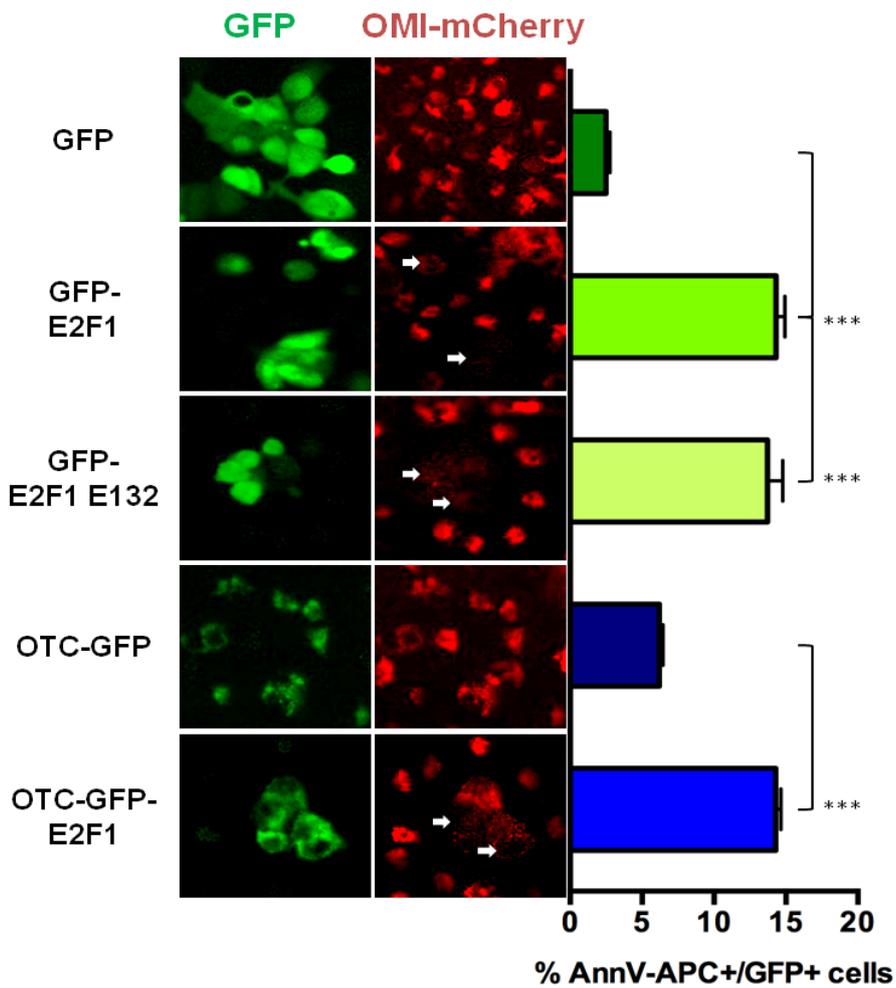


Figure 2.

Annexe 3 – E2F1 interacts with BCL-xL and regulates its localization dynamics to trigger cell death

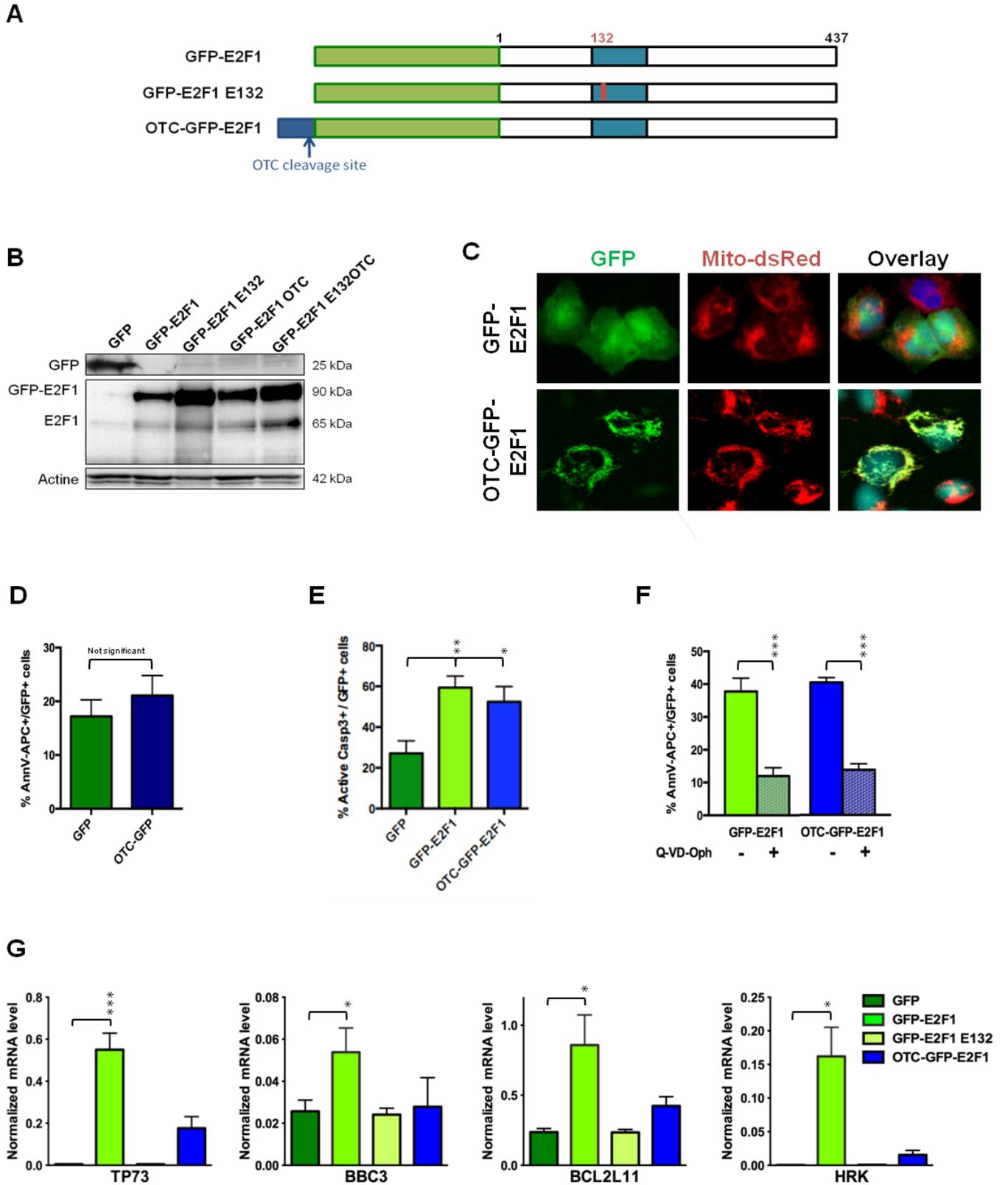


Figure S2.

Annexe 3 – E2F1 interacts with BCL-xL and regulates its localization dynamics to trigger cell death

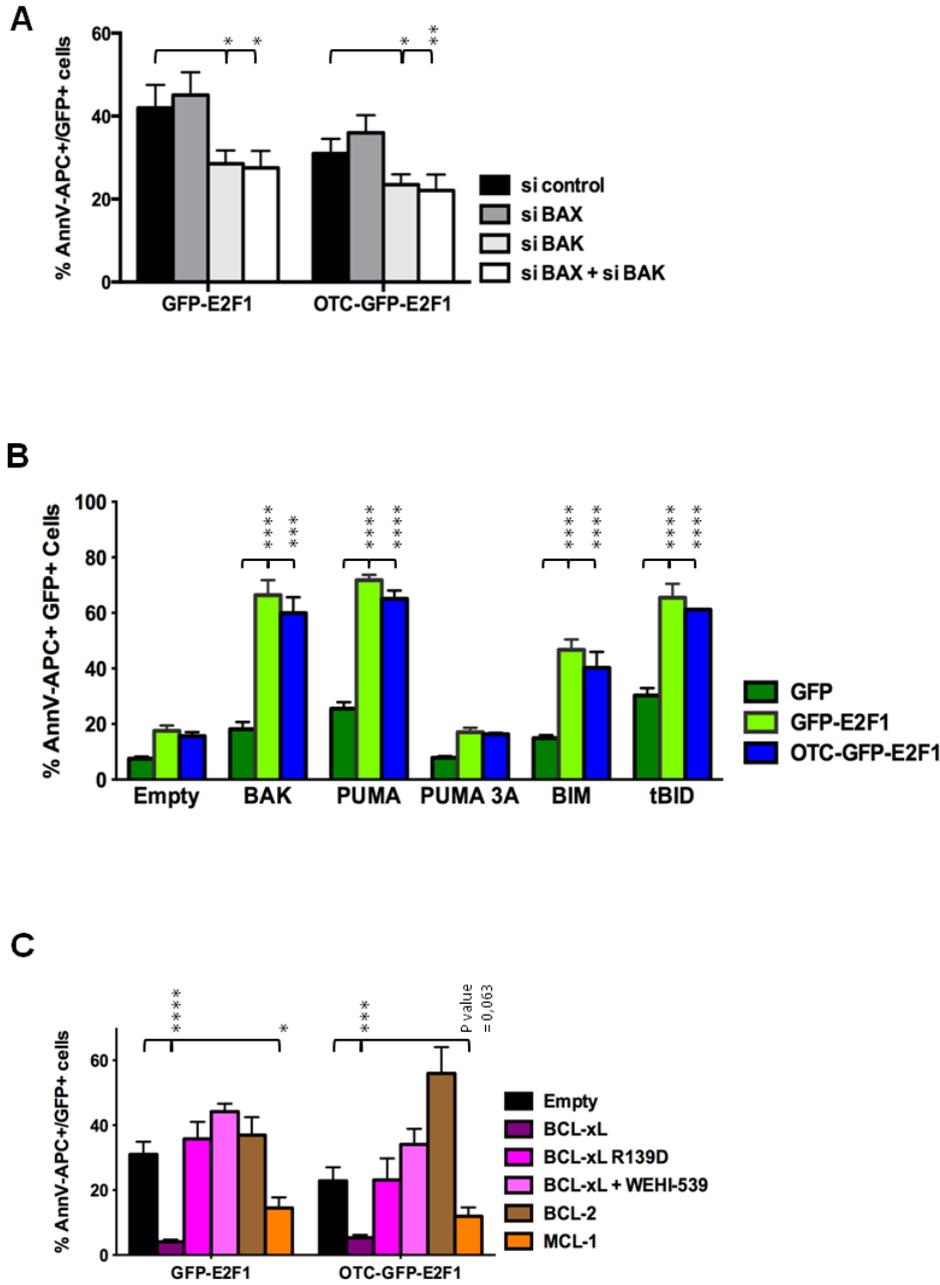


Figure 3.

Annexe 3 – E2F1 interacts with BCL-xL and regulates its localization dynamics to trigger cell death

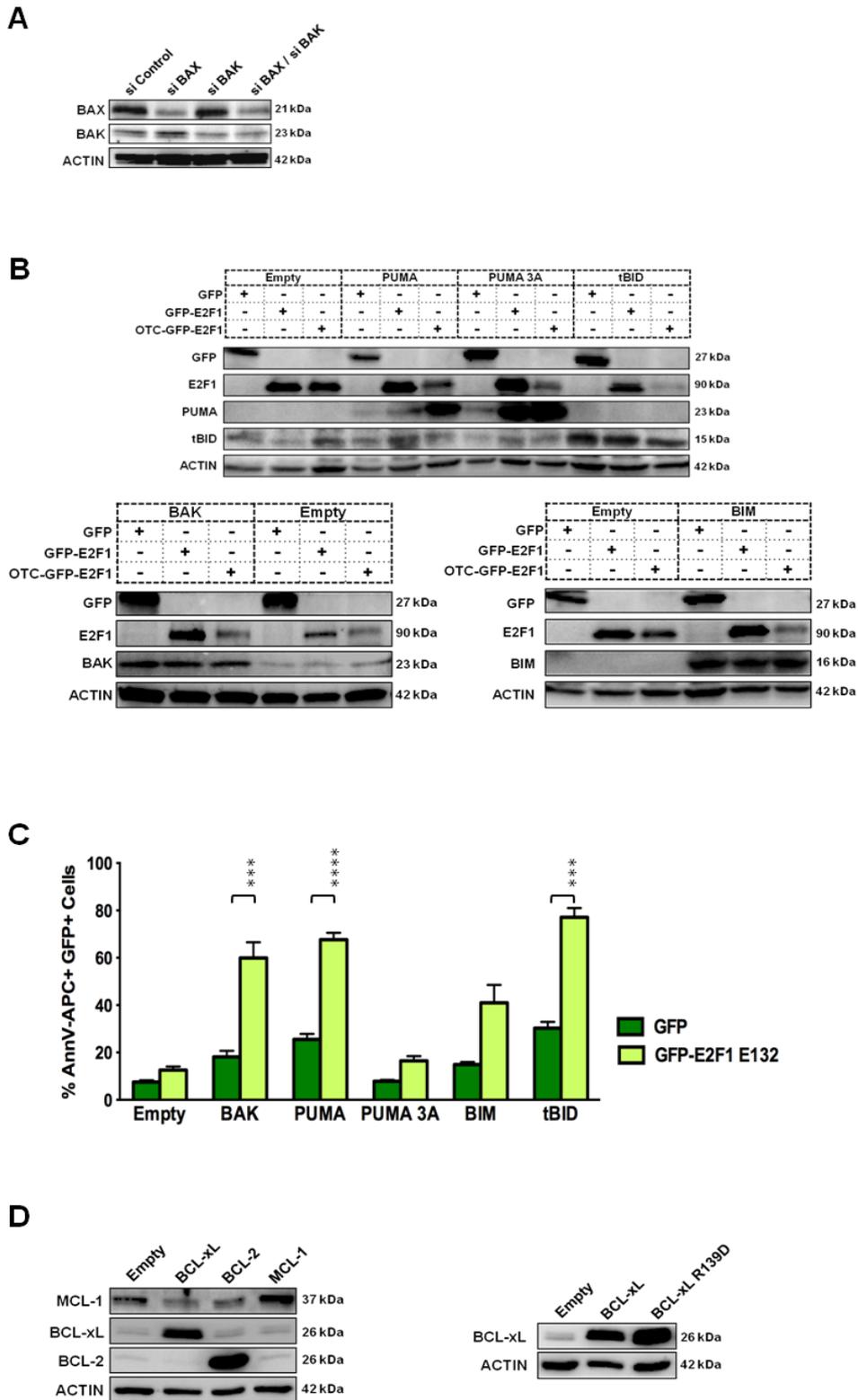


Figure S3.

Annexe 3 – E2F1 interacts with BCL-xL and regulates its localization dynamics to trigger cell death

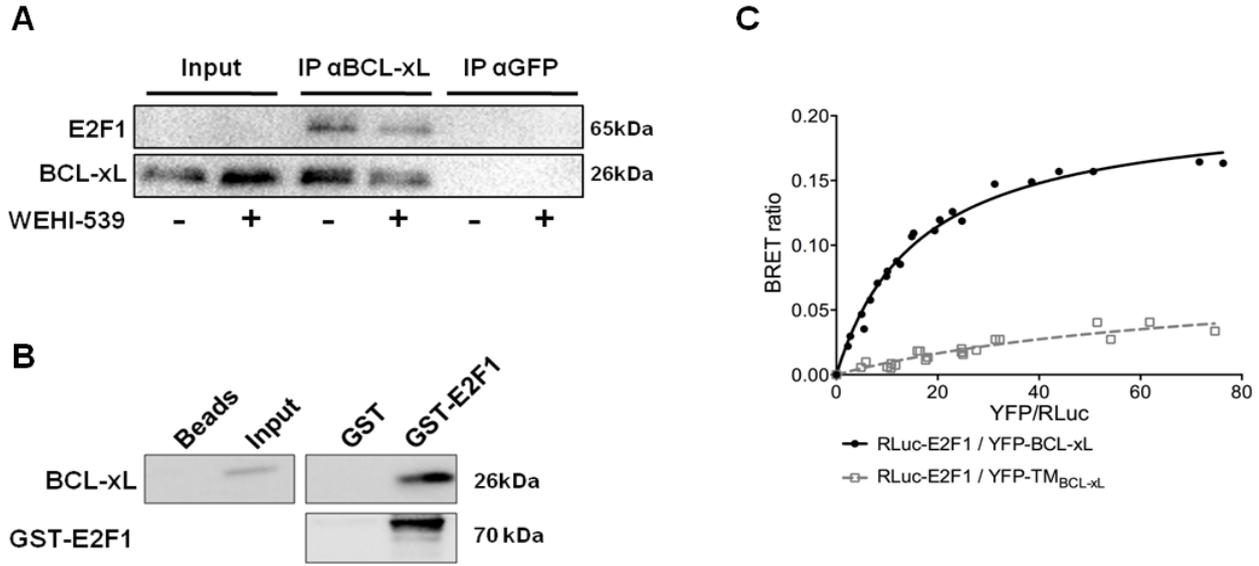


Figure 4.

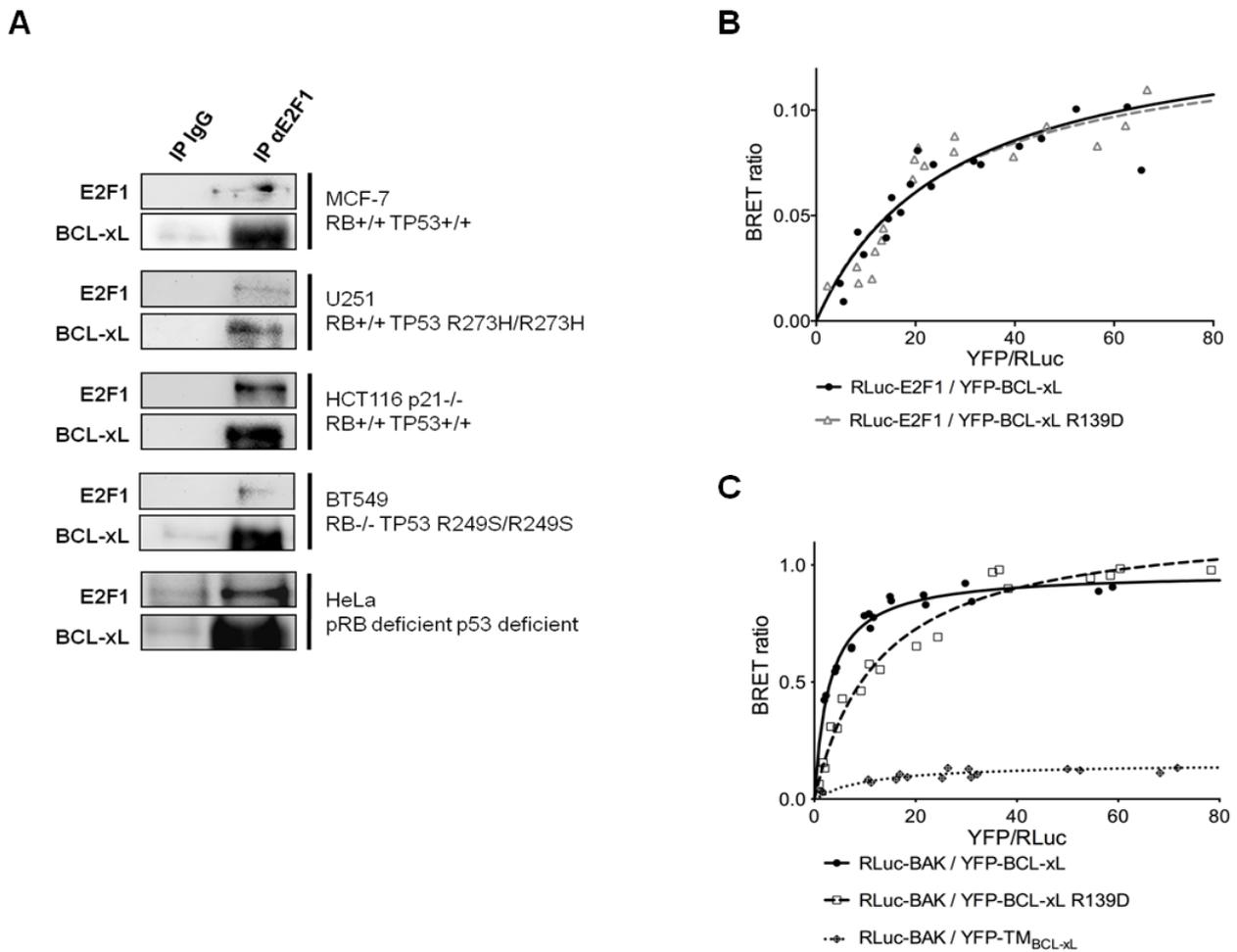
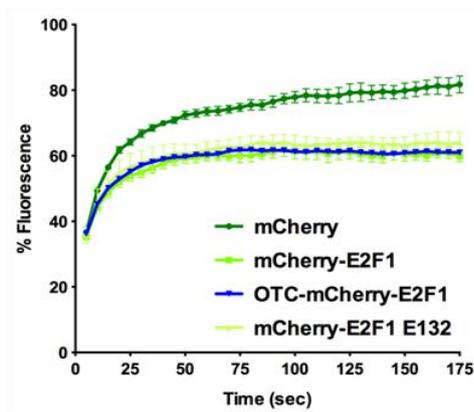
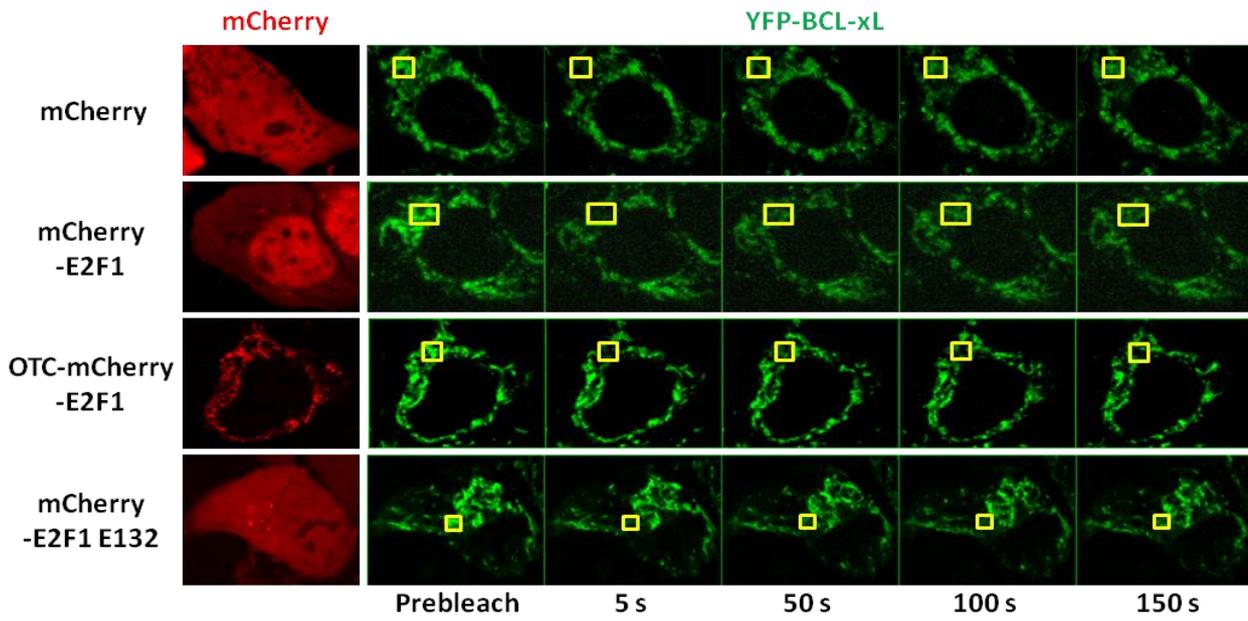


Figure S4.

Annexe 3 – E2F1 interacts with BCL-xL and regulates its localization dynamics to trigger cell death

A



B

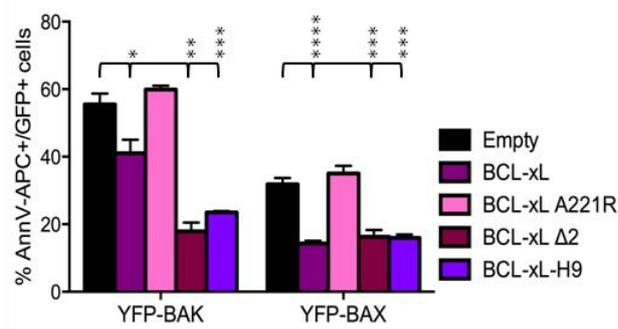


Figure 5.

Annexe 3 – E2F1 interacts with BCL-xL and regulates its localization dynamics to trigger cell death

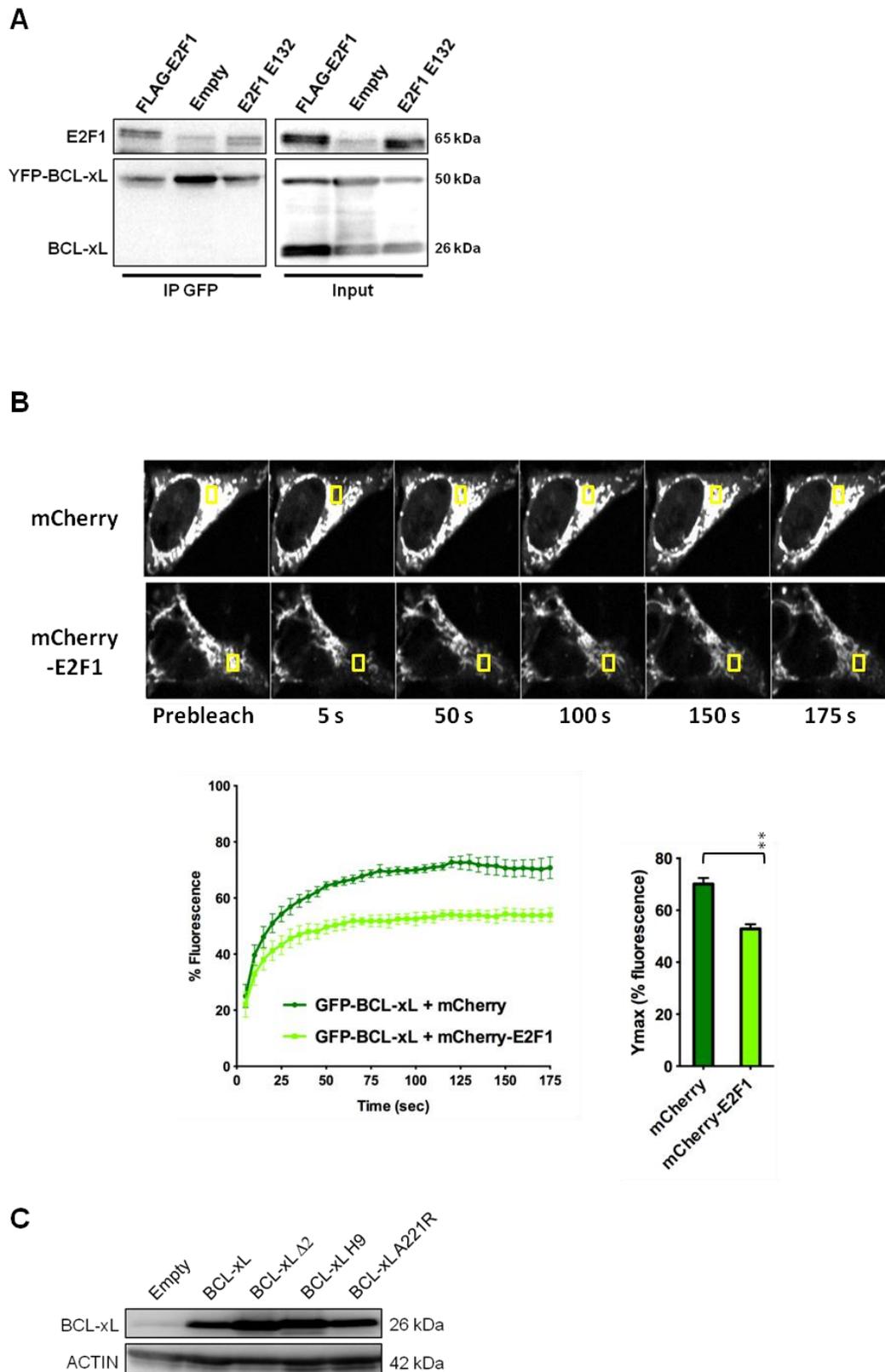


Figure S5.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: *E2F1 mediates etoposide-induced apoptosis and localizes to mitochondria in Saos-2 cells*

(A) Apoptotic signal induces E2F1 stabilization. Saos-2 cells were treated for 16h by 50 μ M etoposide or not (untreated) before western-blot analysis of E2F1 expression and PARP1 cleavage. (B) Etoposide induces apoptosis in E2F1 dependent manner. Saos-2 cells were transfected with control or E2F1 siRNA for 24h and treated as in (A) before cell death analysis by trypan blue staining. Western blot controlling the E2F1 siRNA extinction is inserted. Graph bars represent the average of biological triplicates and the error bars the S.E.M. (C) A fraction of E2F1 constitutively localizes to mitochondria. Untreated or etoposide-treated Saos-2 cells mitochondria were fractionated and equal amounts of total lysate versus mitochondrial fraction were analyzed by Western blot analysis for E2F1 and BCL-xL expression. COX IV and LAMIN A/C serve as fractionation controls. Data shown are representative of at least three independent experiments.

Figure 2: *Mitochondria targeted E2F1 induces apoptosis and enhances E2F1-induced apoptosis in response to genotoxic treatment*

(A) Ectopic E2F1 expression triggers apoptosis. Saos-2 cells were transfected with the indicated E2F1 expression vectors and treated or not with etoposide (50 μ M) for an additional 48h. Apoptosis was evaluated by Annexin V-APC staining among GFP positives cells using flow cytometry analysis. Graph bars represent the average of at least three independent experiences and the error bars show the S.E.M. (B) E2F1 triggers MOMP. MDA-MB231 cells stably expressing OMI-mCherry were transfected with the indicated expression vectors. 48 h post-transfection, cells were imaged with

ArrayScan High-Content Systems. Representative fluorescence microscopy images are shown. Arrows denote GFP transfected cells undergoing MOMP. Apoptotic rates, determined by flow cytometry analysis as described above, are indicated on the right. Graph bars represent the average of three independent experiences and the error bars show the S.E.M.

Figure 3: *E2F1 promotes mitochondrial apoptosis controlled by the BCL-2 family*

(A) E2F1 induced apoptosis in a BAK dependent manner. Saos-2 cells were transfected with control, BAK or BAX siRNAs. 24 h later, cells were transfected with the expression vectors coding for either GFP-E2F1, or OTC-GFP-E2F1 for 48h before cell death measurement as described in Figure 2A. (B) Mitochondria-targeted E2F1 promotes cell death activity induced by BAK or BH3-only activators overexpression. Saos-2 cells were co-transfected with expression vectors coding either for BAK or BH3-only activators (PUMA, BIM, tBID) and for GFP, GFP-E2F1 or OTC-GFP-E2F1 in a molecular ratio 3:1. 24 h later, cell death was analyzed as described in Figure 2A. The deficient activator PUMA 3A, carrying L141A D146A L148A substitutions in the BH3 domain was used as a negative control. (C) BCL-xL suppresses E2F1-induced apoptosis as a BH3-binding protein. Saos-2 cells were co-transfected with plasmids encoding the indicated anti-apoptotic proteins (BCL-xL or its R139D mutant, BCL-2 or MCL-1) and GFP, GFP-E2F1 or OTC-GFP-E2F1 in a molecular ratio 3:1. 24h later, cell death was analyzed as described in Figure 2A.

Figure 4: *E2F1 interacts with BCL-xL*

(A) E2F1 interacts with BCL-xL in a BH3-mimetic resistant manner. Endogenous BCL-xL was immune-precipitated from Saos-2 cells extracts treated or not with WEHI-539 (1 μ M for 24h) with anti-BCL-xL or negative control anti-GFP, then

endogenous E2F1 association was assessed by Western blotting. (B) E2F1 and BCL-xL interact as recombinant proteins. GST pull-down analysis was performed using GST-E2F1 and purified human BCL-xL. (C) E2F1 and BCL-xL interact in live cells. BRET saturation assay analysis was performed in MCF-7 cells using increasing amount of vectors encoding for YFP-BCL-xL or YFP-TM_{BCL-xL} in the presence of a fixed amount of the vector encoding RLuc-E2F1. BRET ratios are measured for every YFP-BCL-xL plasmid concentrations and are plotted as a function of the ratio of total acceptor fluorescence to donor luminescence. No BRET saturation curve was obtained using RLuc-E2F1 and YFP fused to the C-terminal transmembrane domain of BCL-xL (YFP-TM_{BCL-xL}) demonstrating the specific interaction between E2F1 and BCL-xL. The data were fitted using a nonlinear regression equation assuming a single binding site. Data are representative of at least three independent experiments.

Figure 5: BCL-xL mobility is decreased by E2F1 overexpression and it determines BAK-inhibition efficiency

(A) E2F1 stabilizes BCL-xL on mitochondria. MCF-7 stably expressing YFP-BCL-xL were transfected with the expression vectors coding for either mCherry, mCherry-E2F1, OTC-mCherry-E2F1 or mCherry-E2F1 E132. 16 h post-transfection, cells were photobleached in the yellow region of interest (ROI) and imaged every 5s (prebleaching and 5, 50, 100, 150s after photobleaching are shown). Fluorescence intensity was analysed within the ROI and normalized to 100% (corresponding to fluorescence intensity before photobleaching) as shown in corresponding curves. Graph bars presented in the histogram showed the maximal percentage of fluorescence recovered after the photobleaching as determined by the fitting using a one phase exponential equation. Data presented are means \pm S.E.M of four independent

experiments, corresponding to measure in at least 30 cells analyzed per condition. (B) BCL-xL variants that enhanced its mobility (BCL-xL D2 and -H9) inhibit BAK-mediated cell death more efficiently compared to BCL-xL. Saos-2 cells were co-transfected with plasmids encoding for the indicated BCL-xL variants together with YFP-BAK or YFP-BAX in a molecular ratio 3:1. 48 h later, cell death was analyzed as described in Figure 2A.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1: Related to Figure 1

A fraction of E2F1 constitutively localizes to mitochondria in HeLa and MCF-7 cell lines. One of three representative western blot analysis of E2F1 and BCL-xL localization in mitochondria and cytosol fractions of HeLa and MCF-7 cells (equal amount in micrograms of proteins). COX IV and LAMIN A/C served as markers of mitochondria and nuclei respectively.

Figure S2: Related to Figure 2

(A) Schematic of GFP-E2F1 constructs. GFP moiety was fused to the N-terminus of E2F1 in phase with the initiation codon. GFP-E2F1 E132 has L132E and N133F substitutions within the DNA binding domain that abrogate DNA binding and transcriptional activity. Mitochondrial targeting was achieved by fusing the prototypical mitochondrial import leader of ornithin transcarbamylase (OTC) to the N terminus of GFP-E2F1 (OTC-GFP-E2F1). (B) Western blot showing the expression levels from plasmids encoding GFP-E2F1, GFP-E2F1 E132, OTC-GFP-E2F1 and OTC-GFP-E2F1 E132 in Saos-2 cells. ACTIN was probed as a loading control. (C) Subcellular localization of GFP and OTC-GFP E2F1. Representative fluorescence microscopy image of Saos-2 cells transfected with the expression vectors coding either for GFP-E2F1 or

OTC-GFP-E2F1 (green) are shown. Mitochondria and nuclei were visualized using MitoTracker Red CMXRos probe (red) and Hoechst stain (blue) respectively. (D) GFP mitochondrial targeting with the OTC sequence does not induce apoptosis. Saos-2 cells were transfected with expression vectors coding either for GFP or OTC-GFP. 48h post-transfection, apoptosis was evaluated by flow cytometry for Annexin V-APC stained cells among GFP-positive ones. Data presented are means \pm S.E.M of three independent experiments. (E) E2F1 triggers caspase-3 activation. Flow cytometry analysis of cells transiently expressing GFP-E2F1 or OTC-GFP-E2F1 and stained using anti an active caspase-3-Alexa647 antibody. Data presented are means \pm S.E.M of three independent experiments. (F) Caspase inhibition protects cells from GFP-E2F1 and OTC-GFP-E2F1 induced apoptosis. Saos-2 cells were transfected with expression vectors for either GFP-E2F1 or OTC-GFP-E2F1 and treated or not with the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh (5 μ M) for 48h. Apoptosis was evaluated as described in Figure S2D. (G) Mitochondrial targeting of OTC-GFP-E2F1 lacks transcriptional activity. E2F1 transcriptional activities of Saos-2 cells transfected with expression vectors for either GFP, GFP-E2F1, mitochondrial targeted OTC-GFP-E2F1 or transcription-deficient GFP-E2F1 E132, were evaluated by RT-qPCR for E2F1 transcription target genes (TP73, BBC3, BCL2L11, HRK coding for TP73, PUMA, BIM and HARAKIRI proteins respectively). Results are depicted as normalized levels of interest mRNA compared to 3 housekeeping genes used as reference point.

Figure S3: Related to Figure 3

(A) Western blot controlling the BAK and BAX downregulation. Saos-2 cells were transfected with control, BAK or BAX siRNA for 2 before Western blot analysis for the indicated protein expression. (B) Western blot controlling ectopic expression of BAK, BIM, PUMA, PUMA 3A (PUMA L141A D146A

L148A) and tBID proteins in cells expressing GFP, GFP-E2F1 or OTC-GFP-E2F1. Saos-2 cells were co-transfected with plasmids encoding indicated proteins for 24h before Western blot analysis. ACTIN was probed as a loading control. (C) Transcription deficient E2F1 E132 acts synergically with BAK or BH3-only activator to induce apoptosis. Saos-2 cells were co-transfected with expression vectors for either BAK or BH3-only activator and GFP or GFP-E2F1 E132 in a molecular ratio 3:1. 24h later, cell death was evaluated as described in Figure S2F. (D) Western blot controlling the ectopic expression levels of BCL-xL, BCL-2, MCL-1 and BCL-xL R139D proteins. Saos-2 cells were co-transfected with plasmids encoding indicated proteins 24h before Western blot analysis. ACTIN was probed as a loading control.

Figure S4: Related to Figure 4

(A) E2F1-BCL-xL interaction in different cell lines. Endogenous E2F1 was immune-precipitated with anti-E2F1 antibody or irrelevant rabbit IgG in MCF-7, U251, HCT116 p21^{-/-}, BT549 and HeLa cells before immunoblot analysis E2F1 and BCL-xL. (B) BRET saturation curves between RLuc-E2F1 and YFP-BCL-xL R139D were performed as described in Figure 2A. Data presented are representative of independent experiments. (C) BRET saturation curves between RLuc-BAK and YFP-BCL-xL, YFP-BCL-xL R139D or YFP-TM_{BCL-xL} in MCF-7 cells were performed as described in Figure 2A. RLuc-BAK and YFP fused to the C-terminal transmembrane domain of BCL-xL were used as a negative control. Data presented are representative of independent experiments.

Figure S5: Related to Figure 5

(A) YFP-BCL-xL co-immunoprecipitates with E2F1. MCF-7 stably expressing YFP-BCL-xL were transfected with vectors encoding FLAG-E2F1 or E2F1 E132 mutant, before lysis and immunoprecipitation with an anti-GFP antibody and western-blot analysis with E2F1 and BCL-xL antibodies. (B) FRAP analysis of BCL-xL in MEFs cells. MEFs stably expressing GFP-BCL-xL were transfected with expression vectors for either mCherry or mCherry-E2F1. 16 post-transfection,

FRAP analysis was carried out as in Figure 5A. Data presented are means \pm S.E.M of independent experiments, corresponding to measure in at least 10 cells analyzed per condition. (C) Western blot controlling the ectopic expression levels of BCL-xL variants. Saos-2 cells were transfected with plasmids encoding indicated BCL-xL variants for 24 before Western blot analysis. ACTIN was probed as a loading control.

Thèse de Doctorat

Céline VUILLIER

Régulation de l'apoptose mitochondriale par E2F1

Implication de la localisation mitochondriale d'E2F1 et des interactions engagées avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Mitochondrial apoptosis regulated by E2F1

Involvement of the E2F1 mitochondrial targeting and interactions with the Bcl-2 Family anti-apoptotic members

Résumé

Le facteur de transcription E2F1 est une protéine versatile capable de réguler la progression du cycle cellulaire et la mort cellulaire par apoptose. Dans les tumeurs humaines, son activité est fréquemment dérégulée, conduisant à des effets oncogéniques ou suppresseurs de tumeur. Tandis que son action dans le cycle cellulaire requiert son activité transcriptionnelle, ses fonctions pro-apoptotiques n'en sont qu'en partie dépendantes. Mon travail de thèse se concentre sur le rôle apoptotique de cette protéine, indépendamment de son activité transcriptionnelle. Nos travaux ont mis en évidence une localisation mitochondriale constitutive d'E2F1. Son adressage directement à ce compartiment provoque une apoptose, indépendante de la transcription, impliquant l'effecteur Bak. De plus, la présence d'E2F1 aux mitochondries sensibilise les cellules tumorales à l'action pro-apoptotique des BH3-Only. Nos données indiquent qu'E2F1 engage des interactions avec des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 : Bcl-xL et Mcl-1 et régule négativement leur mobilité intracellulaire. Or la dynamique de ces protéines est nécessaire à leur rôle « pro-survie » ; par conséquent, E2F1 interfère avec leur potentiel anti-apoptotique. Ces données définissent un nouveau mécanisme d'action non transcriptionnel, par lequel E2F1 induit l'apoptose des cellules tumorales, en interférant avec l'activité des membres de la famille Bcl-2. Une pleine compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu pourrait permettre le développement d'approches modulant les fonctions d'E2F1 en faveur de son rôle suppresseur de tumeur pro-apoptotique sans pour autant induire son rôle oncogénique dépendant de la transcription.

Mots clés

E2F1, Famille Bcl-2, Apoptose

Abstract

Transcription factor E2F1 is an ambivalent protein, able to regulate either cell cycle progression or apoptotic cell death. In human tumors, E2F1 activity is frequently deregulated, leading to oncogenic or tumor suppressor roles. Whereas its cell cycle effects essentially rely on its transcriptional activity, its pro-apoptotic function may only partly result from the transactivation of cell death genes. This study focuses on the transcription independent pro-apoptotic functions of E2F1. Our data show that E2F1 is constitutively localized at the mitochondria. The direct targeting of E2F1 to this compartment leads to a Bak dependent apoptotic response without any cell death genes transactivation. Moreover, the increase of E2F1 at the mitochondria sensitizes tumor cells to the BH3-only mediated cell death. We discover an interaction between the transcription factor E2F1 and the anti-apoptotic members of the Bcl-2 family such as Bcl-xL and Mcl-1. The intracellular mobility of these proteins is important for their pro-survival role and E2F1 interferes with this property and decreases it. Our data argue that E2F1 exerts a novel, transcription independent, mitochondrial pro-apoptotic pressure by modulating especially the anti-apoptotic function of Bcl-xL. Molecular understanding of this effect would help design approaches that modulate E2F1 function in favor of apoptosis induction without promoting its transcription dependent oncogenic activity.

Key Words

E2F1, Bcl-2 Family, Apoptosis