

# Thèse de Doctorat

**Janic LE PEN**

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

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Biologie cellulaire  
Spécialité : Cancérologie  
Unité de recherche : U892

Soutenue le 12 décembre 2014  
Thèse N° :

## **Implication des voies de suppression tumorale p53 et E2F1 dans l'induction de la mort cellulaire en réponse à l'inhibition des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2**

### **JURY**

Rapporteurs : **Nathalie BONNEFOY**, DR2, INSERM  
**Joëlle WIELS**, DR1, CNRS

Examineurs : **Jean-Claude MARTINOU**, Professeur, Université de Genève  
**Claude SARDET**, DR1, CNRS

Directeurs de Thèse : **Frédérique BRAUN**, MCU, Paris Diderot  
**Laurent MAILLET**, CR, INSERM

## Remerciements

Je remercie chaleureusement Philippe Juin, pour m'avoir accueillie dans son équipe. J'ai apprécié ton implication, ton suivi régulier, et la facilité avec laquelle on peut discuter, à la ville comme à la scène. Merci également d'avoir soutenu mes départs pour présenter mes données en congrès internationaux, et de m'avoir conseillée et aidée pour la suite.

Je remercie également Frédérique pour m'avoir fait confiance depuis le M2, de m'avoir guidée dans mes premiers pas au laboratoire et jusqu'à maintenant. Tu as toujours été particulièrement disponible et engagée dans mon sujet, même après ton départ à la capitale. Grace à ta supervision, j'ai gagné en autonomie et en organisation. Merci donc d'avoir encadré ma thèse avec Laurent, avec patience du début à la fin. Laurent, tu as souvent permis d'élargir mon point de vue et mis le doigt sur des points à approfondir. Merci pour ton support et tes conseils pendant ces trois années.

Je souhaite également adresser mes remerciements Nathalie Bonnefoy et Joëlle Wiels qui ont accepté d'évaluer ce travail et d'en être rapporteurs, ainsi que Jean Claude Martinou et Claude Sardet pour avoir accepté d'être examinateurs. Merci également à Catherine Pellat, Flore Renaud et Christophe Blanquart pour les discussions enrichissantes lors de mes comités de thèse.

Je tiens bien évidemment à remercier l'ensemble de l'équipe 8. Travailler avec vous tous a vraiment été très agréable durant ces années, et j'espère pouvoir transporter cette bonne ambiance dans mes futurs labo. Et je ne peux commencer autrement qu'avec mes Nourdinettes! Bien sur, j'ai une pensée particulière pour Éloïse, avec qui j'ai partagé le M2 et la thèse, on a tout traversé ensemble, et même si on nous avait pas dit qu'il fallait écrire un manuscrit (sinon on n'aurait pas signé!), on l'a fait! Bon courage pour la dernière ligne droite, et j'espère qu'on aura l'occasion de se croiser dans un pub du Royaume-Uni, autour d'une pinte, même si t'es "toute petiiiiite"! Jessiiiiiiiiiiiiie! Que dire?! Une fois que tu es sortie de ton placard, on n'a pas pu t'arrêter, et nous côtoyer n'a pas été très bon pour ta santé mentale, visiblement! Merci pour tout, les secouages de fauteuils, les petits dessins de paillasse, les cadeaux kitch (j'ai pas dit mon dernier mot!)

et surtout tout le reste. Nos routes se recroiseront (de toute façon, on est PACSées!), et en attendant je compte sur toi pour maintenir l'esprit des Nourdinettes au labo! Bon courage pour cette dernière année. Ea, my little blue cheese, finding you, so sad for killing this baby beer, was really a crucial point upon my PhD! You became so much more than a lab'mate, and we have so many great memory together (and sometime, we haven't... :D ). Tak tak!!!! See you abroad, with Samouel! Après quelques mois pour sortir de ta coquille, Céline, tu as définitivement gagné ta place dans le module. Entre les moments de désespoir absolu ("mais qu'est-ce que je vais faiiiiiiiiiire?...") et l'enthousiasme complet ("on va danser?! on va danser?!), ta touche pétillante amène de la fraîcheur au labo. Ne t'inquiète pas, je suis sûre que tu vas tout déchirer ! Le reste de l'équipe n'est évidemment pas en reste! Soph', subtile mélange de rigueur scientifique, et d'une bonne vivante comme on en fait par chez nous en Bretagne! Des bonnes choses pour ta prochaine étape, on se verra là-bas. Audrey, tu t'es parfaitement t'intégrée dans cette ambiance de fou-fous! Bon courage pour la suite. Lucie, on ne s'est croisées que quelques mois mais j'espère que tu passeras autant de bons moments à Nantes que moi. Kévin, même si tu t'es fiancé avec ma PACSée, je te pardonne! Ta bonne humeur en toute circonstance et ton dynamisme sont vraiment agréables, au travail comme en dehors. J'espère de tout cœur que tu continueras un bout de chemin dans l'équipe, même si je t'aurais prévenu quand tu en auras marre de la thèse! Céline, la meilleure des eggs-manager! Même si tu n'as jamais voulu nous dire où aller te voir sur les planches, on a au moins connaissance de tes talents culinaires, avec ces délicieuses rillettes de saumon! Je te souhaite le meilleur pour la suite. Bien sur, une pensée aussi pour les anciens. Joséphine, je t'ai bien embêtée dans les premiers mois mais tu as su me passer le flambeau en douceur, avec patience! Merci d'avoir pris le temps de m'expliquer tout le fonctionnement du labo. Ta patte reste encore marquante dans l'équipe, ne serait-ce qu'à travers la Beer Session que tu as mise en place. Et bien entendu, pas de Nourdinettes sans Nourdine, notre présence masculine! Même si on a pas réussi à te faire accorder tes T-shirts avec tes caleçons, il faudra bien que tu admettes tes autres talents, et que tu fasses preuve d'optimisme, à la ville comme à la scène! Un clin d'œil pour nos ~~souffre-douleurs~~ stagiaires, et en particulier Thomas et son organisation légendaire, Stan' avec son bonnet et sa bonne humeur, jamais loin quand il s'agit de faire une pause potins, Ophélie qui a supporté Éloïse deux années de suite, toutes les Marions, ... Evidemment, il n'y a pas que des étudiants dans une équipe. Je remercie donc aussi

maman Cécile, tu manques au labo, et pas seulement pour tes gâteaux aussi bons que beaux! Plein de bonnes choses pour toute la famille. Fabien, dont la discrétion apparente n'a d'égale que la causticité des petites phrases ; de notre point de vue, c'est cool quand tu rates ton train, même si ça arrive de moins en moins. Merci à Sophie, pour les discussions, scientifiques ou non, et aussi pour la tolérance, même quand on fait (beaucoup) de bruit dans le module! Fred, merci pour tes éclats de rire qui ponctuent joyeusement les journées! Enfin, je remercie à nouveau Philippe, Fred et Laurent, car en plus d'être mes "superviseurs", vous êtes également des collègues auprès de qui il est agréable de travailler. Bref, merci à tous, pour cette ambiance si particulière, qui, *combinée* aux qualités scientifiques de chacun, nous tire vers le haut.

Bon, même si l'équipe 8 est définitivement la plus cool, certains ne sont pas trop mal non-plus dans les autres équipes! Merci à Vincent Mignard, les pauses-vidéos à ton bureau m'ont sauvée de la dépression à plusieurs reprises! Félicitation encore pour votre heureux événement, et bon courage pour la fin de ta thèse. Mazène, j'ai particulièrement apprécié discuter avec toi, de tout et de rien, mais toujours de façon très enrichissante. Bonne route, en te souhaitant le meilleur. Une pensée pour Meumeuh, qui vogue désormais sur des nouveaux flots. Ah, et un big-up au jeune-homme Shankar! Merci aussi à Carole, qui a -entre autre- veillé à ce que les trois garçons rentrent entier du Hellfest, ça n'a pas du être facile! Une bise à Élise, ce weekend éclé m'a fait un bien fou! Un grand merci aussi à Rym, Judith, Denis, Potiron, et toute l'équipe de cinéastes quasi-professionnels! Une pensée enfin pour le reste du personnel pour leur précieuse aide au quotidien. Je remercie enfin Stephen Manon qui m'a accueillie quelques semaines dans son groupe à Bordeaux et a pris le temps de m'initier au modèle levure.

Il n'y a pas que le labo dans la vie, alors merci aussi à toutes les tapettes à tong! Mention spéciale à maman Laurie bien-sur, qui a partagé avec moi plus de 3<sup>1/2</sup>ans Nantais, les mölkypéritifs, les hauts, les bas, et finalement le grand départ! Le meilleur pour toi! Caro, tu nous as rejoins en route, et c'est trop cool! Merci pour ces sorties culturelles, ces après-sorties-culturelles au bar, et ces retours d'après-sorties-culturelles sur ta terrasse... Dimanche Nantais Forever! J'en profite pour faire une bise à Rémi et Rico du Canotier, à la redoutable blonde du désert... Nantes, the place to be, alors un

coucou aux néo-Nantaises, Marion & Claire. Vous allez voir, c'est que du bonheur! Bien sur, la bise à Émilie et à Gaëlle, on aime aussi les non-nantaises! Enfin, bravo aux mecs qui supportent cette brochette de gonzesses... Merci aussi aux gens rencontrés sur place, Denis, Maud (on a quand même fais des trucs à nos sessions bricolages, hein!), Benoît,... Un bon Lorientais est un Lorientais en exil, alors un câlin à Sonia et ses cousines, Flo, Seb, et toute cette troupe de fous-furieux. Vous êtes des beaux malades! Une pensée pour les autres lorientais, des éclés au lycée, des multipax aux pirates, Elza coustrik et leurs copains, je ne vous citerais pas parce que vous êtes trop nombreux et que j'aurais peur d'en oublier! Bon vent à tous, et on se retrouvera au festival!

Nantes n'étant pas ma première étape, une bise à tous les gens que j'ai côtoyés pendant mes études, notamment à RENNES... Trois années magiques! Merci à Pierre-Jean (bien-sur!) pour ces ivresses matinales, cette redécouverte des internets, ces révisions acrobatiques (la pyramide de Maslow, b\*rdel!), toutes ces soirées *hallucinantes*, passées et à venir! Je me souviens encore de ton "salut, j'ai pas d'ami!" du premier jour de master, et grand bien t'en a pris! Courage pour ta dernière ligne droite, Dude! Les Curick, dès que vous en avez assez de pouponner, on pourra aller à St Mich' pour "juste une bière"! Marie, tu as fait mentir Wrob', et rien que ça, ça impose le respect... Plein de bonheur pour vous 2 3! Et puis comme le trinôme de choc était si parfait, un câlin bisounours (genre, 3 heures du mat') avec Marie et Caro... Les rédactions de compte rendu étaient longues, mais on rigolait quand même pas mal! Caro, on te pardonne le comic sans ms. Ma carebeer, qui m'a tant détestée avant de me connaître, j'ai hâte de retourner te voir dans tes contrées, même si y'a pas d'horizon! Un gros bisous, à toi, Seb, et au p'tit nouveau qui arrive bientôt. Bon, et comme cette promo déchirait quand même sérieusement, big-up, de façon non exhaustive, à Blandiiiiiiine, Anne-So', Marco, Guillaume, Thibaud (merci pour l'escapade suédoise!) et les autres! Ayant eu la chance de visiter le Merseyside pendant le master, j'ai une pensée pour tous les gens rencontrés là-bas. And especially Candia, of cours, you are my flatmate forever and more, and you are welcome in my place where/whenever it is! Bwah, you might pay me by cooking ;) !

On choisit ses amis, pas sa famille, mais j'ai la chance d'en avoir une extraordinaire (en beaucoup de points de vues!). Maman, Papa, vous avez fait du beau boulot avec cette fratrie. Merci pour ça, et tout le reste. Tanguy, tu m'apportes énormément, même si c'est parfois en s'engueulant! Mathieu, merci de m'avoir accueillie à Nantes, et même de m'avoir accueillie dans ta sacrée bande de potos quand j'en ai eu besoin. Des bisous à eux aussi. Mes frères, les tordus magnifiques, parfaits à leurs manières! La famille est proche mais large, alors une bise à vous tous, et particulièrement aux quelques-uns qui feront le déplacement, attendant sagement au fond de l'amphi jusqu'au pot de thèse... Marie-Andrée, pas d'inquiétude, je m'occuperai bien du "petit" d'1m80!

Last but not least, mille choses à dire, et peu de mots, pour le meilleur des doctors (oui, même au dessus de Matt Smith & David Tennant). Toi qui m'apporte tant, et qui a même supporté mes geignements pendant la rédaction sans broncher! Tout est simple et parfait depuis cette (presque) Saint-Patrick, alors merci l'Irlande, même si c'est en Écosse que notre route s'engage finalement... Tu vois, enfin, je l'ai finie, cette thèse!

---

## Table des matières

Remerciements.....	1
Table des matières.....	6
Table des figures.....	8
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>10</b>
<b>A. LA TUMORIGENÈSE.....</b>	<b>10</b>
1) GENERALITES.....	10
2) LES MECANISMES DE SUPPRESSION TUMORALE.....	14
a. <i>La régulation du cycle cellulaire.....</i>	<i>14</i>
b. <i>La régulation de la mort cellulaire.....</i>	<i>16</i>
<b>B. L'APOPTOSE.....</b>	<b>21</b>
1) GENERALITE.....	21
a. <i>Les caspases.....</i>	<i>21</i>
b. <i>Les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose.....</i>	<i>21</i>
c. <i>La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie.....</i>	<i>23</i>
2) LA FAMILLE BCL-2.....	25
a. <i>Structure des protéines de la famille Bcl-2.....</i>	<i>25</i>
b. <i>Mécanismes d'activation des pro-apoptotiques : exemple de Bax.....</i>	<i>27</i>
c. <i>Régulation de l'activation de Bax/Bak par la famille Bcl-2.....</i>	<i>29</i>
d. <i>Régulations de l'activation de Bax/Bak indépendamment de la famille Bcl-2.....</i>	<i>33</i>
e. <i>Régulation de la famille Bcl-2 par des modifications post-traductionnelles.....</i>	<i>34</i>
f. <i>Induction de l'apoptose par les BH3-mimétiques.....</i>	<i>35</i>
g. <i>Fonctions non-apoptotiques de la famille Bcl-2.....</i>	<i>37</i>
<b>C. SUPPRESSEURS DE TUMEUR.....</b>	<b>41</b>
1) LA VOIE PRB/E2F1.....	41
a. <i>Généralités sur les E2Fs.....</i>	<i>41</i>
b. <i>La protéine pRb, régulateur des E2Fs.....</i>	<i>43</i>
c. <i>Fonction principale de pRb/E2Fs: la régulation du cycle cellulaire.....</i>	<i>44</i>
d. <i>La voie pRb/E2F1 dans l'apoptose.....</i>	<i>45</i>
e. <i>Régulation par des modifications post-traductionnelles de la voie pRb/E2F1.....</i>	<i>46</i>
f. <i>Le clivage de pRb par les caspases.....</i>	<i>48</i>
g. <i>Rôle anti- ou pro-apoptotique de pRb.....</i>	<i>50</i>
2) LA VOIE P53.....	51
a. <i>Présentation générale de la famille p53.....</i>	<i>51</i>
b. <i>Régulation de p53.....</i>	<i>54</i>
c. <i>Rôle de p53 sur le cycle cellulaire.....</i>	<i>59</i>
d. <i>Régulation de la viabilité cellulaire par p53.....</i>	<i>59</i>
e. <i>Mutations de p53 et tumorigenèse.....</i>	<i>63</i>
<b>D. REGULATION DE LA FAMILLE BCL-2 PAR P53.....</b>	<b>67</b>
1) REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA FAMILLE BCL-2 PAR P53.....	67
2) INTERACTIONS DE P53 AVEC DES ANTI-APOPTOTIQUES.....	69
3) ACTIVATION DES PRO-APOPTOTIQUES EFFECTEURS.....	73
<b>E. OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>75</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>77</b>
<b>A. IMPLICATION DE LA VOIE PRB/E2F1 DANS LA REPONSE A L'ABT-737.....</b>	<b>78</b>

1- Article : "pRb/E2F-1-mediated caspase-dependent induction of Noxa amplifies the apoptotic effects of the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737" Bertin-Ciftci J, Barré B, <u>Le Pen J</u> , Maillet L, Couriaud C, Juin P, Braun F .....	80
<b>B. IMPLICATION DE LA VOIE P53 DANS LA REPONSE A L'ABT-737 .....</b>	<b>91</b>
1) P53 EST-IL IMPLIQUE DANS LA SENSIBILITE A L'ABT-737 ?.....	91
2) LA VOIE TRANSCRIPTIONNELLE DE P53 EST-ELLE IMPLIQUEE DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR L'ABT-737 ? .....	94
a. <i>L'induction de Noxa régule la sensibilité des HCT116 p21-/- à l'ABT-737 indépendamment de p53.</i> .	94
b. <i>Etude de l'activité transcriptionnelle de p53 en réponse à l'ABT-737</i> .....	96
a. <i>p53 est localisé au cytoplasme et au noyau mais sa localisation n'est pas modifiée sous ABT-737</i> ...	99
3) IMPLICATION DES FONCTIONS CYTOPLASMIQUES DE P53 INDEPENDANTES DE LA FAMILLE BCL-2? .....	100
a. <i>Régulation de l'autophagie par p53</i> .....	100
b. <i>Implication de l'ubiquitine-ligase Parkin</i> .....	102
c. <i>Contrôle de la dynamique mitochondriale</i> .....	104
4) EFFETS DE P53 SUR LE RESEAU D'INTERACTIONS DES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2 .....	105
d. <i>Influence de p53 sur les complexes Bax/Bcl-xL</i> .....	105
e. <i>p53 est nécessaire à la mort des cellules en absence des principaux anti-apoptotiques</i> .....	109
a. <i>Rôle de p53 dans l'activation de Bax</i> .....	110
b. <i>p53 participe à l'activation de Bax indépendamment de Puma</i> .....	113
a. <i>p53 interagit-il directement avec Bax ?</i> .....	115
2- Article : "The tumor suppressor p53 contributes to cell death induction in response to BCL-2/BCL-xL inhibition by transcription independent mechanisms" <u>Le Pen J</u> , Maillet L, Vuillier C, Gautier F, Juin P, Braun F .....	118
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>150</b>
<b>A. IMPLICATION DE LA VOIE PRB/E2F1 EN REPONSE A L'ABT-737 .....</b>	<b>151</b>
<b>B. IMPLICATION DE P53 DANS LA REPONSE A L'ABT-737 .....</b>	<b>154</b>
1) FONCTION TRANSCRIPTIONNELLE DE P53 LORS DE L'INHIBITION DE BCL-XL .....	155
2) INTERACTIONS DE P53 AVEC LES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2.....	156
3) IMPLICATION DES PROCESSUS CELLULAIRES MODULES PAR P53 DANS LA MORT INDUITE PAR ABT-737 .....	163
<b>C. CONCLUSIONS GENERALES .....</b>	<b>164</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>165</b>
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>189</b>
<b>A. LIGNEES CELLULAIRES ET TRAITEMENTS .....</b>	<b>189</b>
<b>B. TRANSFECTION SIRNA / PLASMIDES ET INFECTIONS .....</b>	<b>189</b>
<b>C. ANALYSE DE LA MORTALITE .....</b>	<b>191</b>
<b>D. ANTICORPS .....</b>	<b>191</b>
<b>E. WESTERN-BLOT.....</b>	<b>192</b>
<b>F. CO-IMMUNOPRECIPITATION .....</b>	<b>192</b>
<b>G. EXTRACTIONS MITOCHONDRIALES .....</b>	<b>193</b>
<b>H. PONTAGES COVALENTS .....</b>	<b>193</b>
<b>I. IMMUNO-CYTOCHIMIE .....</b>	<b>193</b>
<b>J. BRET .....</b>	<b>194</b>
<b>K. ACTIVITES LUCIFERASES .....</b>	<b>195</b>
<b>L. PCR QUANTITATIVE .....</b>	<b>195</b>
<b>M. ANALYSES STATISTIQUES .....</b>	<b>196</b>

---

## Table des figures

<b>Figure 1 : Les cellules du microenvironnement tumoral.....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 2 : Hétérogénéité des populations de cellules tumorales .....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 3 : Les principales caractéristiques du cancer comme cibles thérapeutiques.....</b>	<b>13</b>
<b>Figure 4 : principaux régulateurs du cycle cellulaire. ....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 5 : Les mécanismes de l'autophagie.....</b>	<b>18</b>
<b>Figure 6 : La régulation de la mort cellulaire par l'apoptose, l'autophagie et la nécrose....</b>	<b>20</b>
<b>Figure 7 : Les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 8 : La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie par les membres pro-apoptotiques effecteurs de la famille Bcl-2.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 9 : Structures des protéines de la famille Bcl-2.....</b>	<b>26</b>
<b>Figure 10 : Processus multi-étapes d'activation de Bax .....</b>	<b>28</b>
<b>Figure 11 : Les interactions sélectives entre membres de la famille Bcl-2 affectent différemment la survie cellulaire.....</b>	<b>30</b>
<b>Figure 12 : L'amorce des cellules, ou « priming », est particulièrement important dans le devenir cellulaire suite à un signal apoptotique. ....</b>	<b>32</b>
<b>Figure 13 : Structures des complexes Bcl-xL/Bad-BH3 et Bcl-xL/ABT-737. ....</b>	<b>36</b>
<b>Figure 14 : La famille Bcl-2, au cœur des mécanismes fondamentaux de la cellule. ....</b>	<b>40</b>
<b>Figure 15 : Les différents membres de la famille E2F et leurs caractéristiques .....</b>	<b>42</b>
<b>Figure 16 : Structure de pRb et interaction avec les E2Fs .....</b>	<b>43</b>
<b>Figure 17 : Rôles d'E2F1 dans l'apoptose.....</b>	<b>45</b>
<b>Figure 18 : Régulation d'E2F1 par pRb.....</b>	<b>47</b>
<b>Figure 19 : Les principales formes clivées de pRb.....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 20 : Structure de p53.....</b>	<b>51</b>
<b>Figure 21 : La famille p53, un réseau complexe de protéines .....</b>	<b>53</b>
<b>Figure 22 : L'ubiquitination de p53, au cœur du contrôle de sa stabilité .....</b>	<b>55</b>
<b>Figure 23 : Les voies de phosphorylation de p53 .....</b>	<b>56</b>
<b>Figure 24 : Les principales modifications post-traductionnelles de p53 .....</b>	<b>58</b>
<b>Figure 25 : Les principales fonctions de p53, transcriptionnelles ou cytoplasmiques.....</b>	<b>62</b>
<b>Figure 26 : Les mutations de p53 au sein des tumeurs .....</b>	<b>63</b>
<b>Figure 27 : Modèles des mécanismes d'action des p53 mutés .....</b>	<b>65</b>
<b>Figure 28 : p53 module transcriptionnellement la balance entre membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 .....</b>	<b>68</b>
<b>Figure 29 : Modélisation des interactions directes entre p53 et les membres de la famille Bcl-2 .....</b>	<b>72</b>
<b>Figure 30 : p53 participe à la sensibilité des HCT116 p21<sup>-/-</sup> à l'ABT-737 .....</b>	<b>92</b>

---

---

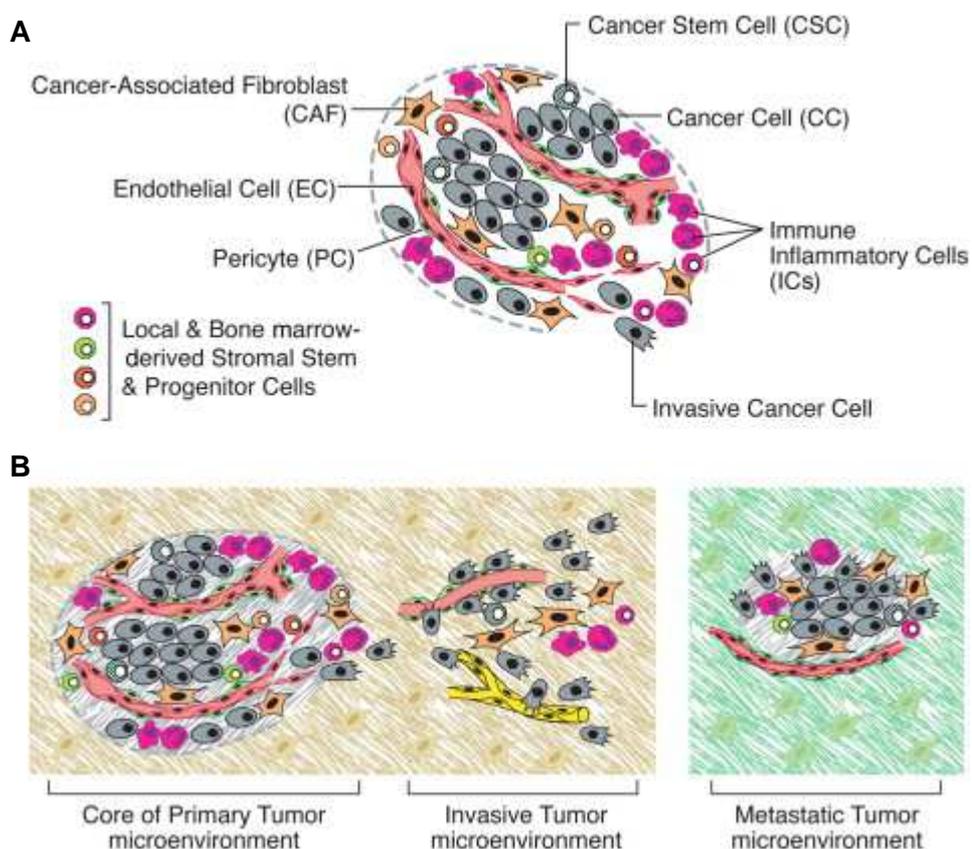
<b>Figure 31 : la stabilisation et la surexpression de p53 sont suffisantes pour sensibiliser les cellules résistantes à l'ABT-737</b> .....	93
<b>Figure 32 : L'induction de Noxa régule la sensibilité des HCT116 p21-/- à l'ABT-737 indépendamment de p53</b> .....	95
<b>Figure 33 : L'expression de Puma et de Bax n'est pas augmentée lors d'un traitement à l'ABT-737. Les HCT116 p21-/- sont traitées à 2µM d'ABT-737 pendant différents temps, avant western-blot (A) et qPCR (B), pour évaluer l'expression de Puma et Bax.</b> .....	96
<b>Figure 34 : La fonction transcriptionnelle de p53 n'est pas activé lors d'un traitement à l'ABT-737</b> .....	97
<b>Figure 35 : L'activité transcriptionnelle de p53 n'est pas requise pour la sensibilité à l'ABT-737</b> .....	98
<b>Figure 36 : localisation de p53 dans les HCT116 p21-/-</b> .....	99
<b>Figure 37 : implication de l'autophagie lors du traitement à l'ABT-737</b> .....	101
<b>Figure 38 : La Parkin ne semble pas impliquée dans la sensibilité à l'ABT-737 des HCT116 p21-/-</b> .....	103
<b>Figure 39 : L'inhibition de Drp-1 ne modifie pas la sensibilité à l'ABT-737</b> .....	104
<b>Figure 40 : p53 n'est pas requis pour la libération de Bax de Bcl-xL après traitement à l'ABT-737</b> .....	105
<b>Figure 41 : p53 ne modifie pas les propriétés du complexe entre rLuc-Bax et eYFP-Bcl-xL</b> .....	107
<b>Figure 42 : p53 favorise sensiblement la dissociation des complexes rLuc-Bax/eYFP-Bcl-xL par l'ABT-737</b> .....	108
<b>Figure 43 : p53 est nécessaire à la mort des cellules en absence des principaux anti-apoptotiques</b> .....	110
<b>Figure 44 : p53 est nécessaire à l'oligomérisation de Bax lors d'un traitement à l'ABT-737</b> .....	111
<b>Figure 45 : p53 est requis pour la relocalisation mitochondriale de Bax lors d'un traitement à l'ABT-737</b> .....	112
<b>Figure 46 : p53 est requis pour l'activation conformationnelle de Bax lors du traitement ABT-737 des HCT116</b> .....	113
<b>Figure 47 : La stabilisation de p53 sensibilise les cellules à l'ABT-737 en absence de Puma</b> .....	114
<b>Figure 48 : La stabilisation de p53 permet l'activation conformationnelle de Bax sous ABT-737, en absence de Puma</b> .....	115
<b>Figure 49 : Co-immunoprécipitation de Bax avec p53</b> .....	116
<b>Figure 50 : Boucle d'amplification de la réponse apoptotique par pRb/E2F1, permettant une sensibilisation tardive à l'ABT-737</b> .....	153
<b>figure 51 : p53 participe à la réponse à l'ABT-737 en favorisant l'activation du pro-apoptotique effecteur Bax, libéré de Bcl-xL par le BH3-mimétique</b> .....	162

---

## A. La tumorigenèse

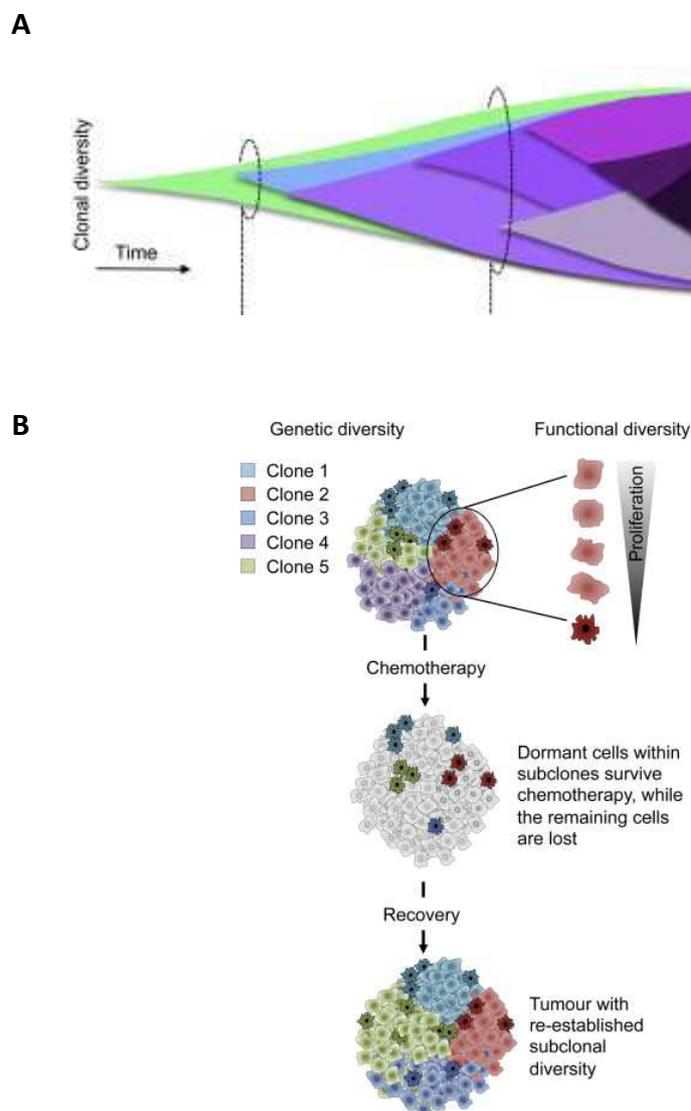
### 1) Généralités

La tumorigenèse est un processus multi-étapes, par lequel un tissu normal se transforme en tissu cancéreux, caractérisé par une multiplication incontrôlée des cellules. Dans le passé, une vision réductionniste présentait la tumeur comme un amas de cellules cancéreuses homogènes. Il est désormais clair que le tissu tumoral est un assemblage complexe du microenvironnement tumoral contenant des cellules saines et des populations cancéreuses, elles-mêmes hétérogènes (figure 1 ; Hanahan & Weinberg, 2011).



**Figure 1 : Les cellules du microenvironnement tumoral. (A)** Un assemblage de cellules de types distincts constitue les tumeurs solides qui soutiennent la croissance tumorale. Il s'agit de cellules d'origine cancéreuse (CC ou cellules souches cancéreuses CSC), et de cellules saines, en particulier les fibroblastes (CAF), des cellules endothéliales (EC), et des cellules de l'inflammation. **(B)** Les cellules du stroma tumoral créent une succession de microenvironnements particuliers, permettant la croissance de la tumeur primaire, l'invasion des tissus sains, ou encore l'implantation dans un site secondaire (d'après Hanahan & Weinberg, 2011).

Les cellules cancéreuses représentent une population hétérogène au sein du tissu tumoral. Au cours de la progression de la tumeur, l'hyper-prolifération des cellules couplée à l'instabilité génétique entraîne la formation de sous-populations clonales distinctes (figure 2A, Kreso & Dick, 2014). Ces sous-populations forment des régions histologiques démarquées au sein d'une seule tumeur, différentes en termes de prolifération, différenciation, vascularisation, inflammation, ou invasion. Un nombre grandissant d'études ont permis de mettre en évidence la présence d'une population particulière au sein des cancers, seule capable de promouvoir la croissance tumorale, les



**Figure 2 : Hétérogénéité des populations de cellules tumorales. (A)** L'acquisition de mutations favorables entraîne l'apparition de sous-populations cellulaires diverses au sein de la tumeur. **(B)** La survie de CSCs dormant après chimiothérapie peut suffire à la résurgence d'une tumeur aux populations diverses (d'après Kreso & Dick, 2014).

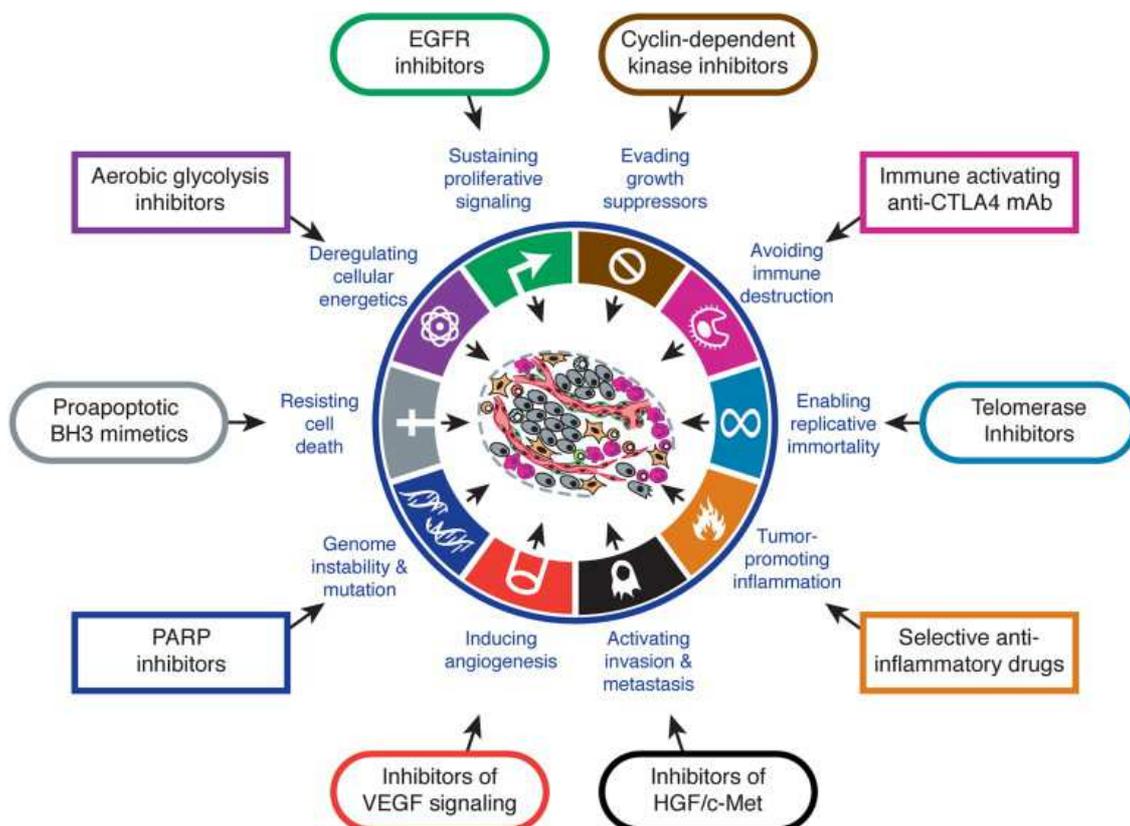
Cellules Souches Cancéreuses ou CSC. Du fait de la diversité des cellules au sein des tumeurs, les populations cellulaires ont des réponses différentes vis-à-vis des molécules thérapeutiques. Ainsi, les CSCs, en moins grand nombre, sont peu sensibles à ces traitements probablement du fait de leur quiescence au sein des tumeurs. Les CSCs peuvent de ce fait ré-établir une tumeur hétérogène après traitement (Kreso and Dick, 2014 ; figure 2B).

Au cours de la transformation des cellules cancéreuses, diverses modulations du microenvironnement peuvent favoriser le développement tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011). Lorsque la tumeur grossit, le milieu intratumoral est de plus en plus hypoxique, le niveau d'oxygène baisse. Les cellules cancéreuses produisent alors divers facteurs (VEGF, angiopoïétine,...) qui vont stimuler les cellules endothéliales quiescentes à proximité, permettant la construction de nouveaux vaisseaux sanguins. Ce phénomène de stimulation angiogénique permet l'alimentation de la tumeur en oxygène et nutriments, mais facilite aussi l'infiltration de cellules du système immunitaire en son sein. Les cellules de l'immunité permettent l'élimination des cellules cancéreuses, mais ces dernières peuvent corrompre le système immunitaire. En effet, l'installation d'un état inflammatoire chronique peut promouvoir la progression tumorale par l'intermédiaire de facteurs pro-angiogéniques, de facteurs de croissance favorisant la prolifération des cellules cancéreuses, de cytokines amplifiant l'inflammation ou encore d'enzymes de dégradation de la matrice facilitant l'invasion des tissus sains par la tumeur. Les cellules cancéreuses peuvent également recruter et activer des fibroblastes (alors appelés Cancer-Associated Fibroblastes ou CAF), en sécrétant divers facteurs comme le TGF- $\beta$ , PDGF, ou FGF2 (Kalluri & Zeisberg, 2006), ce qui favorise le remodelage de la matrice extracellulaire.

La formation du tissu tumoral complexe requière l'acquisition de capacités particulières communes à tous les processus cancéreux, conceptualisées par Hanahan & Weinberg (figure 3). Six capacités principales concourent au développement de la tumeur, en lui permettant de contrer l'ensemble des barrières de l'organisme : le maintien de voies de signalisations permettant aux cellules tumorales de proliférer, l'échappement aux inhibiteurs de croissance, la résistance à la mort cellulaire,

l'acquisition de l'immortalité répliquative, l'induction de l'angiogenèse, et l'activation des processus d'invasion et de métastase (Hanahan & Weinberg, 2000 ; figure 3). Une décennie plus tard, deux capacités émergentes sont ajoutées : la reprogrammation énergétique de la cellule cancéreuse, permettant le "switch métabolique" en un état de glycolyse anaérobie, et la résistance aux cellules de l'immunité (Hanahan & Weinberg, 2011). Les auteurs ajoutent également deux caractéristiques des tumeurs : une forte instabilité génétique des cellules cancéreuses et une inflammation chronique au niveau du tissu tumoral.

La classification de ces caractéristiques a permis la mise en place de stratégies thérapeutiques variées, ciblant chacune des caractéristiques identifiées. Toutefois, si le développement de ces thérapies a permis d'augmenter grandement la survie des patients sans rechute, le cancer reste une pathologie potentiellement létale. Les



**Figure 3 : Les principales caractéristiques du cancer comme cibles thérapeutiques.** Différentes stratégies thérapeutiques ont été développées pour cibler les principales caractéristiques des tumeurs. Les médicaments sont indiqués à titre d'exemples non exhaustifs (d'après Hanahan & Weinberg 2011).

mécanismes de résistances doivent être mieux compris, pour le développement de thérapies ciblées plus efficaces. Par ailleurs, les différentes caractéristiques ne sont pas si clairement démarquées en réalité, et de nombreux acteurs clefs de la tumorigenèse ont des rôles dans divers processus. En relation avec notre étude, Bcl-xL est notamment important dans la résistance à la mort cellulaire, mais également dans la prolifération, ou encore l'invasion (Yang *et al.*, 2011). Il est de ce fait nécessaire de comprendre les implications variées de ces acteurs ciblés par les thérapies, afin de mieux contrer les résistances ou les effets secondaires indésirables.

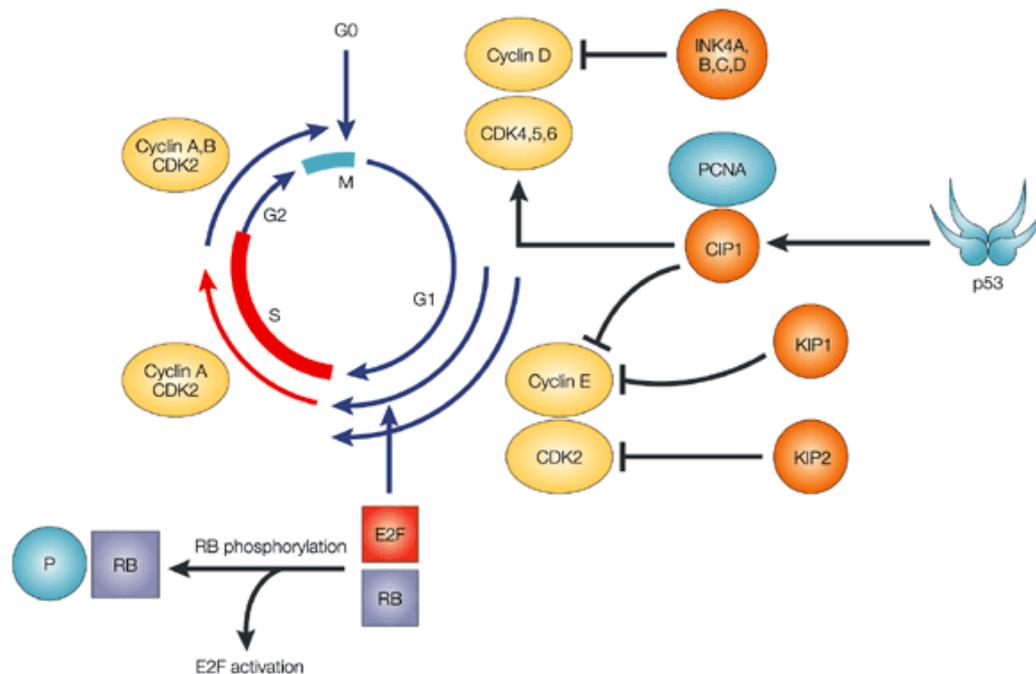
## **2) Les mécanismes de suppression tumorale**

Des mécanismes naturels existent pour contrecarrer le développement de tumeurs. Il s'agit en particulier du contrôle de la prolifération cellulaire permettant la réparation en cas d'apparition de dommages, ou du déclenchement de la mort cellulaire par divers processus. Le développement d'une tumeur résulte de l'échappement d'un certain nombre de cellules à ces mécanismes. Ces événements étant finement régulés, le déclenchement de tumeur est généralement lié à la mutation de gènes clefs, favorisant la survie, la prolifération cellulaire, et/ou l'acquisition des capacités communes aux cancers décrites ci-dessus (figure 3).

### *a. La régulation du cycle cellulaire*

Dans les conditions physiologiques, les cellules adultes sont pour une large majorité en quiescence, sans division cellulaire (G0, pour "Gap"). Des signaux mitogéniques internes ou externes entraînent le déclenchement du cycle cellulaire, soutenant la prolifération. Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases : La phase G1 permet la préparation à la duplication de l'ADN par la synthèse d'enzymes de réplication et l'accumulation de réserves énergétiques, la phase S, pour Synthèse, supporte la réplication de l'ADN permettant d'avoir deux copies identiques du génome, la phase G2 permet de vérifier la réplication correcte de l'ADN et de préparer l'entrée en mitose, et la phase M, pour Mitose, durant laquelle s'opère la division de la cellule et de son contenu en deux cellules filles. Le cycle cellulaire est étroitement régulé par les sérine-thréonine-kinases, appelées Cyclin-Dependent-Kinase ou CDK. En phosphorylant divers

substrats, elles permettent la progression dans les différentes phases du cycle (Malumbres & Barbacid, 2009). Les CDKs ne sont actives qu'en complexe avec leurs partenaires activateurs, les cyclines, qui ont une durée de vie courte et sont synthétisées uniquement à des moments spécifiques du cycle (figure 4). Les CDKs sont régulées par les CKIs (pour Cyclin-dépendant Kinase Inhibitor) dont le représentant majeur est p21/CIP1. Les suppresseurs de tumeurs, E2F1/pRb et p53, qui seront plus amplement détaillées en section C, sont des régulateurs du cycle cellulaire. En réponse à des dommages à l'ADN, p53 contrôle la transcription de p21/CIP1 et entraîne un blocage du cycle (Sperka *et al.*, 2012, confère section C2c). Les protéines de la famille E2F sont quant à elles activées après libération de pRb, suite à sa phosphorylation par des complexes cycline/CDK, permettant en retour la transcription des gènes de réplication nécessaires pour la phase S (Bracken *et al.*, 2004 ; confère section C1c). Certains membres de la famille Bcl-2 participent également à la régulation du cycle cellulaire, soulignant le lien entre la régulation du cycle cellulaire et le contrôle de la mort cellulaire (Braun *et al.*, 2013 ; confère section B2f).



Nature Reviews | Drug Discovery

**Figure 4 : principaux régulateurs du cycle cellulaire.** L'initiation et la progression des différentes phases du cycle sont régulées par les complexes cycline/CDK (jaune), eux-mêmes inhibés par les inhibiteurs de CDK ou CKI (orange). Les principales voies de suppresseurs de tumeurs, p53 et Rb/E2F, coordonnent le cycle cellulaire (d'après Nabel, 2002).

Le blocage temporaire du cycle en cas de dommages internes ou de problèmes suite à la réplication de l'ADN permet à la cellule de réparer ces altérations. Il s'agit du premier mécanisme de suppression tumorale par le contrôle stricte de la prolifération de cellules lésées.

### *b. La régulation de la mort cellulaire*

L'apparition de dommages trop importants que la cellule ne peut réparer peut entraîner la mort cellulaire par différents mécanismes (figure 7). Classiquement, la mort cellulaire est classée en deux processus : l'apoptose, très contrôlée et empêchant la réaction inflammatoire, et la nécrose, décrit comme accidentelle et provoquant l'inflammation. Des études plus récentes montrent qu'en réalité le processus nécrotique peut également être finement régulé, et est alors appelé « nécroptose » (Galluzzi *et al.*, 2012). L'autophagie, initialement décrit comme un mécanisme pro-survie, peut également conduire à la mort de la cellule (Galluzzi *et al.*, 2012).

L'apoptose, est un processus physiologique conservé au cours de l'évolution des eucaryotes pluricellulaires, qui sera détaillée en section B. Ce mécanisme, essentiel au cours du développement et pour la suppression tumorale, va entraîner la mort de la cellule via une machinerie organisée et complexe (Galluzzi *et al.*, 2012). Les premiers gènes contrôlant la mort cellulaire ont été découverts, dès les années 1980, par Robert Horvitz, travaillant sur le nématode *Caenorhabditis Elegans* (Ellis & Horvitz, 1986). Ses travaux sur l'apoptose lui vaudront le prix Nobel de physiologie/médecine en 2002. L'activation de senseurs aboutit à l'activation des Caspases, les protéines effectrices du démantèlement cellulaire. Leur activation est régulée d'une part par des récepteurs spécifiques à la surface des cellules appelés récepteurs de mort, et d'autre part par les protéines de la famille Bcl-2, détaillées en section B2, via la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. Les voies de suppression tumorale p53 et E2F1/pRb participent à la régulation de l'apoptose (Sperka *et al.*, 2012 ; confère section C). Morphologiquement, la cellule apoptotique se caractérise par une condensation de l'ADN, une fragmentation du noyau, et un bourgeonnement cellulaire conduisant à la formation de corps apoptotiques. La membrane plasmique garde son intégrité, mais expose la phosphatidylsérine, phospholipide habituellement présent sur le versant

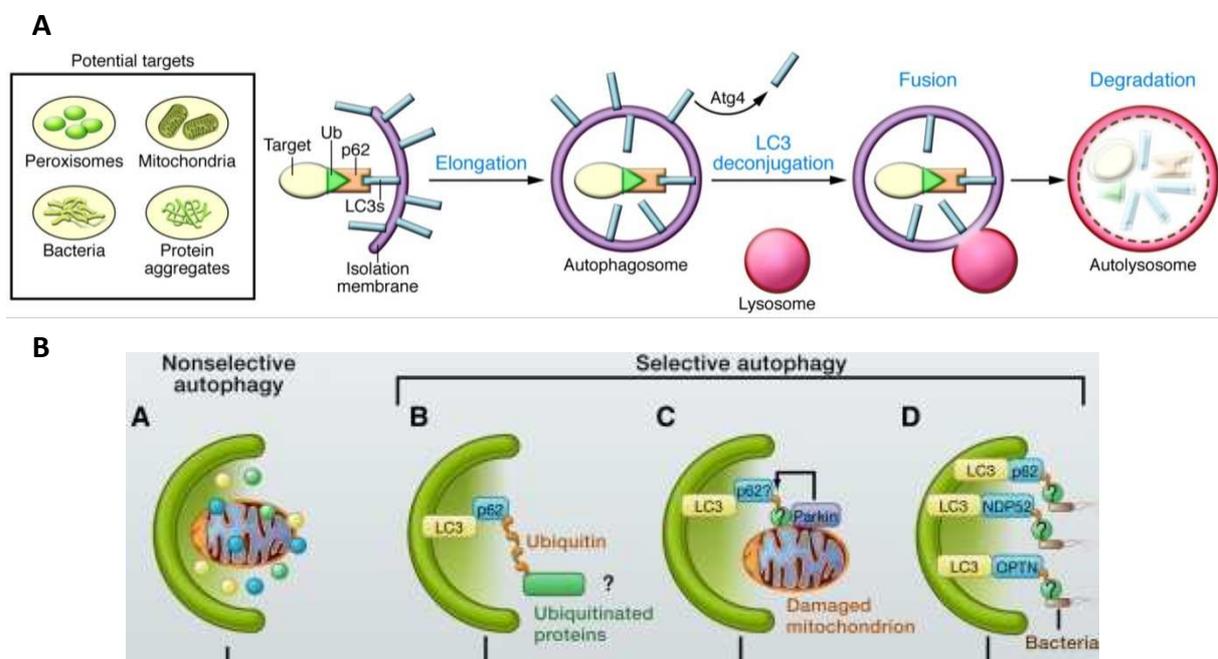
intracellulaire de la membrane. Ce signal permet le recrutement des macrophages, qui phagocytent les corps apoptotiques, limitant le déclenchement d'une réaction inflammatoire.

Les cellules nécrotiques sont quant à elles caractérisées par un gonflement des organelles et une augmentation du volume cellulaire, appelés *oncosis*, jusqu'à la rupture de la membrane plasmique, et la perte du contenu intracellulaire dans le milieu. *L'oncosis* est liée à des défaillances des voies de production d'énergie, pouvant résulter de divers stress : des agents toxiques, dommages à l'ADN, stress calciques ou encore infections par des pathogènes (Fink & Cookson, 2006). La nécrose a longtemps été considérée comme un incident cellulaire non régulé. Toutefois un nombre grandissant d'études décrit un déclenchement contrôlé de la nécrose, alors appelée « nécroptose » (Galluzzi *et al.*, 2012; Linkermann & Green, 2014). La nécroptose a été décrite initialement en réponse à un traitement au TNF en combinaison avec un inhibiteur pan-caspases. Avant cette étude, la mort cellulaire suite à un traitement au TNF était considérée comme résultant uniquement de l'activation des caspases par les récepteurs de morts, donc apoptotique. En fait, les récepteurs de mort peuvent également induire la mort de la cellule en absence d'activité des caspases, via l'activation de la protéine RIPK-1 (pour Receptor-Interacting Protein Kinase), qui s'associe avec RIPK-3 et forme le necroptosome (Linkermann & Green, 2014). Ce complexe entraîne *l'oncosis* et la nécrose, par des mécanismes moléculaires qui restent à explorer. La mort cellulaire nécrotique peut être avantageuse au sein de la tumeur, en soutenant un état inflammatoire chronique, lié à la fuite du contenu extra-cellulaire dans le milieu, mais aussi à l'activité pro-inflammatoire directe de RIPK-3 (Moriwaki & Chan, 2013). De plus, les cellules nécrotiques sécrètent des facteurs mitotiques, favorisant la prolifération des cellules voisines (Grivennikov *et al.*, 2010). Ainsi, tolérer un faible niveau de mort nécrotique pourrait avantager significativement le développement tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011).

L'autophagie est un processus décrit depuis une cinquantaine d'année, fortement conservé, observé dans les cellules de levures mais également chez la drosophile ou encore les cellules mammifères (Deter *et al.*, 1967; Juhász *et al.*, 2003; Takeshige *et al.*,

1992). L'autophagie est un processus de survie cellulaire en particulier dans les situations de carences nutritives. Ce processus permet aux cellules de recycler des protéines ou organelles endommagés du cytoplasme, afin de lui fournir un nouvel apport énergétique (Thorburn *et al.*, 2014). Toutefois, une autophagie excessive peut conduire à la mort cellulaire en dégradant des constituants essentiels de la cellule (Mathew *et al.*, 2007). Ce rôle pro-mort n'est toutefois observé que dans des conditions particulières, notamment dans les cellules présentant des déficiences dans les voies apoptotiques, soumises à des stress métaboliques prolongés (Levine & Kroemer, 2009).

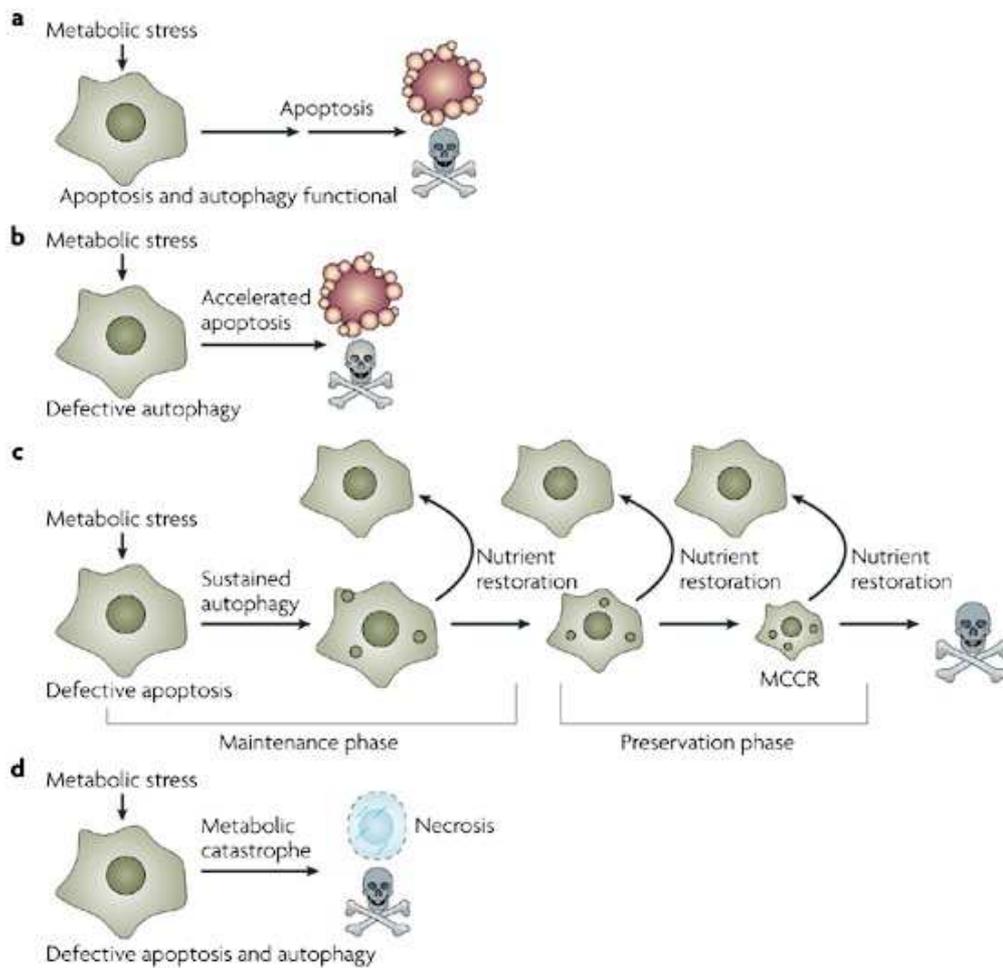
Le déclenchement de l'autophagie est contrôlé par l'activation du complexe sérine-thréonine-kinase ULK1, qui initie la formation des autophagosomes (Johansen & Lamark, 2011). L'expansion de la membrane autophagosomale est permise par un second complexe, contrôlé par la Beclin-1. Au cours de cette expansion, la protéine LC3 est conjuguée à un lipide phosphatidyl-ethanol-amine. Sa forme conjuguée LC3-II s'associe à la membrane d'isolement, et permet le chargement du contenu cytoplasmique (figure 5A). Cela peut se faire de façon non sélective, par la prise en



**Figure 5 : Les mécanismes de l'autophagie.** A Le LC3-II couplé à la membrane d'isolement peut s'associer à p62. La membrane fusionne, formant l'autophagosome, auquel fusionne le lysosome. L'autolysosome formé permet la dégradation des cibles et le recyclage des précurseurs macromoléculaires (d'après Till & Subramani, 2010). B L'autophagie peut se faire de façon non sélective, ou sélectivement via p62, qui recrute les cibles ubiquitynilées en se fixant à LC3 (d'après Mizushima & Komatsu, 2011).

charge au hasard du contenu cytoplasmique à proximité de l'autophagosome. Plus récemment, un mode de chargement sélectif a été mis en évidence, par l'intermédiaire de protéines d'échafaudage, comme p62, qui recrutent les cibles marquées par poly-ubiquitination et se lie à LC3-II (figure 5B). Les autophagosomes peuvent alors prendre en charge des protéines agrégées, mais également des peroxysomes, des mitochondries (on parle alors de mitophagie) ou encore des bactéries en cas d'infection. La membrane d'isolement fusionne alors, formant l'autophagosome complet. La fusion avec des lysosomes forme les autolysosomes, dont le contenu est dégradé. L'autophagie permet ainsi l'élimination d'éléments endommagés de la cellule et le nouvel apport d'énergie, limitant le déclenchement de l'apoptose. Une connexion entre l'apoptose et l'autophagie a été décrite au niveau moléculaire, les voies principales de contrôles de l'apoptose modulant l'autophagie. Ainsi, la protéine Beclin-1, qui participe à l'initiation de l'autophagie, est séquestrée par des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Maiuri *et al.*, 2007a). Les principales voies de suppressions tumorales p53 et pRb/E2F1 modulent également l'autophagie (Jiang *et al.*, 2010; Maiuri *et al.*, 2010).

Lorsque l'apoptose est défectueuse, comme c'est généralement le cas dans les tumeurs, l'autophagie protège les cellules, en éliminant des composés endommagés et fournissant un nouvel apport énergétique. Dans des conditions extrêmes de maintien du stress, on peut assister à une mort cellulaire liée à une autophagie excessive (Levine & Kroemer, 2009). Un défaut de l'autophagie accélère à l'inverse le déclenchement de l'apoptose, par l'accumulation de dommages. Lorsque l'apoptose et l'autophagie sont inhibées, le maintien des dommages peut entraîner le déclenchement de la nécrose, (Mathew *et al.*, 2007). Un taux modéré de nécrose peut soutenir la tumeur, en favorisant l'inflammation chronique et stimulant la prolifération des cellules voisines. Le contrôle des processus de mort cellulaire par les voies de suppression tumorale est donc particulièrement impliqué dans le développement des tumeurs (figure 6).



**Figure 6 : La régulation de la mort cellulaire par l'apoptose, l'autophagie et la nécrose (d'après Mathew *et al.*, 2007).**

## **B. L'apoptose**

### **1) Généralité**

L'apoptose aboutit au démantèlement cellulaire par les caspases, protéines effectrices du processus, détaillées ci-dessous. Les caspases peuvent être activées par des stimuli externes via des récepteurs de mort, ou à la suite de dommages internes via la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. Cet événement clef dans le devenir cellulaire est contrôlé par les protéines de la famille Bcl-2, décrites en section B2.

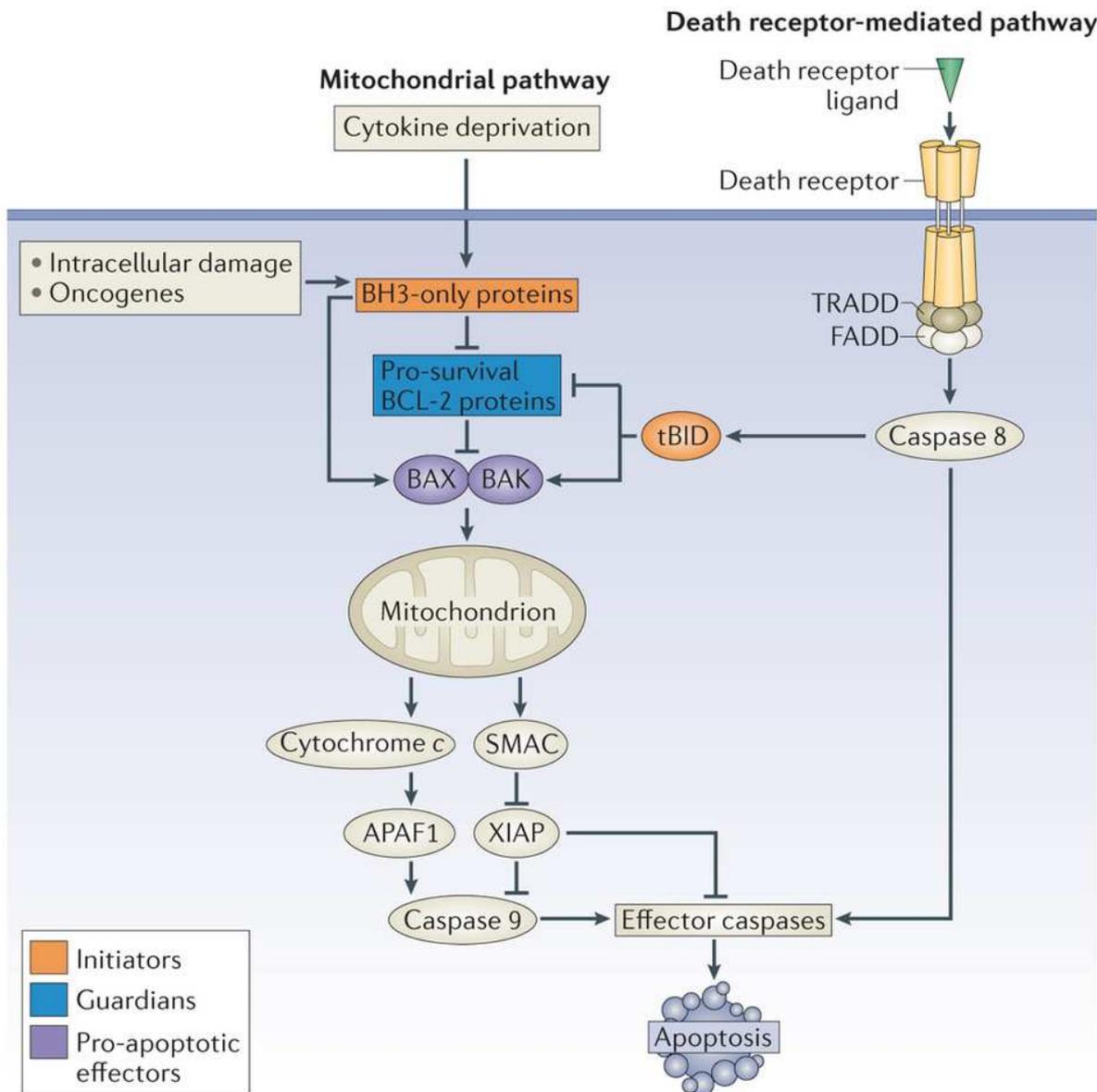
#### *a. Les caspases*

Au niveau moléculaire, le déclenchement de l'apoptose aboutit à l'activation en cascade des caspases ou Cysteinyl-ASPartate-cleaving proteases (Degterev *et al.*, 2003). Ces protéases à cystéines sont synthétisées dans la cellule sous forme de pro-caspases inactives, constituées d'un pro-domaine de deux sous-unités, une petite p10 et une grande p20. Le clivage de ces sous-unités permet la formation de l'enzyme active, constituée de deux hétérodimères p10/p20. Les caspases matures possèdent deux sites catalytiques, par lesquels elles vont identifier leurs substrats et les cliver de façon irréversible en C-terminal d'un résidu aspartate.

Lors du déclenchement de l'apoptose, les caspases-8 et -9 dites « initiatrices », vont s'auto-cliver permettant leur activation. Cela va conduire à une cascade d'activation de caspases aboutissant au clivage activateur de caspases dites « effectrices » (caspases-3, -6 et -7). Les caspases effectrices vont cliver de multiples substrats impliqués dans le démantèlement cellulaire, parmi lesquels PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase) ou la DNase CAD (Caspase Activated DNase) orchestrant la mort cellulaire programmée (figure 7).

#### *b. Les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose*

L'activation de l'apoptose peut se faire par deux voies, la voie intrinsèque, et la voie extrinsèque (figure 7).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 7 : Les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.** La voie intrinsèque est déclenchée lors de dommages internes, induisant une induction des protéines BH3-seuls. Elles inhibent leurs partenaires anti-apoptotiques, et activent Bax et Bak. Ces effecteurs pro-apoptotiques entraînent la perméabilisation de la mitochondrie, qui libère des facteurs pro-apoptotiques conduisant à l'activation des caspases effectrices. La voie extrinsèque est déclenchée suite à l'activation de récepteurs de mort, conduisant à l'activation en cascade des caspase. Ceci peut entraîner directement l'activation des caspases effectrices, ou déclencher la voie mitochondriale de l'apoptose par l'intermédiaire du clivage du BH3-seul Bid en tBid (d'après Czabotar et al., 2014).

La voie intrinsèque, ou mitochondriale, est déclenchée lors de stress internes à la cellule (dommages à l'ADN, oncogènes, stress métaboliques...). Ces stress aboutissent à une modulation des protéines de la famille Bcl-2, réparties en 3 groupes ; les anti-apoptotiques (notamment Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bfl-1), les pro-apoptotiques effecteurs (Bax et Bak), et les pro-apoptotiques BH3-seuls (Juin *et al.*, 2013 ; confère section 2). Le signal apoptotique permet l'activation des membres pro-apoptotiques effecteurs Bax et Bak, qui vont s'oligomériser à la membrane externe de la mitochondrie, entraînant sa perméabilisation appelée MOMP, pour Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization (Moldoveanu *et al.*, 2014). Des facteurs pro-apoptotiques sont alors libérés de l'espace inter-membranaire dans le cytoplasme. La protéine SMAC séquestre XIAP, un inhibiteur de la pro-caspase-9. D'autre part le cytochrome c forme l'apoptosome avec Apaf-1 et la pro-caspase-9. Celle-ci peut alors s'auto-activer par clivage, et activer en retour les caspases effectrices, conduisant au démantèlement cellulaire.

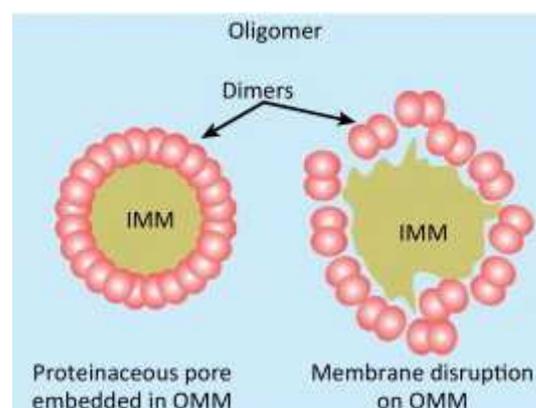
La voie extrinsèque est activée à la suite de signaux externes à la cellule, par l'intermédiaire de récepteurs de mort à sa surface. Ils appartiennent à la super-famille du TNF (Tumor Necrosis Factor), comprenant TNFR-1, Fas/CD95/Apo, DR4/TRAIL-R1, ou encore DR5/TRAIL-R2. La fixation d'un ligand va entraîner l'oligomérisation des récepteurs, rapprochant les domaines de mort (DD pour Death Domain), qui servent de plateforme pour la formation du complexe protéique DISC (Death Inducing Signalling Complex). La pro-caspase-8 est recrutée au sein de ce complexe, permettant son auto-activation (Thorburn, 2004). Cette caspase initiatrice va déclencher la cascade d'activation des caspases, jusqu'aux caspases effectrices. La voie extrinsèque peut également activer la voie mitochondriale de l'apoptose, via la protéine à BH3-seul Bid de la famille Bcl-2. En effet, la caspase-8 peut cliver Bid, dont le fragment C-terminal tBid se relocalise à la mitochondrie, et active l'effecteur Bak (Wei *et al.*, 2000). Ce croisement entre les deux voies permet une amplification rapide du signal de mort induit par les récepteurs.

### *c. La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie*

L'activation des protéines effectrices de la famille Bcl-2, Bax et Bak, aboutit à la formation de pores dans la membrane externe de la mitochondrie, conduisant à la libération de facteurs pro-apoptotiques permettant l'activation des caspases. L'étape de

perméabilisation constitue un événement clef dans le contrôle du devenir cellulaire. Le modèle proposé initialement impliquait le complexe VDAC (Voltage-Dependant Anion channel) dans la perméabilisation mitochondriale. L'interaction avec les pro-apoptotiques effecteurs activés faciliterait l'ouverture du complexe en un pore large, induisant le relargage du cytochrome c (Banerjee & Ghosh, 2004; Shimizu *et al.*, 2000). Dans ce modèle, Bax et Bak ne sont pas directement responsables de la perméabilisation mais modulent l'ouverture du pore VDAC. Un second modèle a émergé plus récemment, décrivant l'implication des pro-apoptotiques effecteurs eux-mêmes dans la formation du pore (Antonsson *et al.*, 2000; Epand *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2000). L'ajout de Bax permet la perméabilisation et le relargage de cytochrome c de liposomes et mitochondries isolées. L'étude en microscopie atomique montre que Bax peut s'insérer et l'oligomériser dans les bicouches lipidiques formant des pores, en absence d'autre facteur protéique. L'activation des effecteurs pro-apoptotiques Bax et Bak entrainerait donc leur dimérisation au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (processus décrit en section 2c). Ce sont les oligomères de protéines effectrices qui forment directement le pore, entraînant la fuite du cytochrome c et l'activation des caspases.

La façon dont les dimères de Bax ou Bak vont perforer la membrane externe de la mitochondrie reste controversée (Moldoveanu *et al.*, 2014 ; figure 8). Des éléments biochimiques suggèrent l'association de dimères via les hélices  $\alpha_6$ , l'oligomère obtenu formant un pore protéique dans la membrane externe de la mitochondrie (Bleicken *et*



**Figure 8 : la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie par les membres pro-apoptotiques effecteurs de la famille Bcl-2.** Bax et Bak activés (rouge) s'assemblent en dimères perméabilisant la membrane externe de la mitochondrie, en formant des larges oligomères (pore protéique), ou en perturbant localement la membrane lipidique (pore lipidique) (d'après Moldoveanu *et al.*, 2014).

*al.*, 2010). Une autre possibilité est que les faces exposées des hélices  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$  des dimères, à fort taux d'acides aminés aromatiques, s'accolent à la surface de la membrane externe de la mitochondrie. L'insertion de ces résidus entre les têtes des lipides peut alors engendrer des tensions et courbures qui pourraient entraîner la formation de pores lipidiques (Czabotar *et al.*, 2013a). Une hypothèse intermédiaire, dans laquelle de larges oligomères protéiques des pro-apoptotiques effecteurs entraînent des perturbations lipidiques, n'est pas à exclure.

La perméabilisation mitochondriale est généralement vue comme un point de non-retour dans le devenir cellulaire, étant un événement clef du déclenchement de l'apoptose. Toutefois, une équipe a mis en évidence la persistance de mitochondries intactes lors du déclenchement de la perméabilisation par la famille Bcl-2 (Tait *et al.*, 2010). Plusieurs lignées traitées à l'actinomycine D, le Tumor Necrosis Factor, la staurosporine ou irradiées aux UV ont une population de mitochondries non perméabilisées. L'absence de perméabilisation est associée à l'absence de Bax activé sur ces mitochondries. Ce défaut d'activation des effecteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 serait lié à un niveau élevé de leurs partenaires anti-apoptotiques sur cette fraction de mitochondries, les protégeant de la perméabilisation. Le petit nombre de mitochondries intactes est suffisant à reformer un réseau mitochondrial complet, nécessaire à la survie cellulaire.

## 2) La famille Bcl-2

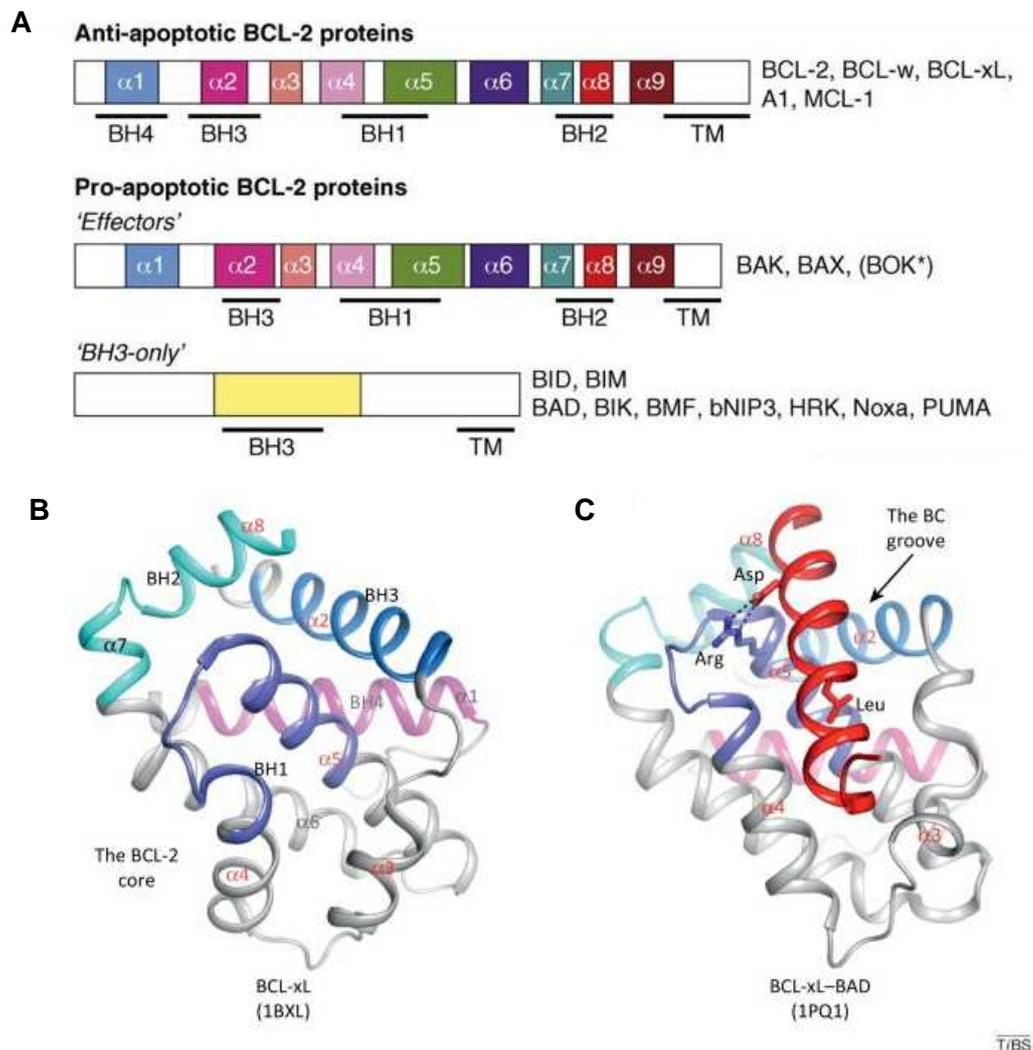
### *a. Structure des protéines de la famille Bcl-2*

Les protéines de la famille Bcl-2 sont des acteurs clefs de la mort cellulaire programmée, que ce soit par la voie intrinsèque, lors de stress internes, ou par la voie extrinsèque, lors de l'activation de récepteurs de mort à la surface des cellules, par l'intermédiaire de la protéine Bid. Les membres de la famille Bcl-2 sont séparés en trois groupes fonctionnels, qui diffèrent également de par leur structure globale (Chipuk & Green, 2008 ; Juin *et al.*, 2013).

La première classe, qualifiée d'anti-apoptotique, est constituée principalement de Bcl-2, le premier membre de la famille identifié, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, Bcl-2L10, et Bcl-2A1/BFL1. Ces protéines comportent 4 domaines d'homologie, désignés BH1 à BH4

pour Bcl-2 Homology (figure 9A). Elles sont caractérisées par un repliement en une structure très conservée, consistant en deux hélices centrales, majoritairement hydrophobes, empaquetées dans 6 à 7 hélices amphiphiles, formant une poche hydrophobe au niveau des domaines BH1-2-3 (figure 9B ; Petros *et al.*, 2004).

Le second groupe est constitué des protéines pro-apoptotiques à multi-domaines, ou pro-apoptotiques effectrices, principalement Bak et Bax. Ces protéines ne comportent



**Figure 9 : Structures des protéines de la famille Bcl-2. (A)** Les anti-apoptotiques, principalement Bcl-2, Bcl-xL, et Mcl-1, sont composés de 4 domaines d'homologie, appelé BH1-4. Les pro-apoptotiques effectrices à multidomaines, principalement Bax et Bak, comportent les BH1-3. Les BH3-seuls sont structurellement très variés, mais comportent une région conservée, le domaine BH3 (d'après Chipuk & Green, 2008). Représentation en ruban de Bcl-xL seul **(B)** ou avec le BH3 de Bad en rouge, enchâssé dans la poche hydrophobe **(C)**; les domaines BH1-2-3 sont identifiés en nuances de bleu et le BH4 en arrière plan en rose (d'après Moldoveanu et al., 2014). TM Trans-Membranaire

que les BH1-2-3, mais ont une structure très proche de leurs homologues anti-apoptotiques, avec une poche hydrophobe. Suite à un processus d'activation multi-étapes (détaillé en section B2b), ces protéines s'oligomérisent au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, conduisant à sa perméabilisation. Cette étape conduit à la libération de facteurs pro-apoptotiques conservés dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, particulièrement le cytochrome c. Pour contrer ceci, les protéines anti-apoptotiques empêchent l'activité des protéines effectrices, en séquestrant le BH3 des pro-apoptotiques dans leur poche hydrophobe.

Enfin, le troisième groupe comprend les protéines pro-apoptotiques appelées les BH3-seuls car elles sont caractérisées par la présence du seul domaine BH3. En dehors de cela, les protéines sont variées et généralement peu structurées. Ces protéines interagissent via leur domaine BH3 avec la poche hydrophobe des homologues anti-apoptotiques, entraînant la libération de Bax et Bak (figure 9C). Il s'agit dans ce cas de protéines BH3-seuls sensibilisatrices. Certaines BH3-seuls, alors appelées activatrices, peuvent également interagir directement avec Bax et Bak, et permettre leur activation (confère section B2b).

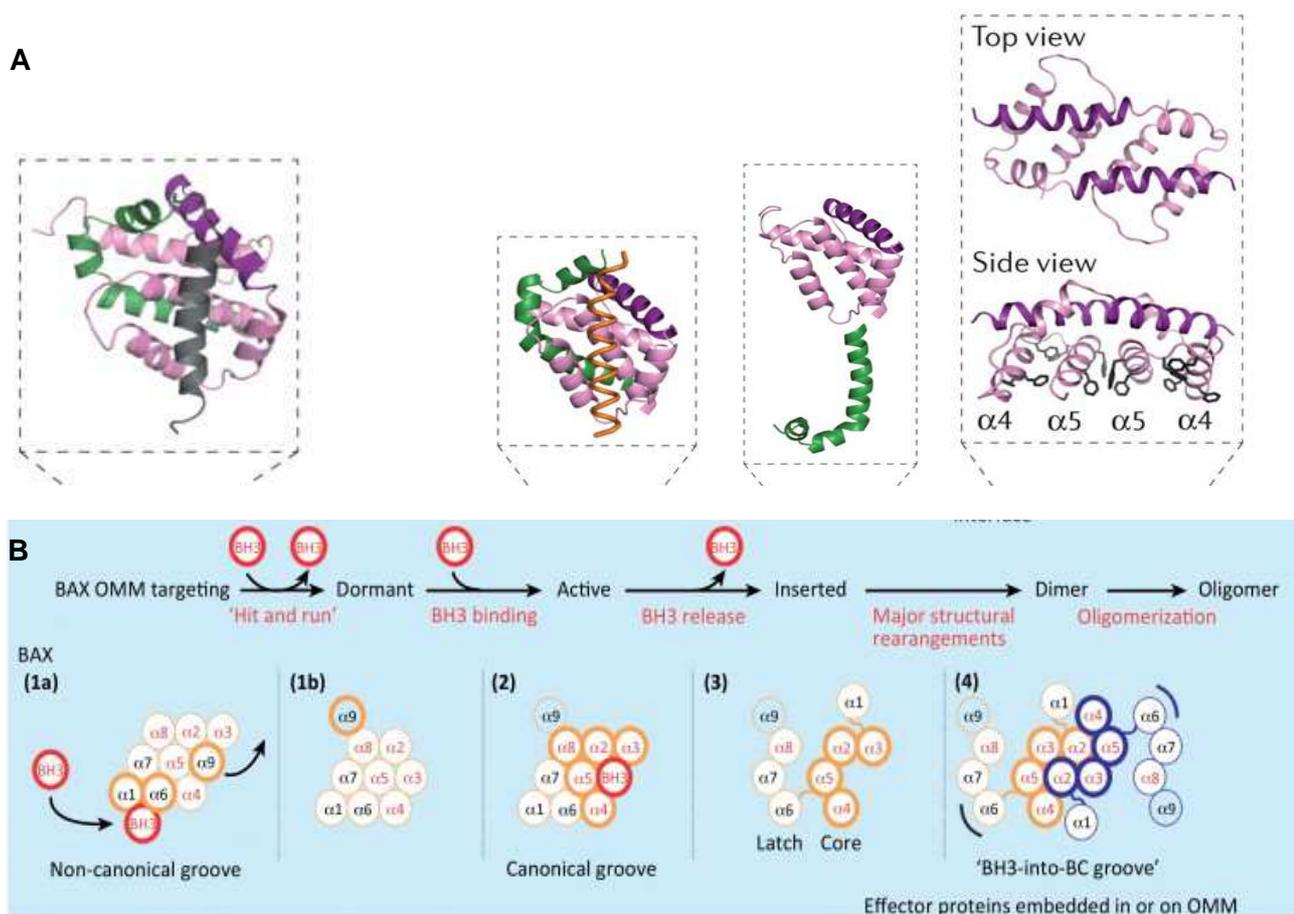
Les interactions entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont particulièrement importantes pour le déclenchement de la perméabilisation mitochondriale, et donc le devenir cellulaire (détails en section B2c).

#### *b. Mécanismes d'activation des pro-apoptotiques : exemple de Bax*

Sous sa forme inactive, Bax est replié sur lui-même, son hélice C-terminale  $\alpha 9$  enchâssée dans la poche hydrophobe, constituée des hélices  $\alpha 2$  à  $\alpha 5$  (figure 10A ; Suzuki *et al.*, 2000). Cette forme, majoritairement cytosolique est appelée CLIC, pour Cytosolic Locked In Conformation (Lalier *et al.*, 2007). Lors d'un stress apoptotique, la protéine Bax subit un processus multi-étapes conduisant à une conformation active insérée dans la membrane de la mitochondrie, appelée CLAC pour Cytochrome c Liberation Associated Conformation (figure 10-4).

Les BH3-seuls activateurs Bim, tBid et Puma, sont capables d'interagir avec le domaine non-canonique des effecteurs au niveau des hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 6$  (figure 10-1a Gavathiotis *et al.*, 2008). Des mécanismes allostériques induisent alors un premier

réarrangement conformationnel (figure 10-1b). L'hélice  $\alpha 9$  est dégagée de la poche hydrophobe, par une rotation autour du résidu P168, et s'insère dans la membrane externe de la mitochondrie. Bien que mitochondriale, cette forme de Bax est considérée comme dormante, car ne permet pas en l'état d'induire le MOMP. La poche hydrophobe étant libérée, elle peut interagir avec les BH3-seuls (Czabotar et al., 2013a). Le domaine BH3 s'insère dans la poche de Bax via 5 domaines hydrophobes  $h_{0-4}$  (BH3 de Bid : I82/I83, I86, L90, V93, et M97 respectivement), et un pont salin au niveau de l'extrémité C-terminale de l'hélice  $\alpha 4$  de Bax, sur le résidu R109 (résidu D95 de Bid). Ces



**Figure 10 : Processus multi-étapes d'activation de Bax.** La conformation CLIC de Bax est cytoplasmique. L'engagement avec un BH3-seul activateur au niveau des hélices  $\alpha 1$ - $\alpha 6$  entraîne une rotation de l'hélice 9, qui dégage la poche hydrophobe et s'enchâsse dans la membrane mitochondriale (1). L'interaction d'un BH3-seul dans la poche (2) entraîne un changement de conformation en un domaine loquet (latch) et un cœur globulaire (core) (3/4). Un réarrangement conformationnel permet la formation de dimères symétriques CLAC, le BH3 de chaque Bax s'insérant dans la poche de son partenaire (5). La structure de Bax est représentée en ruban **(A)** ou en schématisant les différentes hélices **(B)** (d'après Carbozar *et al*, 2014 et Moldoveanu *et al*, 2014 respectivement).

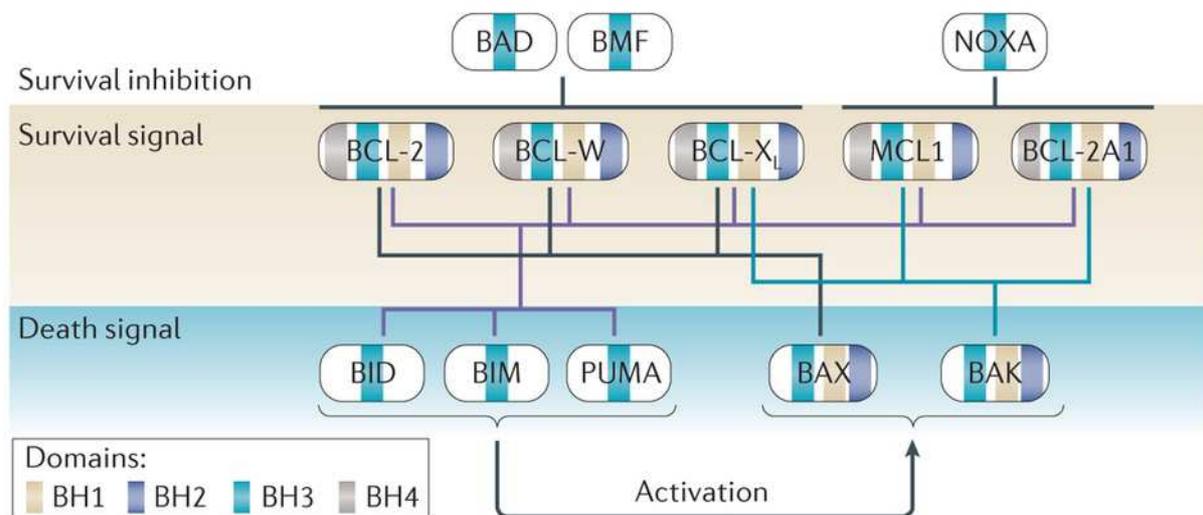
interactions entraînent d'une part le dépliement de Bax en un cœur globulaire (hélices  $\alpha 1$ - $\alpha 4$ ) et un domaine « loquet » (hélices  $\alpha 5$ - $\alpha 9$ ), et d'autre part la sortie du domaine BH3 de Bax (hélice  $\alpha 2$ ) de son cœur (figure 10-3). L'hélice  $\alpha 2$  alors libérée - correspondant au domaine BH3 de Bax- va pouvoir se ficher dans la poche hydrophobe d'un autre Bax en conformation active, formant un dimère symétrique, correspondant à la forme CLAC (figure 10-4). Il est à noter que l'interaction des BH3-seuls avec les anti-apoptotiques ne provoque pas de décalage du domaine BH3 des anti-apoptotiques. Cette différence pourrait résulter du fait que Bax comporte 2 acides-aminés de moins entre l'hélice  $\alpha 2$  et l'hélice  $\alpha 3$  que les protéines pro-survies, et/ou que les résidus des pro-apoptotiques impliqués dans le domaine hydrophobe  $h_3$ , sont plus volumineux que ceux des anti-apoptotiques (isoleucine et alanine respectivement). Par ailleurs, la surface d'interaction des hélices  $-\alpha 1$  et  $-\alpha 6$  avec les BH3-seuls n'est pas retrouvée sur les protéines anti-apoptotiques. Ceci peut être lié au fait que l'hélice- $\alpha 1$  des membres anti-apoptotiques constitue le domaine BH4, absent des effecteurs pro-apoptotiques (Chipuk & Green, 2008).

Ce modèle d'activation nécessite que Bax interagisse en deux temps avec les BH3-seuls activateurs, d'abord sur le site non-canonique au niveau des hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 6$ , puis dans de la poche hydrophobe. Cette séquence d'événements permet un niveau de contrôle supplémentaire verrouillant l'activation du pro-apoptotique effecteur. Contrairement à Bax, Bak est localisé constitutivement à la mitochondrie sous sa forme dormante, via son hélice  $\alpha 9$ . Toutefois, hormis la première étape de changement de conformation via la liaison d'un BH3-seul aux hélices  $\alpha 1$ - $\alpha 6$ , non nécessaire sur Bak, les processus d'activation de Bax et Bak sont relativement semblables (Brouwer *et al.*, 2014; Moldoveanu *et al.*, 2014). La formation d'hétérodimères de Bax et Bak est possible, mais les homodimères sont majoritairement représentés dans les cellules apoptotiques (Dewson *et al.*, 2012).

### *c. Régulation de l'activation de Bax/Bak par la famille Bcl-2*

Le réseau d'interactions des protéines de la famille Bcl-2 module l'activité de Bax et Bak et le déclenchement du processus apoptotique. Les pro-apoptotiques effecteurs sont séquestrés via leur BH3 dans la poche hydrophobe des anti-apoptotiques, empêchant leur oligomérisation à la membrane externe de la mitochondrie (Juin *et al.*,

2013). Le maintien de ces complexes est donc requis pour la survie cellulaire (figure 11). Si Bcl-xL peut inhiber les deux pro-apoptotiques effecteurs, Bcl-2 et Bcl-w ne peuvent séquestrer que Bax, alors que Mcl-1 et Bcl-2A1/Bfl-1 n'interagissent qu'avec Bak. Il a par ailleurs été montré que d'une part Bcl-xL se lie préférentiellement au Bax activé, et d'autre part la liaison d'un Bax inactif à Bcl-xL peut favoriser un changement de conformation du pro-apoptotique facilitant l'exposition de son BH3 (Gautier *et al.*, 2011). Ainsi, au-delà de la simple séquestration de Bax, Bcl-xL favorise son maintien sous sa conformation active, la cellule disposant alors d'une fraction de Bax actif, rapidement disponible. Bcl-xL joue également un rôle sur la localisation de Bax, favorisant sa rétrotranslocation au cytoplasme (Edlich *et al.*, 2011; Todt *et al.*, 2013). L'équipe du docteur Youle a montré par des expériences de microscopie dans le modèle colorectal HCT116 que Bcl-xL s'insère à la mitochondrie par son hélice C-terminale, interagit avec le BH3 de Bax dans sa poche hydrophobe à la mitochondrie et entraîne sa rétrotranslocation au cytoplasme. Ce mécanisme empêche l'accumulation de Bax à la



**Figure 11 : Les interactions sélectives entre membres de la famille Bcl-2 affectent différemment la survie cellulaire.** En absence des anti-apoptotiques, l'expression de Bax/Bak met en péril la cellule. Les BH3-seuls Bid, Bim, ou Puma, exprimés en parallèle, peuvent interagir avec Bax/Bak et les activer (signal de mort). L'interaction des anti-apoptotiques avec ces différents pro-apoptotiques prévient la survenue de ces événements, maintenant la survie cellulaire (signal de survie). Les BH3-seuls sensibilisateurs, en interagissant avec les anti-apoptotiques, inhibent ces signaux de survie (inhibition de survie). En absence des anti-apoptotiques, ils ne présentent pas d'activité pro-apoptotique (d'après Juin *et al.*, 2013).

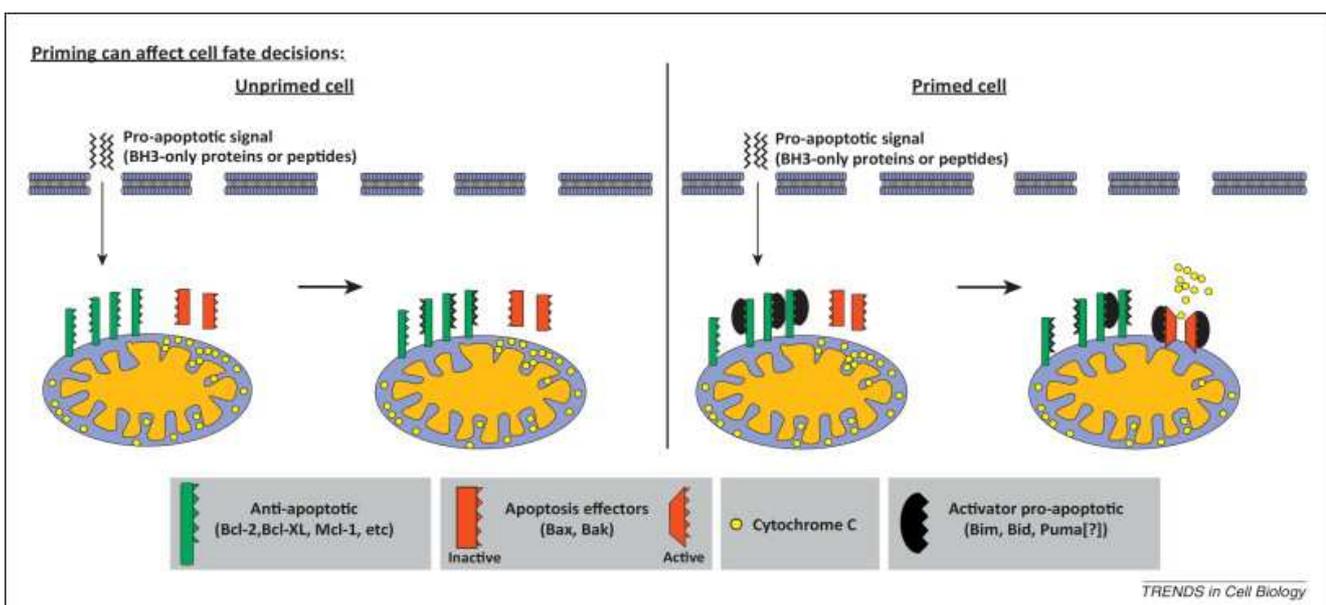
mitochondrie des cellules saines, pouvant conduire à son auto-activation. Les relations entre pro- et anti-apoptotiques sont donc plus complexes que la simple séquestration.

Les protéines BH3-seuls sont des régulateurs clefs de l'activité des pro-apoptotiques à multi-domaines. Les BH3-seuls sensibilisateurs, comme Bad, Bmf ou Noxa, régulent les complexes entre les anti-apoptotiques et leurs partenaires pro-apoptotiques, en entrant en compétition pour l'interaction au niveau de leur poche hydrophobe. Ils déplacent ainsi les autres membres pro-apoptotiques, qu'il s'agisse des effecteurs Bak et Bax, ou des BH3-seuls activateurs. Ainsi l'induction de Noxa entraîne le déplacement de l'activateur Puma de Mcl-1, conduisant à l'activation de Bax et au déclenchement de l'apoptose (Nakajima & Tanaka, 2011). Ces BH3-seuls sont en revanche incapables d'interagir directement avec les effecteurs Bax et Bak pour les activer. Les BH3-seuls activateurs sont capables d'interagir avec les anti-apoptotiques mais aussi avec les effecteurs, déclenchant leur activation. Les membres anti-apoptotiques inhibent le déclenchement de la mort cellulaire à la fois en inhibant les effecteurs Bax et Bak, et en séquestrant les BH3-seuls activateurs (Llambi *et al.*, 2011). Les BH3-seuls activateurs sont tBid, la forme clivée de Bid, Bim, et, plus récemment identifié, Puma. Si Puma a longtemps été considéré comme sensibilisateur, c'est en fait un médiateur privilégié de l'apoptose, puissant activateur de Bax (Cartron *et al.*, 2004; Gallenne *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009). Cible transcriptionnelle directe de p53 et E2F1, l'induction de Puma par ces suppresseurs de tumeur contribue de façon majeure à la réponse apoptotique en activant Bax (Hershko & Ginsberg, 2004; Kaeser & Iggo, 2002; Villunger *et al.*, 2003). Par ailleurs, Puma peut également moduler la conformation de Bcl-xL. Le domaine BH3 de Puma, intrinsèquement désordonné, adopte une conformation hélicale en s'enchâssant dans la poche hydrophobe de ses partenaires de la famille Bcl-2. Le Trp71 de Puma, spécifique de ce BH3-seul, engage une interaction de type aromatique, ou pi-pi-stacking, avec l'His113 de Bcl-xL (Chipuk *et al.*, 2005). Cette interaction induit un changement de conformation, et le dépliement de l'hélice  $\alpha$ 3 de Bcl-xL, qui n'est observé qu'avec Puma, et non les autres BH3-seuls.

Si les BH3-seuls activateurs peuvent être inhibés par l'ensemble des anti-apoptotiques, les BH3-seuls sensibilisateurs présentent des sélectivités dans leurs interactions avec les anti-apoptotiques (Chen *et al.*, 2005). Bad et Bmf inhibent spécifiquement Bcl-2, Bcl-w, et Bcl-xL ; Bik et Hrk, Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-2A1. Noxa est

capable d'interagir avec Mcl-1 et Bcl-2A1/Bfl-1. Noxa joue donc un rôle important dans la régulation de la mort cellulaire, étant le seul BH3-seul sensibilisateur capable d'inhiber ces anti-apoptotiques. Contrairement aux autres BH3-seuls, Noxa possède une séquence d'adressage au protéasome sur son domaine C-terminal, indépendante de l'ubiquitination (Craxton *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2014). En interagissant avec Mcl-1, Noxa l'inhibe directement, mais favorise également son envoi au protéasome et sa dégradation (Czabotar *et al.*, 2007). En plus de son rôle classique d'inhibiteur, Noxa peut donc également réguler la stabilité de l'anti-apoptotique. Par ailleurs, bien que Noxa se fixe préférentiellement à Mcl-1 et Bcl-2A1, des données indiquent une interaction plus faible avec Bcl-xL (Hagenbuchner *et al.*, 2010; Lopez *et al.*, 2010). Le BH3-seul sensibilisateur Noxa a donc un rôle central dans le déclenchement de la perméabilisation mitochondriale.

Les spécificités de liaisons et différences d'affinités dessinent le réseau complexe des protéines de la famille Bcl-2, permettant un contrôle fin de la mortalité cellulaire (figure 11). La description de ce réseau a permis de définir la notion de cellules prédisposées, « amorcées » (ou *primées*) ou non pour mourir (figure 12 ; Certo *et al.*, 2006; Sarosiek *et al.*, 2013). Ces états cellulaires sont distingués par le profil des BH3-seuls présents dans la cellule, déplaçant ou non l'équilibre des protéines de la famille



**Figure 12 : L'amorce des cellules, ou « priming », est particulièrement important dans le devenir cellulaire suite à un signal apoptotique (d'après Sarosiek *et al.*, 2013).**

Bcl-2 en faveur de la mort cellulaire. Une cellule primée présente des pro-apoptotiques disponibles mais séquestrés par les anti-apoptotiques. Un faible signal apoptotique suffira alors à augmenter les BH3-seuls sensibilisateurs, libérant les BH3-seuls activateurs et déclenchant rapidement la mort cellulaire. A l'inverse, une cellule non-primée nécessite un signal apoptotique plus fort et/ou prolongé pour entraîner sa mort. Cette notion récente est particulièrement intéressante pour la compréhension des mécanismes de résistances aux thérapies.

*d. Régulations de l'activation de Bax/Bak indépendamment de la famille Bcl-2*

L'activation de Bax et Bak peut également être régulée par des acteurs n'appartenant pas à la famille Bcl-2. Ainsi, plusieurs protéines mitochondriales ont été décrites comme récepteurs modulant l'insertion de Bax. Bien qu'une étude montre que les complexes VDAC ne sont pas nécessaires pour le MOMP (Baines *et al.*, 2007), VDAC faciliterait l'ancrage mitochondrial de Bak/Bax (Roy *et al.*, 2009; Yamagata *et al.*, 2009). Le complexe TOM, et en particulier TOM22, a également été montré comme facilitant l'insertion de Bax à la mitochondrie, dans différents modèles cellulaires (Cartron *et al.*, 2008 *in vitro* et en lignées cellulaires humaines; Colin *et al.*, 2009 dans la drosophile ; Renault *et al.*, 2012 en levure). Par ailleurs, la protéine Drp1, une GTPase impliquée dans la fission mitochondriale, facilite l'oligomérisation de Bax préalablement activé par tBid, en liposome comme en lignée cellulaires humaines, par le remodelage des membranes lipidiques (Montessuit *et al.*, 2010). A l'inverse, diverses études ont montré que les protéines de la famille Bcl-2 pouvaient moduler la morphologie mitochondriale. Ces données mettent en avant un lien entre apoptose et dynamique mitochondriale qui sera discuté dans la section B2e de ce manuscrit (James & Martinou, 2008).

En plus de partenaires protéiques, les lipides membranaires sont également décrits comme modulateurs de l'activité des protéines à multi-domaines (Mignard *et al.*, 2014; Raemy & Martinou, 2014). Lors des premières études des mécanismes de perméabilisation mitochondriale par les pro-apoptotiques, les expériences en liposomes ont révélé l'importance de la composition lipidique des membranes pour l'activation complète de Bax. Ainsi, en liposomes constitués de phosphatidylcholine, phosphatidylserine et phosphatidyletholamine, tBid permet l'insertion de Bax à la

membrane sans entraîner son oligomérisation, qui requière la présence de cardiolipines (Kuwana *et al.*, 2002; Roucou *et al.*, 2002). Un lien direct a également été établi entre le niveau de cholestérol dans les membranes de liposome et la perméabilisation par Bax, l'accumulation de cholestérol diminuant la fluidité membranaire et ainsi l'oligomérisation de Bax (Lucken-Ardjomande *et al.*, 2008). La nécessité de composition lipidique particulière peut traduire la spécificité de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie par Bax et Bak, et non des autres membranes internes (Kuwana *et al.*, 2002).

*e. Régulation de la famille Bcl-2 par des modifications post-traductionnelles*

L'activité des protéines de la famille Bcl-2 est également régulée via des modifications post-traductionnelles. Ainsi, lors d'un arrêt mitotique, la phosphorylation des anti-apoptotiques par CDK1/Cycline-B1 conditionne le devenir cellulaire, en modulant leurs interactions avec les pro-apoptotiques (Bah *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2013; Sakurikar *et al.*, 2012). L'équipe du Dr. Chambers montre ainsi que l'arrêt mitotique suite au traitement au taxol de la lignée de carcinome du colon HT29 entraîne une forte activité CDK1, qui phosphoryle intensivement Mcl-1 et Bcl-xL (Sakurikar *et al.*, 2012). La phosphorylation de ces anti-apoptotiques par CDK1 est requise dans la mort mitotique. Notre équipe a également montré que suite à l'arrêt mitotique de diverses lignées de cancer du sein, par traitement au taxol ou ARN interférents dirigés contre cdc20, le devenir cellulaire est modulé par la phosphorylation de Bcl-xL (Bah *et al.*, 2014). La phosphorylation du résidu S62 de la boucle non structurée de Bcl-xL observée lors de l'arrêt mitotique favorise notamment la libération du pro-apoptotique Bax, suite à un traitement avec un BH3 mimétique. A l'inverse, la phosphorylation de Bcl-2 sur la serine-70 augmente son affinité pour Bak et Bim, protégeant la cellule de la mort mitotique (Dai *et al.*, 2013). La mort lors d'un arrêt mitotique peut également être stimulée par la phosphorylation de pro-apoptotiques BH3-seuls (Wang *et al.*, 2014b). La phosphorylation du résidu S66 de Bid favorise alors la mort cellulaire, sans que les modalités moléculaires ne soient connues à ce jour. L'effecteur Bax peut également être phosphorylé par diverses voies tel que PI3K/AKT, JNK, GSK-3 $\beta$  ou encore la p38, mais les conditions et les conséquences de ces phosphorylations restent à élucider (Wang *et al.*, 2010a). La phosphorylation du résidu S184 inhiberait la fonction pro-apoptotique

alors que la phosphorylation du S163 favoriserait la mort cellulaire. La déphosphorylation des thréonines-172, -174 et 186 de Bax par la phosphatase Wip1 induite par p53 inhiberait l'apoptose, lors de l'irradiation de diverses lignées de cancer de la prostate (Song *et al.*, 2013). D'autres modifications post-traductionnelles peuvent moduler la voie mitochondriale de l'apoptose. Parkin, l'ubiquitine-ligase impliquée dans la mitophagie, régule la fonction pro-apoptotique de Bax en l'ubiquitinant sur deux résidus, K21 en N-terminal, et K64, sur le BH3. Cela prévient la localisation mitochondriale du pro-apoptotique, et favorise sa dégradation protéosomale (Charan *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2012). L'extinction de Parkin dans des neurones primaires murins sensibilise les cellules à l'étoposide de façon dépendante de Bax, alors que la surexpression de la Parkin bloque la mort en réponse à divers stimuli (Johnson *et al.*, 2012).

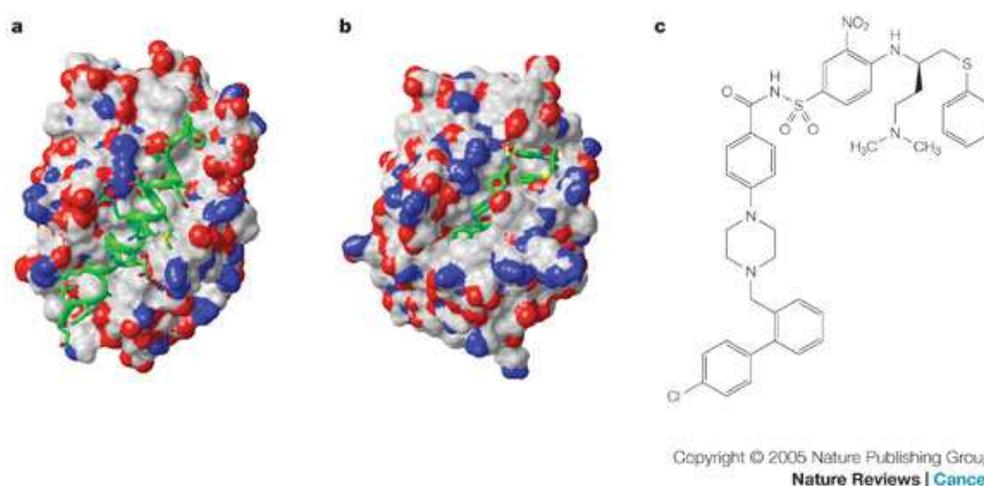
#### *f. Induction de l'apoptose par les BH3-mimétiques*

La fonction de l'anti-apoptotique Bcl-2 a été initialement décrite via sa surexpression lors de la tumorigenèse (Tsujiyama, 1989; Vaux *et al.*, 1988). Les autres anti-apoptotiques sont également fréquemment surexprimés dans les tumeurs sanguines comme dans les tumeurs solides (O'Kane *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010b; Warr & Shore, 2008). La surexpression de des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est impliquée dans la résistance aux chimiothérapies classiques. La comparaison des transcrits de 60 lignées cellulaires permet d'observer une forte corrélation négative entre le niveau de Bcl-xL, et la sensibilité à 122 agents de chimiothérapies standards (Amundson *et al.*, 2000). Cette corrélation négative entre le niveau d'homologues anti-apoptotiques de Bcl-2 et la sensibilité aux thérapies a été notamment confirmée dans 174 échantillons de leucémies myéloïdes aiguës (Mehta *et al.*, 2013).

Pour contrer cette résistance, des petites molécules ont été développées, pour mimer les domaines BH3, ciblant ainsi la poche hydrophobe des anti-apoptotiques et libérer leurs partenaires pro-apoptotiques (figure 13). Ces « BH3-mimétiques » ont différentes efficacités selon leurs spécificités et affinités pour les différents anti-apoptotiques (Ni Chonghaile & Letai, 2008). Le potentiel apoptotique des BH3-mimétiques a été démontré en lignées cellulaires, cellules cancéreuses primaire ou encore modèles animaux, notamment par l'utilisation de l'ABT-737 (Oltersdorf *et al.*,

2005; Ugarenko *et al.*, 2010) et de son homologue disponible oralement, l'ABT-263 ou navitoclax (Tse *et al.*, 2008). Ces composés se fixent sur Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, mais n'ont qu'une faible affinité pour Mcl-1 ou Bfl-1, qui peuvent alors être responsables de résistances (Al-Harbi *et al.*, 2011; Yecies *et al.*, 2010). Ces BH3-mimétiques présentent un effet synergique en combinaison avec diverses chimiothérapies dites classiques dans divers contextes (Kutuk & Letai, 2008; Tagscherer *et al.*, 2008; Trudel *et al.*, 2007). Ces molécules peuvent également induire une apoptose en agent simple dans certains contextes, en particulier dans les tumeurs sanguines, mais également dans les tumeurs solides (dans diverses lignées de myélome multiples par Kline *et al.*, 2007; dans la lignée de cancer colorectale HCT116 p21-/- par Gallenne *et al.*, 2009...). Ainsi, l'inhibition des anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est une stratégie prometteuse dans le cadre de traitements du cancer.

Cependant, les premières études cliniques ont révélées que la fixation du navitoclax sur Bcl-xL est responsable d'une thrombopénie transitoire, du fait d'une apoptose massive des plaquettes sanguines (Schoenwaelder *et al.*, 2011). Des stratégies plus ciblées sont alors développées, comme le ciblage de Bcl-2 uniquement par l'ABT-199 (Souers *et al.*, 2013), le ciblage plus efficace de Bcl-xL par le WEHI-539 diminuant les doses utilisées et ainsi la toxicité sur les tissus sains (Lessene *et al.*, 2013), ou encore le ciblage concomittant de Bfl-1 permettant de lever les phénomènes de résistance à l'ABT-737 (Mathieu *et al.*, 2014). La complexité de ces stratégies ciblées est liée à



**Figure 13 : Structures des complexes Bcl-xL/Bad-BH3 et Bcl-xL/ABT-737.** Représentation du BH3 de Bad (A), ou de l'ABT-737 (B) dans la poche hydrophobe de Bcl-xL. (C) Structure chimique de l'ABT-737 (d'après Fesik, 2005).

l'homologie importante au sein des poches hydrophobes des différents anti-apoptotiques. Par ailleurs, si la famille Bcl-2 reste une cible de choix pour la thérapie anticancéreuse dans le futur, son ciblage thérapeutique nécessite de comprendre l'ensemble des fonctions de ses membres, dans l'apoptose mais également dans les autres grands processus cellulaires (Czabotar *et al.*, 2014).

*g. Fonctions non-apoptotiques de la famille Bcl-2*

Au delà de leur rôle largement étudié dans la régulation de l'apoptose, les différents membres de la famille Bcl-2 jouent également un rôle dans d'autres processus importants de la cellule, qu'il s'agisse de la régulation du cycle cellulaire, de l'autophagie, de la dynamique mitochondriale, ou de la réparation de l'ADN (Braun *et al.*, 2013).

Les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 peuvent intervenir à différents moments du cycle et participer à son arrêt. La surexpression de Bcl-2 et Bcl-xL favorisent notamment l'entrée en quiescence de fibroblastes embryonnaires murins (G0) et retardent la transition G1-S (Janumyan *et al.*, 2008). Les anti-apoptotiques modulent la phosphorylation du CKI p27/KIP1 par Mirk. Ils peuvent également augmenter les niveaux de p27, via une inhibition du facteur de transcription c-Myc (Greider *et al.*, 2002). Dans les deux cas, les modalités précises des interactions entre les anti-apoptotiques et les effecteurs identifiés, Mirk ou Myc, restent à élucider. Par ailleurs, lors d'un arrêt en G2 suite à des dommages à l'ADN, la phosphorylation de la sérine 62 de Bcl-xL par PLK1 ou JNK2 entraîne son accumulation au niveau du nucléus (Wang *et al.*, 2014a). La protéine Bcl-xL phosphorylée séquestre alors CDK1, empêchant le passage en mitose. Ainsi, les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 jouent leur rôle pro-survie en ralentissant le cycle cellulaire, permettant la prise en charge de dommages éventuels par la cellule (figure 14).

Les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 peuvent inhiber l'autophagie, via une interaction avec la protéine Beclin-1, impliquée dans les premières étapes du processus (confère section A2d). En effet, Beclin-1 comporte un domaine semblable au BH3, bien que ne présentant pas de fonction pro-apoptotique liée à ce domaine (Maiuri *et al.*, 2007a). Le domaine BH3 permet en revanche sa séquestration dans la poche hydrophobe de Bcl-2 et Bcl-xL. Le traitement avec un BH3-mimétique, l'ABT-737, entraîne la libération de Beclin-1, et permet le déclenchement de l'autophagie. Les BH3-

seuls, comme Bad ou Bik, ont également été décrits comme inducteurs de l'autophagie, entrant en compétition avec la protéine Beclin-1 pour la poche hydrophobe des anti-apoptotiques (Maiuri *et al.*, 2007b; Rashmi *et al.*, 2008). Plus récemment, une étude présente un rôle important de Bim dans l'inhibition de l'autophagie (Luo *et al.*, 2012). En absence de stress Bim interagirait avec une fraction de Beclin-1, et entrainerait la séquestration au niveau des microtubules, par l'intermédiaire de LC8. Lors d'un stress, une carence en nutriment, Bim est relargué de LC8 et libère Beclin-1. Bim pourrait alors interagir avec la poche des anti-apoptotiques, facilitant l'apoptose, et libérant une seconde fraction de Beclin-1, entraînant le déclenchement de l'autophagie. Les protéines de la famille Bcl-2 permettent donc, à différents niveaux, un couplage entre les voies de l'apoptose et de l'autophagie (figure 14).

Les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 inhibent également la mitophagie, qui est une forme particulière d'autophagie permettant l'élimination de mitochondries endommagées (figure 14). Il a été montré que Mcl-1 et Bcl-xL interagissent avec l'Ubiquitine-ligase Parkin, responsable du marquage des mitochondries pour leur reconnaissance par p62, conduisant à leur chargement dans les autophagosomes (Hollville *et al.*, 2014). Les anti-apoptotiques, en empêchant le recrutement mitochondrial de la Parkin par la protéine adaptatrice Pink1, bloquent l'ubiquitylation des mitochondries et inhibent le processus mitophagique.

Un nombre important d'études montre que dynamique mitochondriale et apoptose sont intrinsèquement liés. En effet, Karbowski *et al* ont montré que lors de l'induction de l'apoptose, Bax transloque à la mitochondrie, au niveau de futurs sites de fission, et colocalise avec Drp1 et Mfn2 (Karbowski *et al.*, 2002). Les auteurs suggèrent que Bax participerait à la fragmentation mitochondriale lors de l'apoptose. Bax et son homologue Bak sont capable de promouvoir la sumoylation de Drp1, permettant son association à la mitochondrie, en conditions apoptotiques (Wasiak *et al.*, 2007). En retour, Drp1 va stimuler la fragmentation mitochondriale et favoriser l'activation et l'oligomérisation de Bax (Brooks *et al.*, 2011; Montessuit *et al.*, 2010). Ce système permettrait une amplification du signal apoptotique, à travers la modulation de la morphologie mitochondriale (figure 14). Dans les cellules saines, Bax et Bak semblent en revanche impliquées dans la fusion mitochondriale (Karbowski *et al.*, 2006). Des cellules Bax<sup>-/-</sup>Bak<sup>-/-</sup> ont des mitochondries plus fragmentées que les cellules parentales. Bax est

capable de réguler la formation du complexe Mfn2 impliqué dans la fusion mitochondriale, même en système acellulaire (Hoppins *et al.*, 2011) et Bak est également capable d'interagir avec Mfn2 (Brooks *et al.*, 2007).

Les anti-apoptotiques, et en particulier Bcl-2, modulent les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. Il a ainsi été montré que Bcl-2 interagit avec de nombreux acteurs de la réparation ADN, comme KU70, MSH2, APE1, ou encore BRCA1 (Hou *et al.*, 2007; Laulier & Lopez, 2012; Laulier *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2008). Bcl-2 étant fréquemment surexprimé dans divers cancers, son inhibition des voies de réparation contribuerait à la tumorigenèse en favorisant l'instabilité génétique (figure 14).

L'équilibre entre les protéines de la famille Bcl-2 est ainsi particulièrement important dans le devenir cellulaire (figure 14). En condition normale, Les anti-apoptotiques inhibent l'apoptose via leurs homologues pro-apoptotiques, mais également l'autophagie ou la mitophagie. Lors d'un stress cellulaire, l'augmentation du taux de BH3-seuls par diverses voies de suppression tumorale entraîne l'activation des effecteurs à multidomaines, et l'inhibition des anti-apoptotiques. Ils favorisent ainsi à l'apoptose et lèvent l'inhibition des anti-apoptotiques sur la mitophagie et l'autophagie mais également sur la réparation ADN. Par ailleurs la phosphorylation des anti-apoptotiques participe à l'arrêt du cycle cellulaire via p27/KIP1. Ainsi, la modulation du réseau de protéines de la famille Bcl-2 en condition de stress favorise d'une part la réparation des dommages, et d'autre part la mort cellulaire si les dommages sont trop importants. Dans les cellules cancéreuses, les anti-apoptotiques sont fréquemment surexprimés. En inhibant la réparation ADN, ils stimulent alors l'instabilité génétique, en plus de leur rôle dans la résistance à la mort cellulaire.

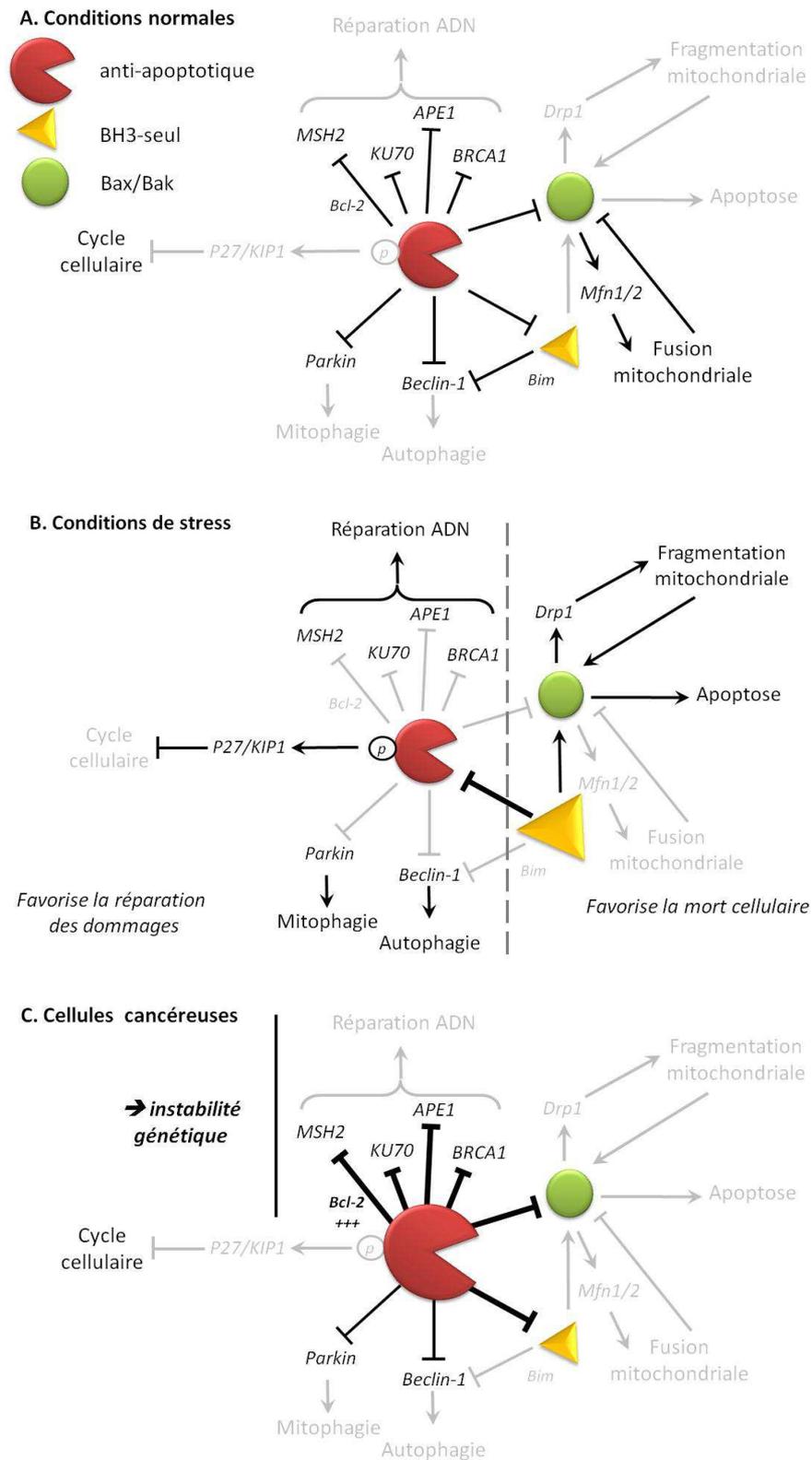


Figure 14 : La famille Bcl-2, au cœur des mécanismes fondamentaux de la cellule.

## C. Suppresseurs de tumeur

Au cours du développement tumoral des altérations génétiques entraînent l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et l'activation d'oncogènes, modulant des voies cellulaires clefs impliquées dans la croissance, la survie et le développement (Hanahan & Weinberg, 2000). Les voies pRb/E2F1 et p53 sont notamment fréquemment inactivées lors du processus tumoral. Ainsi, les modèles murins déficients en p53 présentent un développement normal, mais sont prédisposés à l'apparition de cancers (Donehower *et al.*, 1992). Les embryons de souris déficientes en pRb de façon homozygote ne sont pas viables, et les modèles hétérozygotes développent des tumeurs pituitaires issues des cellules délétées en pRb (Jacks *et al.*, 1992). Ces voies, qui seront décrites dans ce manuscrit, sont donc particulièrement importantes pour la suppression tumorale.

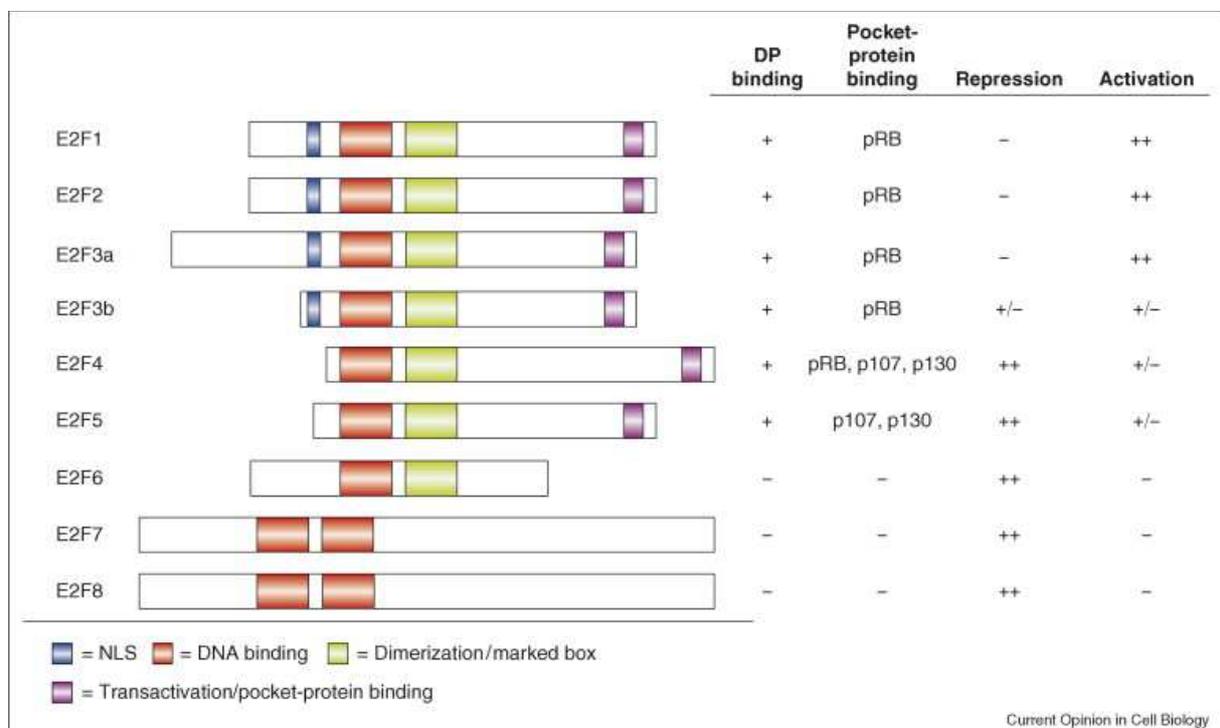
### 1) La voie pRB/E2F1

Les protéines de la famille E2F, et leur régulateur pRb, sont particulièrement impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. E2F1 a la particularité d'être également impliqué dans l'apoptose (Polager & Ginsberg, 2009). Il s'agit donc d'un modulateur privilégié du développement de tumeurs, très conservé au cours de l'évolution (décrit chez l'homme par Reichel *et al.* en 1987, la drosophile par Ohtani & Nevins en 1994, *C. Elegans* par Ceol & Horvitz en 2001 ou encore les plantes en 1999 par Ramírez-Parra *et al.*).

#### a. Généralités sur les E2Fs

La famille des E2Fs comprend 9 membres, dont E2F1 a été le premier identifié. Ce sont des facteurs de transcription, caractérisés par des domaines fortement conservés impliqués dans la liaison à des séquences spécifiques d'ADN (DBD), la transactivation, l'hétérodimérisation avec les co-activateurs DP1 ou DP2, ou avec les régulateurs de la famille pRb (figure 15). Les protéines de la famille DP possèdent un domaine de liaison à l'ADN structuralement proche des E2Fs et reconnaissent les mêmes séquences sur les promoteurs, favorisant la liaison et l'orientation des E2Fs sur l'ADN (Zheng *et al.*, 1999).

Les protéines E2F1, E2F2 et E2F3a/b sont considérées comme "activatrices", car elles permettent généralement l'activation transcriptionnelle de leurs gènes cibles, en particulier en phase G1/S (Iaquinta & Lees, 2007), contrairement aux E2F4-8, les E2Fs "répressives". E2F4 et E2F5 sont majoritaires en phase G0/G1, par rapport aux E2Fs activatrices. Elles n'activent pas la transcription de gènes, ou très faiblement, malgré la présence d'un domaine de transactivation. Elles se fixent sur leurs gènes cibles, empêchant la liaison des E2Fs activateurs, qui sont moins fortement exprimés, empêchant ainsi l'entrée dans le cycle cellulaire. Les E2F6-8 ne possèdent, eux, pas de domaine de trans-activation, mais sont capables d'interagir avec les complexes corépresseurs du groupe polycomb, réprimant les gènes cibles. Un autre classement possible des E2Fs est fonction de leur régulation par les protéines à poches (pRb, p107 et p130) : E2F1-3 sont régulées par pRb uniquement, E2F4 par l'ensemble des protéines à poches, E2F5 par p107 et p130, alors que E2F6-8 n'interagissent pas avec les protéines à poches.

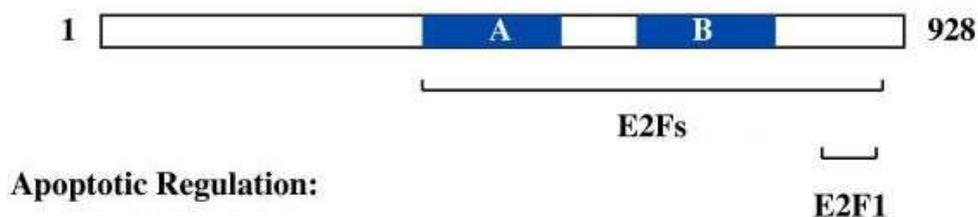


**Figure 15 : les différents membres de la famille E2F et leurs caractéristiques** (d'après Iaquinta & Lees, 2007).

*b. La protéine pRb, régulateur des E2Fs*

La protéine du Rétinoblastome, ou pRb, est le plus important des membres de la famille des protéines à poche, régulateur privilégié des E2Fs. Le gène RB1 est l'un des premiers gènes suppresseurs de tumeurs caractérisé en 1987 (Lee *et al.*, 1987). RB1 a été identifié originellement via une mutation chez les enfants développant des rétinoblastomes, cette mutation étant initiatrice de la maladie. La perte de RB1 est également associée à des ostéosarcomes lors du développement (Deshpande & Hinds, 2006), ou à de nombreux cancer chez l'adulte (Arima *et al.*, 2008). La protéine pRb est inactivée dans 90% des cancers du poumon à petites cellules (Meuwissen *et al.*, 2003). Son expression est inversement corrélée avec l'invasion tumorale, dans les cancers gastriques (Chou *et al.*, 2006) et les cancers du sein "basal-like" particulièrement agressifs l'expriment faiblement (Gauthier *et al.*, 2007). L'inactivation de pRb, que ce soit par mutation génétique, perte d'hétérozygotie, ou par une régulation négative par les CDKs, est impliquée dans de nombreux processus de promotion tumorale (revue par Burkhardt & Sage, 2008). Ainsi, la perte de pRb fonctionnel permet le retour en cycle de cellules quiescentes, différenciées, et favorise les cancers en augmentant l'instabilité chromosomique, l'angiogénèse, la prévention de la sénescence ou encore le potentiel métastatique.

Les domaines C-terminaux des E2Fs lient pRb via une poche, constituée de deux domaines A et B séparés par une région flexible (figure 16). Cette "petite poche" n'est toutefois pas suffisante pour la régulation effective des E2Fs. En effet, la "poche large", comprenant la petite poche et le domaine C-terminal, est nécessaire à l'activité de suppresseur de tumeur de pRb (Yang *et al.*, 2002). L'interaction des E2Fs au niveau de la poche de pRb empêche leur activité transcriptionnelle sur les gènes du cycle cellulaire.



**Figure 16 : structure de pRb et interaction avec les E2Fs (d'après Dick, 2007).**

Par ailleurs, contrairement aux autres E2Fs, E2F1 est également capable de se lier au niveau C-terminal de pRb, via une séquence très spécifique d'E2F1, au niveau des acides aminés 272-282 (Dick & Dyson, 2003). Les auteurs proposent que cette interface de liaison spécifique entre pRb/E2F1 permette de réguler ses fonctions uniques pro-apoptotiques, indépendamment des fonctions prolifératives partagées par l'ensemble des E2Fs.

Cette région C-terminale de pRb est particulièrement mutée dans les cancers (Hamel *et al.*, 1993) soulignant son importance dans la régulation des voies pRb/E2F1. Par ailleurs, de nombreuses modifications post-transcriptionnelles interviennent au niveau de cette région (revue par Munro *et al.*, 2012 ; confère section C1f). C'est également au niveau C-terminal que se trouve la séquence de localisation nucléaire (NLS).

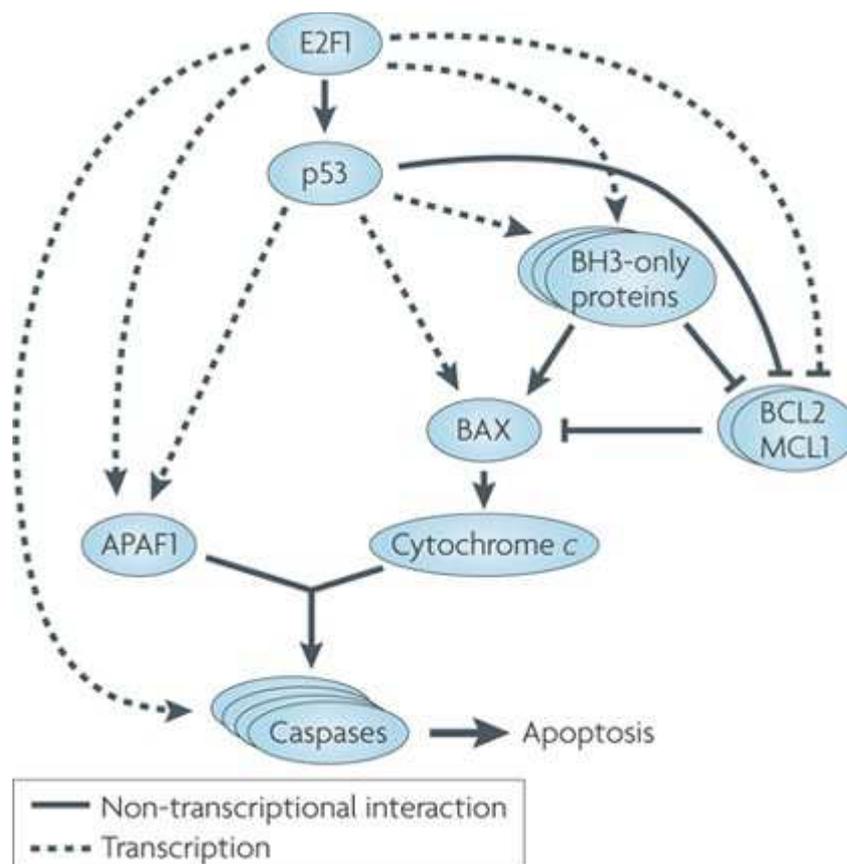
### *c. Fonction principale de pRb/E2Fs: la régulation du cycle cellulaire*

La fonction la plus décrite des E2Fs est la régulation du cycle cellulaire. Lorsque pRb est lié aux E2Fs, ces derniers ne peuvent se lier à leurs cofacteurs, nécessaires à leur activité transcriptionnelle, du fait du chevauchement des domaines de liaison à pRb et aux co-activateurs. Au cours du cycle, pRb est phosphorylé par différents complexes cycline/CDK, décrits en section C1f. Cette phosphorylation va permettre une dissociation de pRb des E2Fs, qui pourront recruter leurs co-activateurs, et activer la transcription de gènes cibles. Ces gènes sont pour la plupart impliqués dans la progression dans les différentes phases du cycle (revue par Bracken *et al.*, 2004). Les E2Fs sont ainsi impliqués dans l'expression de protéines permettant l'initiation de la réplication (MCM2-7 : Mukherjee *et al.*, 2009 ; cdc6 : Ohtani *et al.*, 1998...), la synthèse de l'ADN (thymidine kinase : Dou *et al.*, 1994 ; polymérase  $\alpha$ ...), ou la progression dans le cycle cellulaire (cycline A : Sylvester *et al.*, 1998 ; cycline E : Geng *et al.*, 1996 ; cdc2,...) .

En plus de l'inhibition directe des E2Fs, pRb se lie également à des facteurs modulant la structure de la chromatine. Qu'il s'agisse d'histones-désacétylases, d'histones-méthyle-transférases, d'histones-méthylases, d'ADN-méthyl-transférases, ou de complexes de remodelages d'histones (listés dans la revue par Chinnam & Goodrich, 2011), leur interaction avec pRb, au niveau des promoteurs cibles des E2Fs, module la structure de la chromatine, aboutissant à une répression de l'expression des gènes.

*d. La voie pRb/E2F1 dans l'apoptose*

Contrairement aux autres E2Fs, E2F1 a pour cible des gènes impliqués dans l'apoptose (figure 17). Ainsi, dans la liste non-exhaustive de gènes cibles d'E2F1, on retrouve plusieurs gènes codant des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bid, Bak, Bad, Noxa...), ainsi que des activateurs directs de la mort cellulaire, comme des caspases (3-7-8) ou Apaf-1 (Bracken *et al.*, 2004). En parallèle, E2F1 réprime l'expression des anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, en particulier Mcl-1 (Croxton *et al.*, 2002). Par sa fonction transcriptionnelle, E2F1 module directement l'équilibre cellulaire en faveur de l'apoptose. E2F1 favorise l'apoptose en activant d'autres voies de signalisations, impliquant en particulier les protéines de la famille de p53. Ainsi, p53 et p73 sont des cibles transcriptionnelles directe d'E2F1. E2F1 ne régule



**Figure 17 : rôles d'E2F1 dans l'apoptose.** E2F1 module la transcription le niveau de protéines directement impliquées dans l'apoptose, membres de la famille Bcl-2, caspases, ou activateurs. E2F1 régule directement ou non le niveau et l'activité du facteur de transcription pro-apoptotique p53, par divers mécanismes (d'après Polager & Ginsberg, 2009).

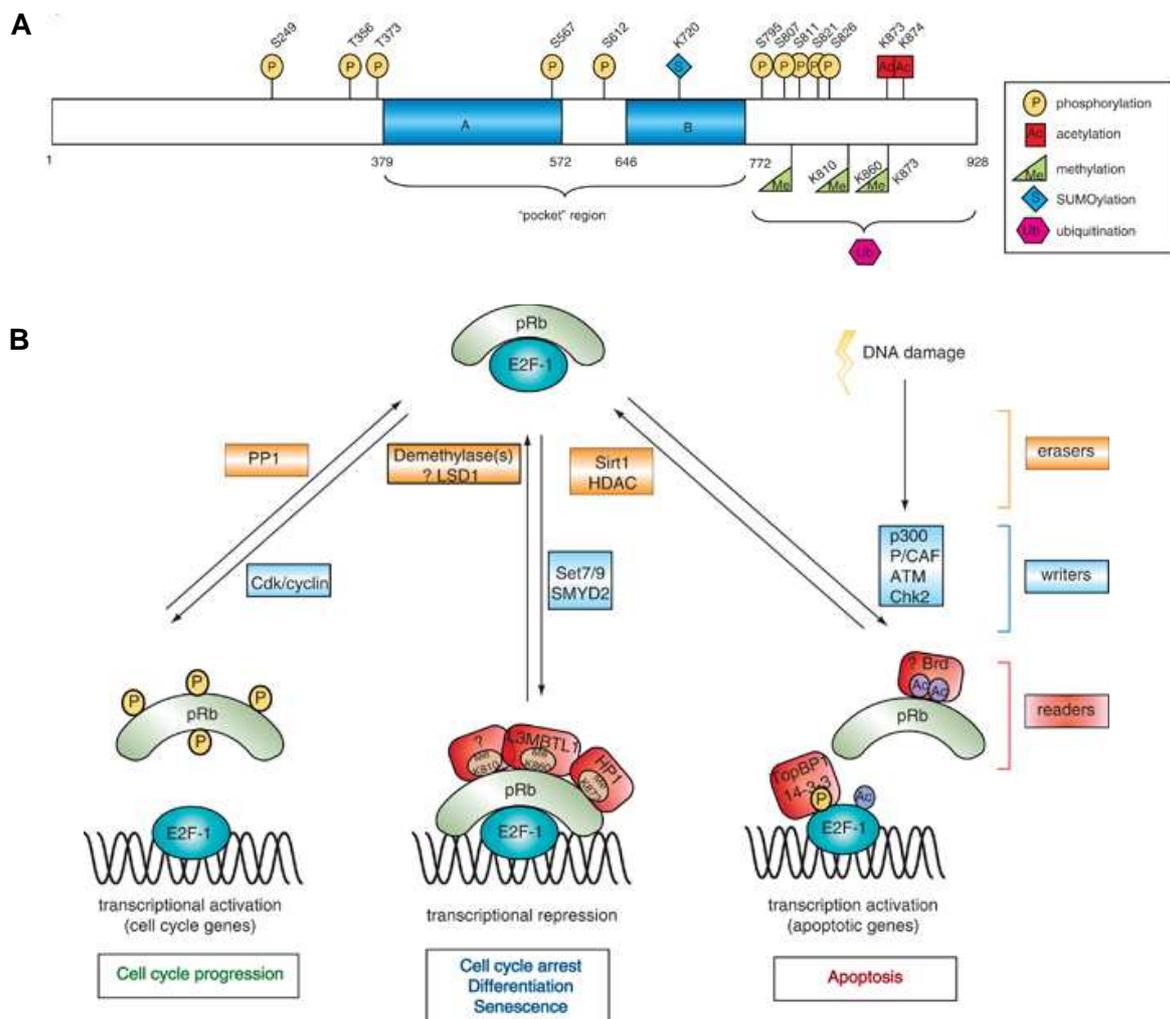
pas seulement le niveau d'expression de p53, mais également son activité. Il a été montré que cette activation de p53 par E2F1 se fait via p14/ARF, cible transcriptionnelle d'E2F1, qui stabilise p53 en bloquant sa liaison à l'ubiquitine-ligase MDM2 (Bates *et al.*, 1998). E2F1 active également la transcription d'ASPP1 et ASPP2, deux co-facteurs de p53 (Fogal *et al.*, 2005). Pin1, un autre gène cible d'E2F1 (Ryo *et al.*, 2002), est aussi impliqué dans l'activation indirecte de p53, de par son inhibition de iASPP, co-facteur inhibiteur du suppresseur de tumeur (Mantovani *et al.*, 2007). E2F1 influence par ailleurs l'expression et l'activité d'autres modulateurs de l'activité de p53, comme ATM et CHK2, impliqués dans la prise en charge des cassures ADN, ou la kinase de stress p38 (Polager & Ginsberg, 2009). E2F1 peut enfin se lier directement à p53 et bloquer son export nucléaire, favorisant son activité transcriptionnelle (Fogal *et al.*, 2005). E2F1 stimule ainsi l'activation de p53. Mais la protéine peut aussi inhiber l'activité de p53 en activant la transcription de SKP2 et de l'histone désacétylase sirtuine-1, favorisant l'ubiquitination du suppresseur de tumeur (Polager & Ginsberg, 2009).

*e. Régulation par des modifications post-traductionnelles de la voie pRb/E2F1*

Les régulations post-traductionnelles de la voie pRb/E2F1 se font principalement par modifications du domaine C-terminal de pRb, et ce domaine est nécessaire pour la plupart des activités de pRb (figure 18).

Un des aspects les mieux décrit de la régulation de la voie pRb/E2F1 par des modifications post-traductionnelles est la phosphorylation de pRb, conduisant à la libération d'E2F1, et son activité transcriptionnelle favorisant la prolifération. Le suppresseur de tumeur porte jusqu'à 16 sites consensus de phosphorylation par les CDK (Knudsen & Wang, 1996). Dans les cellules quiescentes, pRb séquestre E2F1 et empêche la transcription de gènes cibles impliqués dans la progression du cycle, notamment dans la synthèse ADN (détails en section C1c). Au cours de la phase G1 du cycle cellulaire, la phosphorylation séquentielle de pRb par différents complexes cycline/CDK entraîne la dissociation de pRb/E2F1. Ainsi en début de phase G1, pRb est phosphorylé en S249, T356, S807, S811 et T826 par les complexes cyclineD/CDK4-6. L'initiation de la phosphorylation de pRb, sur sa région C-terminale, entraîne un changement de conformation, permettant des interactions intramoléculaires au niveau de la poche. Le complexe cyclineE/CDK2 cible alors pRb, en fin de G1, sur différents sites rendus

accessibles par le changement de conformation, particulièrement S567, situé au cœur de la poche, et dont la phosphorylation empêche la liaison à E2F1 (Harbour *et al.*, 1999). L'hyperphosphorylation de pRb est maintenue pendant la phase S et au long du cycle par le complexe cycline A/CDK2. En opposition à la phosphorylation par les cycline/CDK pendant le cycle, pRb peut être déphosphorylé par la phosphatase de protéine 1 (PP1), et particulièrement lors d'un arrêt mitotique (Hirschi *et al.*, 2010). La phosphatase se lie en 870-882, entrant en compétition avec les complexes cycline/CDK pour la liaison à pRb. La protéine pRb peut être phosphorylée sur S567 par p38, une MAP kinase activée lors de stress cellulaires, comme les dommages à l'ADN (Delston *et al.*, 2011). Différents agents causant des dommages à l'ADN entraînent la phosphorylation de pRb sur le résidu S612 (Inoue *et al.*, 2007). La phosphorylation du résidu S162 est également



**Figure 18 : Régulation d'E2F1 par pRb. (A)** Structure et modifications post-traductionnelles de pRb. **(B)** Les modifications post-traductionnelles sur pRb/E2F1 permettent la régulation des voies enclenchées (d'après Munro *et al.*, 2012).

retrouvée dans des cellules différenciées quiescentes (Hattori *et al.*, 2014). Cependant de façon surprenante, lors de stress oncogéniques ou génotoxiques, l'hyperphosphorylation de pRb a récemment été décrite comme capable de promouvoir la formation d'un complexe transcriptionnellement actif avec E2F1 participant à la réponse apoptotique (Ianari *et al.*, 2009a; Inoue *et al.*, 2007; Julian *et al.*, 2008). Ces données suggèrent donc que la régulation d'E2F1 par pRb ne serait pas restreinte à sa séquestration puis sa libération lorsque pRb est phosphorylé, mais que la forme phosphorylée de pRb pourrait également interagir avec E2F1 et moduler son activité.

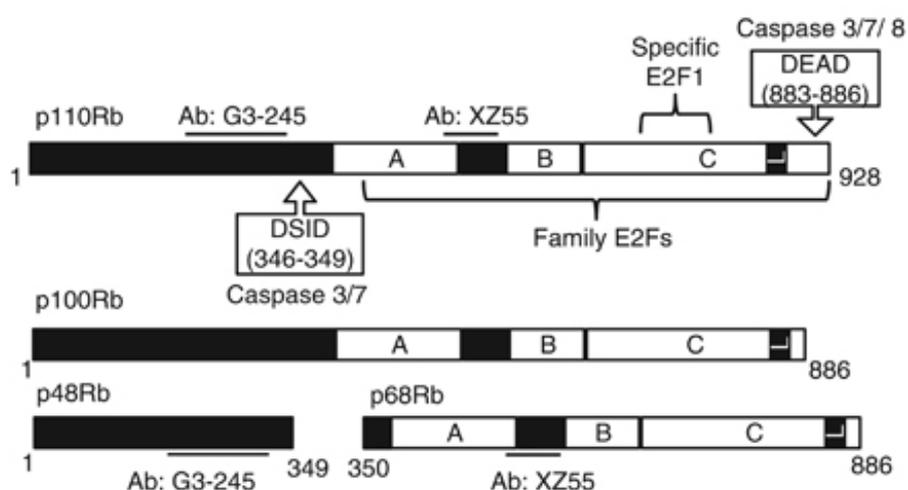
D'autres modifications post-traductionnelles interviennent dans la régulation de la voie pRb/E2F1, notamment l'ubiquitination. L'E3 ubiquitine-ligase Mouse-Double-Minute-2 (ou MDM2) favorise la dégradation protéosomale de pRb, en ubiquitinant les lysines de son domaine C-terminal (Uchida *et al.*, 2005). Une dégradation intense de pRb est associée à une prolifération non contrôlée des cellules, favorisant l'oncogenèse. De façon surprenante, l'ubiquitine-ligase MDM2 joue un rôle protecteur vis-à-vis d'E2F1 : il s'y lie mais ne permet pas son ubiquitination, et déplace p45/SKP2, une autre ubiquitine ligase, responsable de sa dégradation par la voie ubiquitine/protéasome (Zhang *et al.*, 2005). Ainsi, MDM2 favorise non seulement la dégradation de pRb, mais aussi la stabilisation d'E2F1.

#### *f. Le clivage de pRb par les caspases*

Dès 1997, plusieurs équipes ont mis en évidence le clivage de pRb par les caspases suite à différents stimuli apoptotiques – TNF- $\alpha$ , Fas-L, cisplatine, ou encore étoposide (Boutillier *et al.*, 2000; Diederich *et al.*, 1998; Fattman *et al.*, 1997; Schrantz *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 1997). Le rôle de ce clivage reste à élucider. Trois sites de clivages ont été identifiés : deux sites N-terminaux (LExD et DxID ou DSID), et un site C-terminal (DEAD, figure 19). Le clivage de pRb se fait de façon séquentielle lors de l'apoptose, d'abord par les caspases 3-7-8 sur le DEAD, générant, à partir de la forme complète à 110kDa, une forme p100<sup>Rb</sup> (Fattman *et al.*, 2001 ; figure 19). Ce premier clivage permet un changement conformationnel, exposant le DSID, qui peut à son tour être clivé par les caspases 3-7, générant deux fragments p48<sup>Rb</sup> et p68<sup>Rb</sup>. Par ailleurs, la mutation de pRb sur son site DEAD, empêchant l'initiation des clivages successifs par les caspases, bloque

l'effet pro-apoptotique du TNF- $\alpha$ . Cela implique que le clivage de pRb n'est pas seulement une conséquence de l'activation des caspases, mais a lui-même un rôle dans le déclenchement de la mort cellulaire. Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer ce rôle pro-apoptotique du clivage de pRb. Les fragments p48<sup>Rb</sup> et p68<sup>Rb</sup> générés pourraient ne plus lier E2F1 (Fattman *et al*, 1997), qui participerait alors à la transactivation de gènes pro-apoptotiques, amplifiant le signal de mort (Fattman *et al*, 2001). L'équipe de Jean YJ Wang propose en 2007 un autre modèle, par lequel le clivage de pRb par les caspases, suite à un traitement au TNF- $\alpha$ , pourrait libérer un facteur inconnu (Huang *et al.*, 2007). Ce facteur libéré favoriserait le clivage de Bid en tBid, permettant l'amplification des signaux de mort par la voie mitochondriale. Quel que soit le modèle, il apparaît clair que le clivage séquentiel de pRb, aboutissant aux formes p48<sup>Rb</sup> et p68<sup>Rb</sup>, a un rôle dans l'amplification du signal apoptotique, bien que les mécanismes à l'œuvre restent à déterminer.

Le site LExD, moins décrit, est clivé par la caspase 9 et génère une forme p76<sup>Rb</sup>, dans un premier temps décrit comme inhibiteur de l'apoptose induite par p53 dans des fibroblastes embryonnaires de rats (Lemaire *et al.*, 2005). La même équipe est plus tard revenue sur ce modèle, montrant que la surexpression de p76<sup>Rb</sup> déclenche l'apoptose dans divers lignées cellulaires humaines, indépendamment du statut p53 (Le Floch *et al.*, 2010). Ainsi, les conséquences du clivage de pRb sur le LExD restent à élucider.



**Figure 19 : Les principales formes clivées de pRb.** Le clivage de la forme totale p110<sup>Rb</sup> au niveau du DISC génère la forme p100<sup>Rb</sup>, puis un second clivage au niveau du DSID génère deux fragments p48<sup>Rb</sup>, et p68<sup>Rb</sup> (D'après Bertin-Ciftc *et al*, 2013).

*g. Rôle anti- ou pro-apoptotique de pRb*

Par l'inhibition d'E2F1, pRb apparaît comme anti-apoptotique, et sa phosphorylation, ou son clivage par les caspases peut entraîner la libération d'E2F1 (confère section C1d-f; Fattman *et al.*, 1997). En accord avec cela, l'ablation du gène RB1 dans des modèles murins conduit à un déclenchement excessif d'apoptose conduisant à la mort des souris (Lee *et al.*, 1992). L'E2F1 libéré peut transactiver les gènes pro-apoptotiques, notamment p14/ARF, qui régule positivement p53 (Haupt *et al.*, 1995; Rogoff *et al.*, 2002) ou directement des membres de la famille Bcl-2 (Hershko & Ginsberg, 2004).

Il semble néanmoins que le rôle de pRb soit plus complexe, et qu'en fonction du contexte cellulaire, il puisse lui-même avoir un rôle pro-apoptotique direct. La forme entière hyperphosphorylée de pRb est ainsi retrouvée associée à E2F1, sur les promoteurs de cibles pro-apoptotiques, comme p73 ou la caspase-7 (Ianari *et al.*, 2009a). La liaison entre pRb et E2F1 est alors requise pour la transcription optimale. Plus récemment, un rôle direct de pRb à la mitochondrie a été décrit. Une fraction de pRb est constitutivement à la mitochondrie (Ferecatu *et al.*, 2009), et pRb participe à la mortalité lors d'un traitement au TNF- $\alpha$ , indépendamment de son activité nucléaire (Hilgendorf *et al.*, 2013). Le pRb mitochondrial est alors capable d'interagir directement avec Bax, stimulant son activation conformationnelle, par des mécanismes qui restent à étudier. Le clivage de pRb par les caspases permet l'amplification du signal apoptotique, via la libération de facteurs de pRb (Fattman *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2007), ou directement par l'action des fragments de pRb clivé générés (Le Floch *et al.*, 2010). À noter que cette fonction pro-apoptotique est conservée au cours de l'évolution, puisque diverses études ont montré un rôle pro-mort des homologues de pRb, dans différents modèles (chez *C. Elegans*, par Schertel & Conradt, 2007 ; chez la drosophile par Milet *et al.*, 2010).

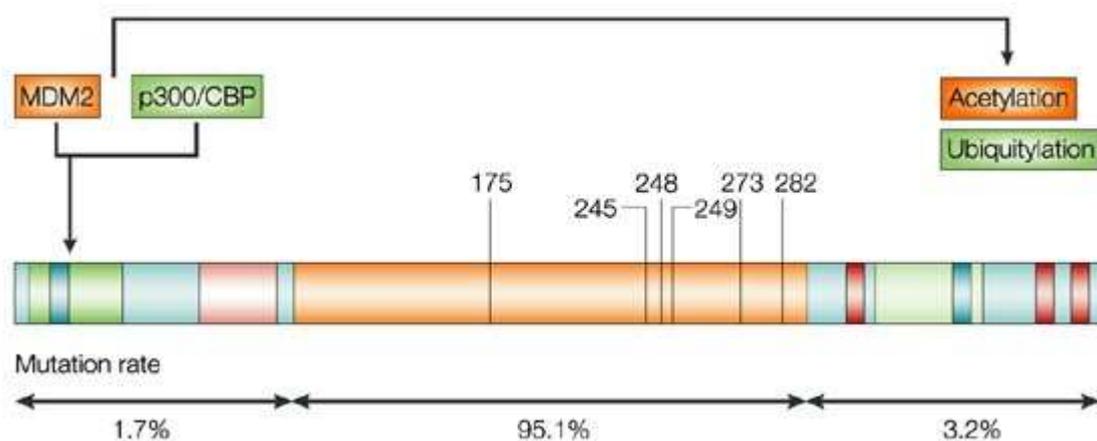
Le rôle de pRb dans l'apoptose est donc bien plus complexe qu'initialement envisagé. Dans un contexte normal, il inhibe les fonctions transcriptionnelles pro-apoptotiques d'E2F1. Lors d'un stress, il peut libérer E2F1, permettant l'apoptose, ou, alternativement, participer lui-même à la transcription de gènes pro-apoptotiques, ou à l'initiation de l'apoptose au niveau cytoplasmique. La régulation par les différentes modifications post-traductionnelles, ainsi que par des clivages par les caspases, permet la modulation de ces rôles, et détermine le devenir cellulaire.

## 2) La voie p53

Découvert simultanément par différentes équipes dès 1979 (DeLeo *et al.*, 1979; Kress *et al.*, 1979; Linzer & Levine, 1979; Melero *et al.*, 1979), p53 est d'abord considéré comme un oncogène, du fait de son accumulation fréquente dans les cellules tumorales. Au début des années 1990, il est toutefois décrit comme muté ou délété dans de nombreux cancers, en contradiction avec cette première hypothèse (Baker *et al.*, 1989; Malkin *et al.*, 1990; Takahashi *et al.*, 1989; Vogelstein *et al.*, 1988). Progressivement, ses fonctions essentielles dans l'arrêt du cycle et le déclenchement de la mort cellulaire deviennent plus claires, et il acquiert le surnom de « gardien du génome », soulignant son rôle majeur dans la suppression tumorale (Lane, 1992).

### a. Présentation générale de la famille p53

La protéine p53 est un facteur de transcription qui comprend différents domaines bien définis (Okorokov & Orlova, 2009 ; figure 20) : un domaine central de liaison à l'ADN (résidus 101-300, DBD), un domaine N-terminal de trans-activation, permettant la liaison de régulateurs négatifs, ou de co-facteurs (résidus 1-39, TAD1), un domaine riche en proline servant également à la trans-activation (résidus 40-92, TAD2), et un domaine d'oligomérisation permettant la tétramérisation pour l'activité



**Figure 20 : Structure de p53.** Le facteur de transcription est constitué d'un domaine de liaison à l'ADN (orange), un domaine riche en proline (rose), un domaine de trans-activation N-terminal (vert foncé), et un domaine d'oligomérisation C-term (vert clair). Il comporte 3 signaux de localisation nucléaire (rouge), et deux signaux d'export nucléaire (bleu foncé). Le taux de mutation de chaque région est précisé, et les résidus indiqués sont responsables à eux seuls de 28% des mutations de p53 (d'après (Vousden and Lu, 2002)).

transcriptionnelle (résidus 307-355). Sa localisation sub-cellulaire est finement régulée, en particulier par différents signaux d'export nucléaire (NES) et signaux de localisation nucléaire (NLS). Dans les tumeurs, une large majorité des mutations est retrouvée au niveau du DBD, bloquant notamment l'activité transcriptionnelle de p53.

Deux homologues de p53 ont été découverts plus récemment, p73 et p63 (respectivement Schmale & Bamberger, 1997; Yang *et al.*, 1998). Ces protéines partagent l'organisation structurale et les différents domaines de p53 (revue par Costanzo *et al.*, 2014). Le DBD est particulièrement conservé, et comporte une séquence de haute homologie (>70%). Les trois homologues présentent ainsi une redondance partielle quant au répertoire des gènes cibles. En revanche, le domaine d'oligomérisation est nettement moins conservé, et si p63 et p73 peuvent s'hétéro-oligomériser entre eux, ils ne le peuvent pas avec p53 (Davison *et al.*, 1999). De même, la régulation des différentes protéines se fait par des mécanismes distincts de p53 du fait de la faible homologie de la région N-terminale impliquée dans cette régulation (~25%). Comme p53, p73 est ubiquitaire, et a un rôle global de suppresseur de tumeur, par sa fonction de facteur de transcription. Lors d'un stress, il module l'expression de gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, et l'apoptose induite par les dommages à l'ADN, qu'il partage généralement avec p53 (Fontemaggi *et al.*, 2002). Il est également décrit comme ayant un rôle dans la différenciation cellulaire, en absence de stress. Le troisième membre, p63, est plus impliqué dans le développement, et son rôle principal est le maintien du potentiel prolifératif des cellules progénitrices de l'épiderme, la stratification de l'épiderme et la différenciation des kératinocytes (Koster *et al.*, 2004; Senoo *et al.*, 2007). Si p53 est très fréquemment muté ou délété dans les cancers, c'est moins le cas de p63 ou p73.

Par ailleurs, les gènes codant p53, p63 et p73, subissent plusieurs épissages alternatifs, aboutissant à l'expression d'une variété importante de protéines (Murray-Zmijewski *et al.*, 2006 ; figure 18). Ainsi, plusieurs promoteurs alternatifs peuvent être utilisés : l'initiation de la transcription sur le promoteur P1 résulte en la forme entière, P1' en une forme délétée de 40 résidus  $\Delta 40$ , et P2 en une forme  $\Delta 133$ . L'ARN peut également subir différents épissages alternatifs en C-terminal, conduisant à la forme longue  $\alpha$ , la forme  $\beta$ , ou la forme  $\gamma$  (figure 21). La forme de référence dont il est question en absence de précision est la forme  $\alpha$ , la plus courante. Les isoformes présentent

différentes activités qui peuvent être antagonistes (revue par Surget *et al.*, 2013). Les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  diffèrent sur la partie C-terminale, particulièrement impliquée dans la régulation du facteur de transcription. En revanche, elles présentent un TAD et un DBD complet. Elles sont donc capable de trans-activer les gènes cibles de p53, avec des variations cependant quant à l'affinité pour les différents promoteurs et à la force de l'activation transcriptionnelle. Les formes  $\Delta 40p53$  ne présentent pas de TAD1 mais gardent le TAD2. Leur activité est peu connue, mais ils semblent avoir un effet dominant négatif sur p53, influençant son activité transcriptionnelle, mais également sa localisation cellulaire, ou son ubiquitination. Les formes  $\Delta 133p53$  sont délétées pour les deux TAD et pour une partie du DBD. Elles peuvent prévenir l'arrêt du cycle cellulaire en G1, l'induction de la sénescence, ou encore l'apoptose, en modulant l'expression de gènes de façon dépendante et indépendante de p53. Elles ont par ailleurs été décrites comme capable d'interagir avec p73. Une quatrième forme,  $\Delta 160p53$ , issue du

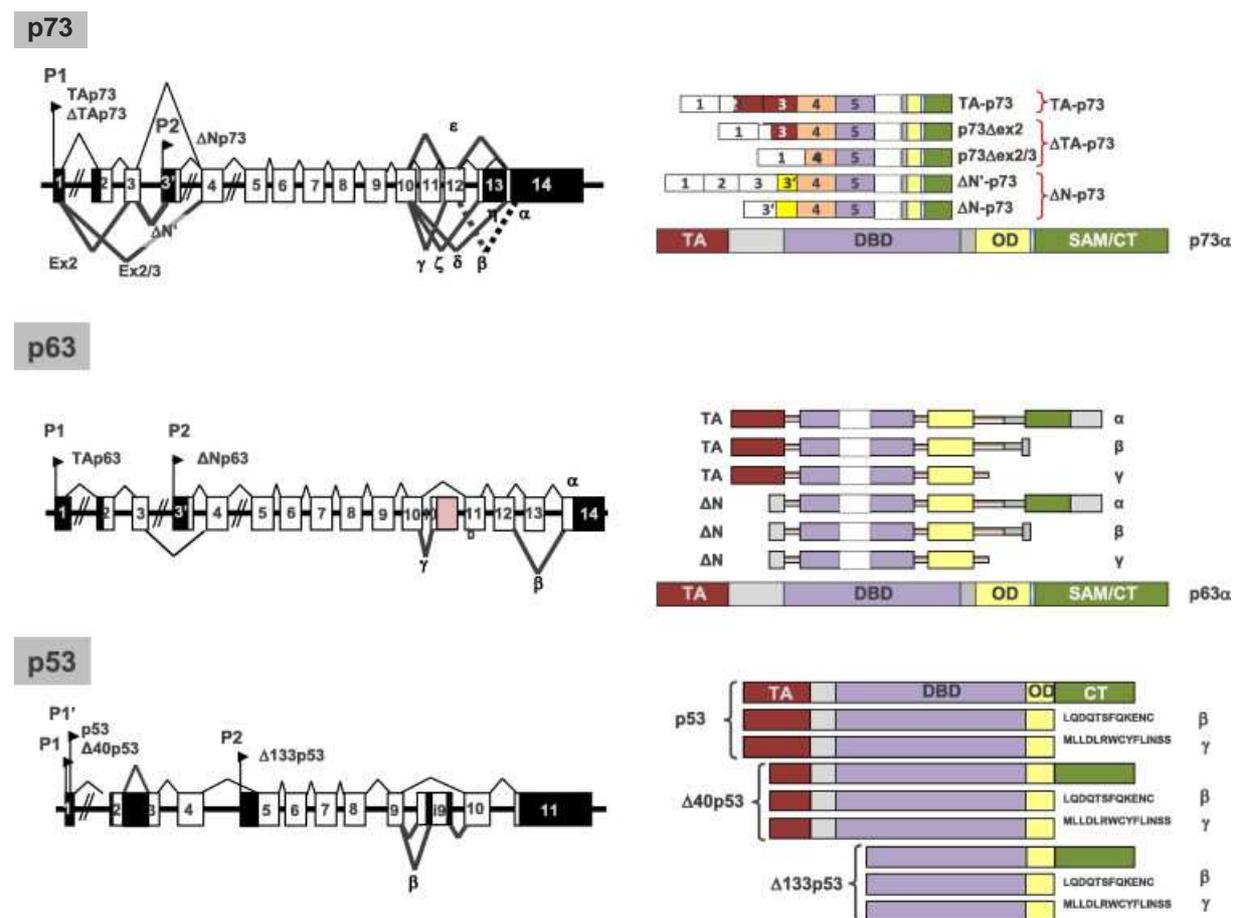


Figure 21 : La famille p53, un réseau complexe de protéines (d'après Costanzo *et al.*, 2014).

promoteur P2, a été décrite plus récemment, sans que ses activités ne soient précisément connues. Les isoformes de p53 sont différentiellement exprimées dans les tissus sains et les tissus de cancers (Bourdon *et al.*, 2013). L'analyse de 30 tumeurs mammaires a montré que dans 60% de ces tumeurs, l'expression de p53 $\beta$  et p53 $\gamma$  est perdue, alors que 40% des tumeurs présentent une surexpression de l'isoforme  $\Delta$ 133p53 (Bourdon *et al.*, 2005). Les formes p53 $\beta$  et  $\Delta$ 133p53 sont surexprimées dans les cellules de carcinomes rénaux comparativement aux cellules saines (Song *et al.*, 2009). Des niveaux d'expressions anormaux des isoformes de p53 ont également été décrit dans d'autres types de tumeurs, leucémies myéloïdes aiguës, glioblastomes, carcinome de colon, etc (revue par Bourdon *et al.*, 2013). La dérégulation de l'épissage alternatif de p53 peut alors participer à son inactivation, favorisant le processus tumoral. Les épissages alternatifs de p63 et p73 génèrent aussi différentes isoformes, dont les activités varient également, qui ne seront pas détaillées dans ce manuscrit (figure 21).

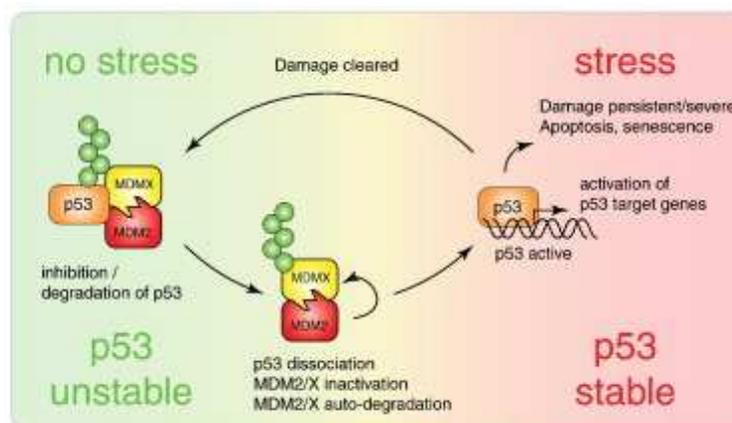
### *b. Régulation de p53*

Le gardien du génome, p53, a un rôle pivot dans la réponse aux stress oncogéniques dans les cellules. Cette réponse rapide est permise par la régulation fine du suppresseur de tumeur par un jeu complexe de modifications post- traductionnelles.

Le premier niveau de régulation de p53 est l'ubiquitination, le contrôle de sa stabilité jouant un rôle clef dans son activation (revue par Hock & Vousden, 2014). Le suppresseur de tumeur est exprimé de façon constitutive par la cellule, mais pour sa survie, celle-ci doit maintenir les niveaux de p53 bas. Les deux principaux acteurs de la régulation du niveau de p53 sont les ubiquitine-ligases MDM2 et, dans une moindre mesure, MDMX (aussi appelée MDM4). En absence de stress, elles interagissent avec la partie N-terminale du facteur de transcription (figure 22). Cette interaction inhibe la transcription directement, d'une part en empêchant l'interaction de p53 avec ses co-facteurs, de par le chevauchement des sites de liaison, et d'autre part en modifiant la conformation du suppresseur de tumeur empêchant sa liaison à l'ADN. MDM2 et MDMX poly-ubiquitent également plusieurs lysines au niveau C-terminal, principalement la K370, K372, K373, K381, K382, et K386, entraînant l'adressage de p53 au protéasome et sa dégradation. Le suppresseur de tumeur est ainsi maintenu à un niveau protéique

faible et le p53 restant est inactif transcriptionnellement. En cas de stress, différentes modifications détaillées plus bas vont entraîner le décrochage de MDM2/MDMX de p53. La protéine, non-ubiquitinylée, n'est plus dégradée et s'accumule dans la cellule (figure 22). Ce mécanisme permet une augmentation rapide de p53, ne nécessitant pas de déclencher sa transcription et son expression *de novo*. Il peut alors être activé et déclencher l'ensemble de ses fonctions. Au niveau nucléaire, sa tétramérisation permet la fixation sur des éléments de réponses au niveau des promoteurs de nombreux gènes cibles, qui peuvent être activés ou réprimés. MDM2 est lui-même une cible transcriptionnelle de p53 permettant un rétrocontrôle négatif et le retour à un niveau normal de p53 après réparation des dommages (figure 22). MDMX régule positivement cette boucle de rétrocontrôle en recrutant p53 sur le promoteur de MDM2 (Biderman *et al.*, 2012).

L'ubiquitination de p53 est également impliquée dans sa localisation sub-cellulaire. Ainsi, en ubiquitinant p53 sur sa partie C-terminale et sur son DBD, MDM2 entraîne un changement de conformation du facteur de transcription, qui favorise son export en dehors du noyau (Nie *et al.*, 2007). En condition de stress, p53 est mono-ubiquitinylé sur plusieurs lysine par MDM2, ou d'autres ubiquitines-ligases comme MSL2 (Kruse & Gu, 2009; Li *et al.*, 2003). La mono-ubiquitination de p53 entraîne sa translocation à la mitochondrie (Marchenko *et al.*, 2007). Le suppresseur de tumeur est alors rapidement désubiquitinylé par HAUSP, permettant son interaction avec les protéines mitochondriales.



**Figure 22 : L'ubiquitination de p53, au cœur du contrôle de sa stabilité** (d'après Hock & Vousden, 2014).

L'ubiquitination de p53 est modulée par différentes phosphorylations du suppresseur de tumeur, régulant sa stabilisation et son activation en condition de stress. Les voies de phosphorylation de p53 sont multiples (figure 23). L'extrémité N-terminale du suppresseur de tumeur est particulièrement ciblée. Ainsi, suite à un dommage à l'ADN, les kinases de la famille ATR sont activées et phosphorylent rapidement p53 sur une série de sérines et thréonines. La phosphorylation de la sérine-15 est considérée comme un marqueur d'activation du facteur de transcription. Elle induit un changement de conformation entraînant le décrochage de MDM2, et donc la stabilisation de p53 (Shieh *et al.*, 1997). D'autres études montrent que cette phosphorylation favorise d'autres modifications, comme la phosphorylation de la thréonine-18, ou l'acétylation de la protéine par le recrutement de p300 (Lambert *et al.*, 1998). Elle permet également l'inhibition de l'export nucléaire en bloquant le NES de l'extrémité N-terminale (Zhang & Xiong, 2001). Elle favoriserait donc l'activité transcriptionnelle de p53. A l'inverse, la phosphorylation de la sérine-46 par HIPK2 a été décrite pour favoriser l'activité mitochondriale de p53 (Sorrentino *et al.*, 2013). En recrutant la prolyl-isomérase Pin1, elle participe à un changement de conformation, qui permet la relocalisation

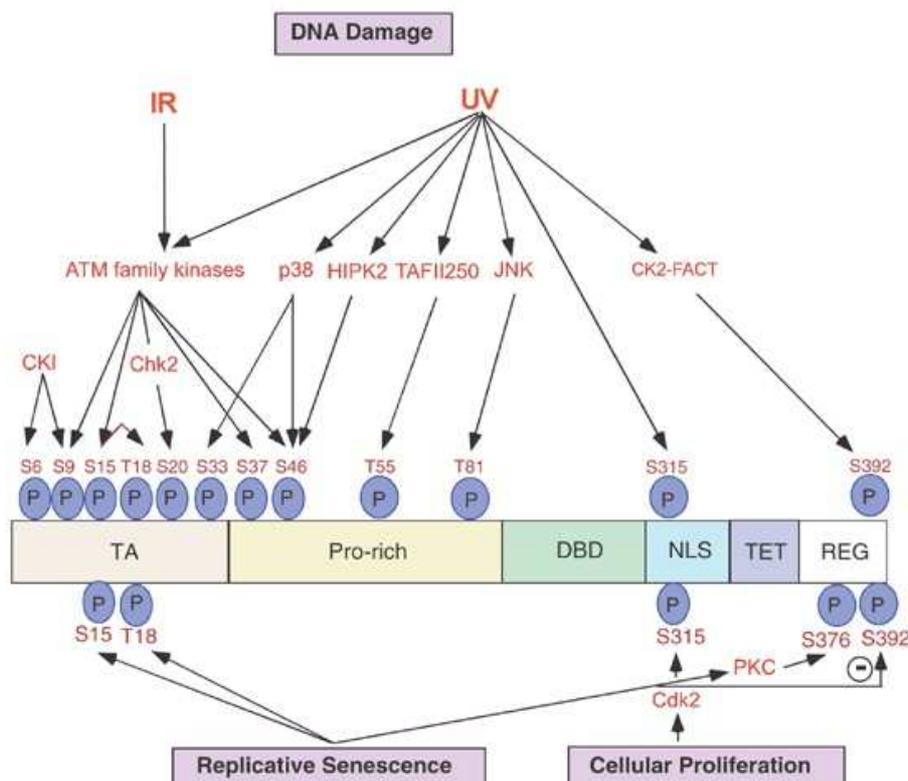


Figure 23 : Les voies de phosphorylation de p53 (d'après Xu, 2003).

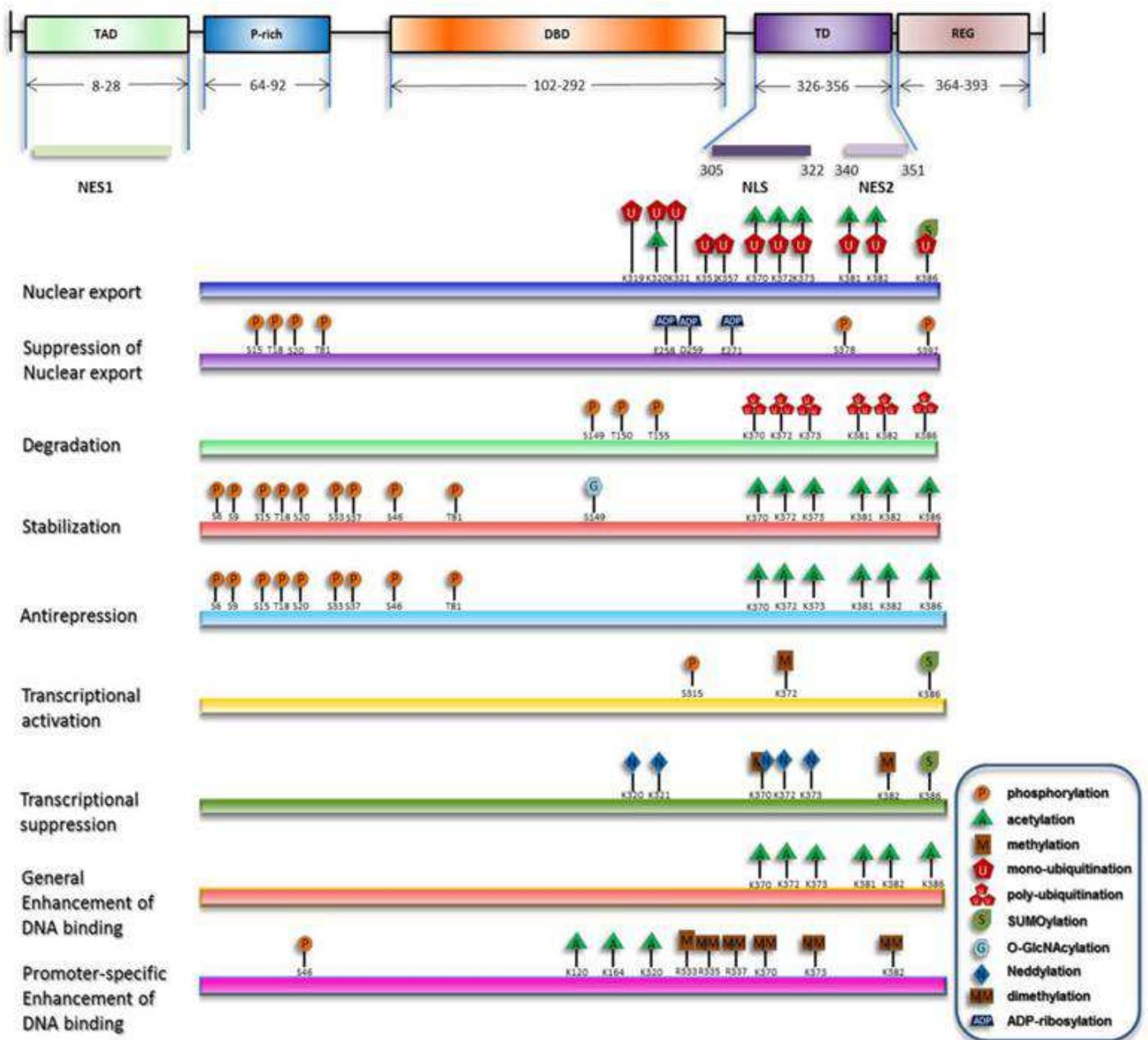
mitochondriale de p53, en favorisant sa mono-ubiquitination. Plusieurs études indiquent que les différentes phosphorylations peuvent moduler l'affinité de p53 pour les promoteurs des gènes cibles et ainsi orienter la réponse cellulaire en fonction de la gravité des dommages. Lors de dommages modérés, le niveau de MDM2 est augmenté par p53, et MDM2 ubiquitine HIPK2 entraînant sa dégradation protéosomale et limitant la phosphorylation de p53 sur la sérine-46 (Rinaldo *et al.*, 2007). En cas de dommages plus importants, la phosphorylation sur la sérine-46 augmenterait l'affinité de p53 pour les promoteurs des gènes pro-apoptotiques au détriment des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle (Mayo *et al.*, 2005; Smeenk *et al.*, 2011). En limitant la phosphorylation sur la sérine-46, ce rétrocontrôle par MDM2 favoriserait la transactivation des gènes du cycle cellulaire. De la même façon, la phosphorylation de la thréonine-55 par TAF1 entraîne un décrochage de p53 du promoteur de p21, favorisant la transactivation de gènes impliqués dans l'apoptose (Wu *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que le niveau de phosphorylation de p53 module l'orientation de la réponse aux stress, en régulant le niveau intra-cellulaire du facteur de transcription mais aussi en modulant directement ses activités transcriptionnelles et/ou cytoplasmiques.

L'acétylation de p53 module également son activité (revue par Brooks & Gu, 2011). L'histone-acétyl-tranfêrase p300 peut se fixer au niveau du TAD de p53 inhibant son interaction avec MDM2 et acétylant plusieurs lysines en C-terminal. L'acétylation de p53 module la liaison à ses séquences spécifiques de l'ADN au niveau des promoteurs de gènes cibles (Gu & Roeder, 1997). L'acétylation de p53 par PCAF sur la lysine-320 inhibe la phosphorylation de la sérine-46 notamment, favorisant alors l'activation de gènes de l'arrêt du cycle. A l'inverse, p53 peut être acétylé sur la lysine-373 par p300, stimulant sa phosphorylation (Knights *et al.*, 2006), ou sur la lysine-120 par les membres de la famille MYST (Sykes *et al.*, 2006). Ces modifications favorisent la trans-activation des gènes de l'apoptose, au détriment de l'arrêt du cycle. Par ailleurs, l'acétylation est également impliquée dans les fonctions non-transcriptionnelles du suppresseur de tumeur (Sykes *et al.*, 2009) Ainsi l'acétylation du résidu K-120 est requise pour le déplacement de Bak de Mcl-1 par p53, par un mécanisme qui reste à déterminer.

Dans une moindre mesure, l'activité de p53 peut être régulée par d'autres modifications, comme la méthylation, la SUMOylation, la NEEEDylation, ... Plus que par

l'effet des modifications individuelles, la modulation des fonctions de p53 se fait par un réseau complexe de modifications interdépendantes (Gu & Zhu, 2012).

Les combinaisons de modifications post-traductionnelles variées constituent alors un véritable « code » finement régulé (figure 24). Ce code détermine le niveau protéique de p53, mais également sa localisation, son activation, son affinité pour différents groupes de promoteurs, ou encore ses activités non-transcriptionnelles.



**Figure 24: Les principales modifications post-traductionnelles de p53.** Les différentes combinaisons de modifications interdépendantes permettent la régulation de diverses fonctions de p53 (d'après Gu & Zhu, 2012).

*c. Rôle de p53 sur le cycle cellulaire*

Lors de dommages à l'ADN, p53 est stabilisé et activé. Il bloque la prolifération cellulaire, de façon transitoire, pour réparer les dommages, ou de façon définitive (revue par Sperka *et al.*, 2012). Ainsi, si des dommages sont détectés pendant le point de contrôle G1/S, les kinases ATM/ATR sont activées et phosphorylent p53. Le suppresseur de tumeur active alors l'expression rapide de plusieurs cibles et en particulier p21/CIP1. Cette protéine peut inhiber plusieurs complexes cycline/CDK et ainsi empêcher la phosphorylation de Rb provoquant la libération d'E2F1 et l'expression de protéines nécessaires à la transition en phase S. p21/CIP1 peut également intervenir dans la réponse aux dommages en phase G2/M suite à l'activation de p53. D'autres gènes cibles de p53 modulent ce point de contrôle, comme GADD45 qui inhibe la formation du complexe cycline B1/CDK1, ou encore 14-3-3 $\sigma$  qui séquestre ce complexe dans le cytoplasme. p53 peut également réprimer l'expression de gènes, dont la cycline-B1, ou cdc2, participant à la transition G2/M (Taylor & Stark, 2001).

Une fois le cycle cellulaire arrêté, p53 favorise la réparation des dommages à l'ADN en activant la transcription de cibles impliquées dans les différentes voies de réparation de l'ADN (Udayakumar *et al.*, 2010). Ainsi p53 trans-active les gènes codant KU70, MLH1, PMS2, MSH2, DNABP2, ou encore XPC. Le suppresseur de tumeur interagit directement avec des acteurs de la réparation de l'ADN, comme Ape, OGG1, ou Poly stimulant la réparation. p53 peut alors moduler la réparation de l'ADN en tant que facteur de transcription et également en tant que co-activateur.

Si les dommages sont trop importants et/ou prolongés, p53 oriente la cellule vers un maintien permanent de l'arrêt de la prolifération, la sénescence, en particulier grâce à l'expression de p21, ou vers la mort cellulaire programmée, l'apoptose.

*d. Régulation de la viabilité cellulaire par p53*

p53 est impliqué dans un grand nombre de processus cellulaire, par sa fonction transcriptionnelle ou ses activités cytoplasmiques (figures 25). Dans ce manuscrit nous nous intéressons particulièrement à son implication dans les mécanismes liés au déclenchement de la mort cellulaire que sont l'apoptose, l'autophagie, ou encore la dynamique mitochondriale.

La protéine p53 exerce sa fonction de suppresseur de tumeur en grande partie par le déclenchement de l'apoptose. Le suppresseur de tumeur module essentiellement l'expression des protéines de la famille Bcl-2, acteurs clef de l'apoptose mitochondriale, de façon transcriptionnelle (activation des pro-apoptotiques, répression des anti-apoptotiques). Cependant, elle régule également l'activité des membres de la famille Bcl-2 par des interactions protéine-protéine, à l'extérieur du noyau (voir détails en section D). Hormis sa modulation des protéines de la famille Bcl-2, p53 régule la voie mitochondriale de l'apoptose en induisant l'expression d'Apaf-1 impliqué dans l'apoptosome ou encore en réprimant l'expression de la survivine, une protéine inhibitrice des caspases-3 et -7 (revue par Brady & Attardi, 2010), ou encore en interagissant directement avec la caspase-3, bien que les conséquences de cette interaction restent à déterminer (Frank *et al.*, 2011).

D'autre part, p53 favorise la voie extrinsèque de l'apoptose en augmentant l'expression de récepteurs de mort (DR5, Fas), ou de protéines du DISC (PIDD) (Brady & Attardi, 2010). Enfin, p53 permet de moduler le niveau de Fas à la surface des cellules en augmentant son acheminement par l'appareil de Golgi, augmentant la sensibilité des cellules à des signaux apoptotiques externes (Bennett *et al.*, 1998).

Selon sa localisation cellulaire, p53 présente des rôles opposés dans l'autophagie (Maiuri *et al.*, 2010). L'activation de p53 au noyau conduit à l'expression de protéines qui stimule l'autophagie comme DRAM (Damage-Related Autophagy Modulator), les sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 2$  de l'AMPK, ou TSC2 qui inhibe l'activité de mTor, un régulateur négatif l'autophagie. Une autre cible de p53 est DAPK-1 qui stimule l'autophagie en inhibant MAP1B, un interactant anti-autophagique de LC3 et en phosphorylant Beclin-1 empêchant sa séquestration par Bcl-xL. Par ailleurs, l'activation par p53 de l'expression de BH3-seuls qui déplacent Beclin-1 de Bcl-xL favorise également l'autophagie (Wang *et al.*, 2013). Plus récemment, p53 a été montré comme anti-autophagique au niveau cytoplasmique (Morselli *et al.*, 2011; Tasdemir *et al.*, 2008). En condition de carence nutritive prolongée, p53 diminue de façon non transcriptionnelle le niveau d'ARNm de LC3 (Scherz-Shouval *et al.*, 2010). p53 est également capable d'interagir avec FIP200, le cofacteur de la kinase ULK1 contrôlant la formation des autophagosomes. Le

suppresseur de tumeur bloque alors les premières étapes de l'autophagie (Morselli *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2013).

En parallèle de la régulation globale de l'autophagie, p53 module la mitophagie qui permet la dégradation et le recyclage des mitochondries endommagées. Cette régulation est liée à l'activation transcriptionnelle de Bnip3 par p53. Bnip3 comprend un domaine BH3 et est particulièrement impliqué dans la mitophagie par la libération de Beclin-1 de Bcl-xL (Wang *et al.*, 2013). L'ubiquitine-ligase Parkin impliquée dans le marquage des mitochondries pour l'adressage aux auto-phagosomes est aussi une cible transcriptionnelle de p53 (Zhang *et al.*, 2011). L'activation de p53 par différents stress entraîne une augmentation du niveau de Parkin, dans des lignées humaines et murines. En condition de sénescence, p53 cytoplasmique bloque la translocation mitochondriale de Parkin par une interaction directe impliquant les résidus 81-160 de p53 (Hoshino *et al.*, 2013a, 2014a). Par cette fonction, p53 inhibe le marquage des mitochondries par Parkin et diminue la mitophagie, ce qui altère le contrôle de la qualité mitochondriale.

Rappelons que la dynamique mitochondriale est fortement liée à l'apoptose et que des perturbations de l'équilibre entre la fusion et la fission mitochondriale peuvent influencer sur le devenir cellulaire (James & Martinou, 2008). Plusieurs gènes impliqués dans la dynamique mitochondriale sont des cibles de p53. Le suppresseur de tumeur active notamment la transcription de Mfn2, impliqué dans la fusion, ou Drp-1, responsable de la fission mitochondriale (Li *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010b). Par ailleurs, p53 induit la fission mitochondriale en favorisant la translocation mitochondriale de Drp-1. Il le fait en réprimant l'expression de miR-499, ce qui entraîne une dérégulation d'une phosphatase activatrice de Drp-1 (Wang *et al.*, 2011). Plus récemment, une interaction directe entre Drp-1 et p53 a été détectée, par laquelle Drp-1 stabilise p53 à la mitochondrie (Guo *et al.*, 2014).

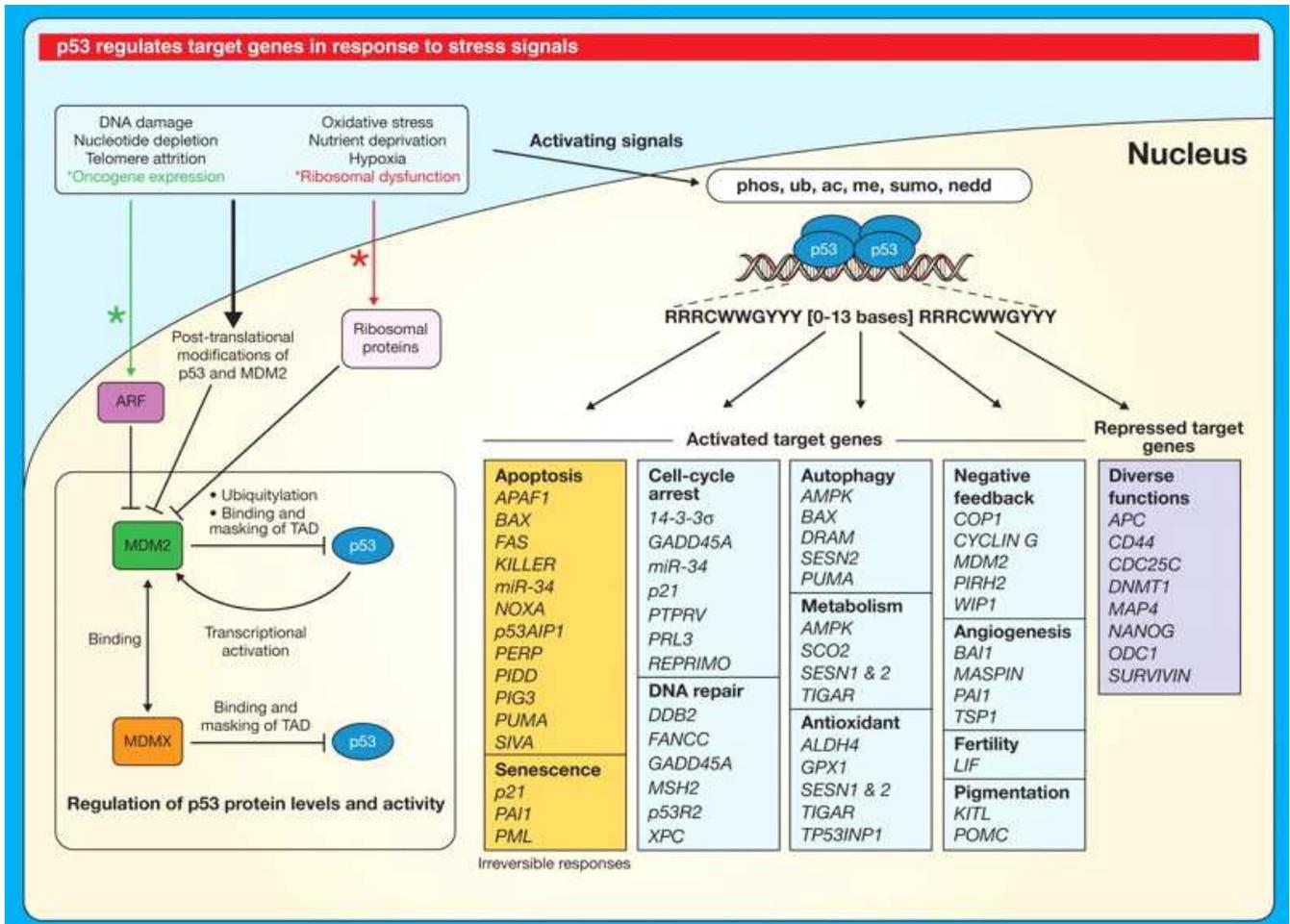
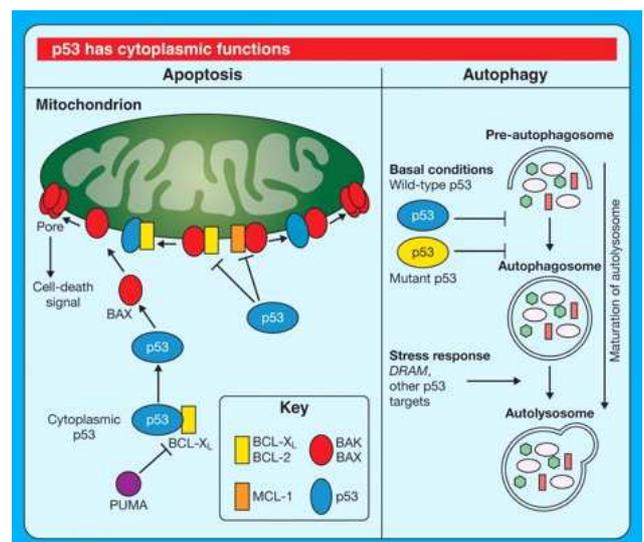


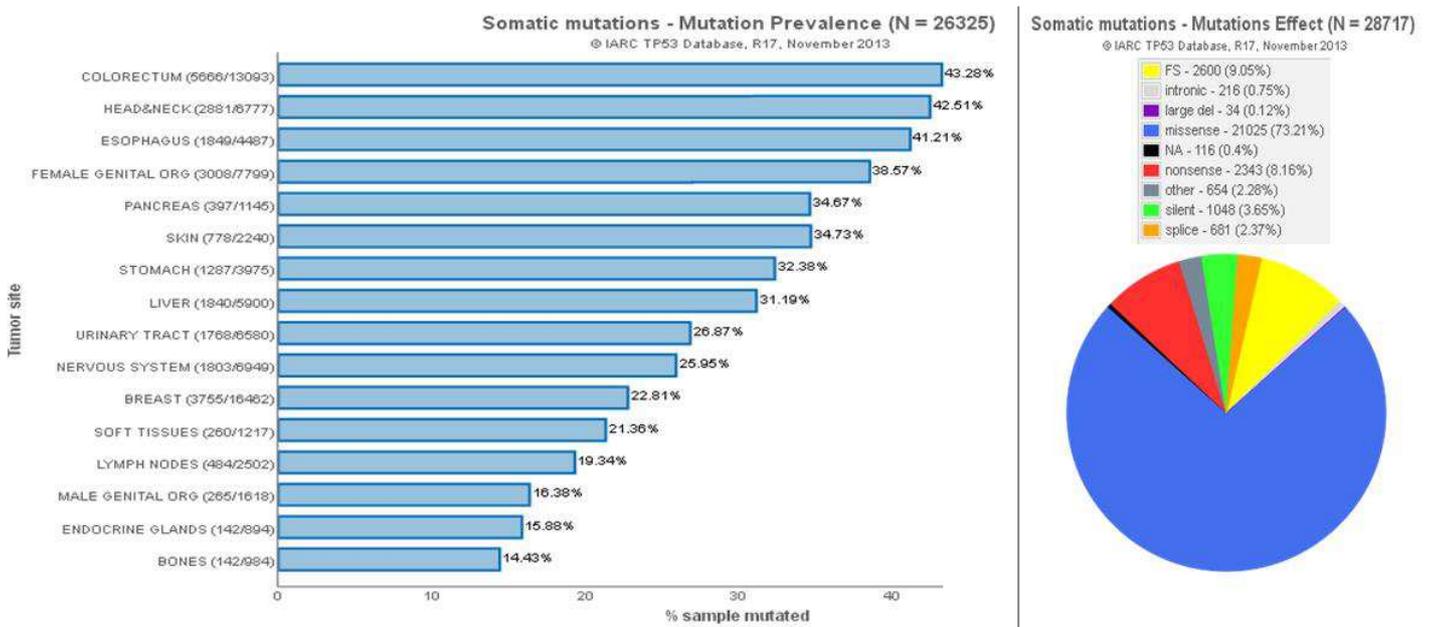
Figure 25 : Les principales fonctions de p53, transcriptionnelles (A) ou cytoplasmiques (B) (d'après Brady & Attardi, 2010).



### e. Mutations de p53 et tumorigenèse

La protéine p53 intervient à de nombreux niveaux de la transformation d'une cellule saine en un cancer, en régulant le cycle cellulaire et la viabilité de la cellule, mais également le métabolisme, la prise en charge des espèces réactives de l'oxygène, le système immunitaire, l'angiogenèse ou encore l'invasion cellulaire (figure 25). Cette implication de p53 dans le contrôle des divers processus de tumorigenèse est probablement à l'origine de la mise sous silence de la voie p53 dans les cancers, que ce soit directement par une mutation, une délétion de p53, ou par une perturbation de la voie en amont ou en aval du suppresseur de tumeur.

Ainsi, le gène du facteur de transcription présente lui-même des mutations dans 15 à 45% des cancers, selon la localisation de la tumeur (figure 26, selon les données de l'IARC TP53 de l'Organisation Mondiale de la Santé). Il s'agit dans 73% des cas de mutations somatiques faux-sens, qui vont engendrer des protéines présentant une mutation ponctuelle d'un acide-aminé. De plus, 95% des mutations de p53 sont réparties sur le DBD, et 28% sur seulement 6 résidus : R175, G245, R248, R249, R273 et R282 (figure 17, Vousden & Lu, 2002). Contrairement au p53 sauvage, maintenu à des bas niveaux, les protéines p53 mutées s'accumulent généralement très fortement dans les cellules. Les mutants de p53 sont divisés en deux groupes : les mutants de contacts dont



**Figure 26 : Les mutations de p53 au sein des tumeurs.** Répartition des mutations de p53 selon les différents types de cancer (gauche). Répartition des mutations de p53 dans les cancers (droite) (d'après l'International Agency for Research on Cancer IARC TP53 Database).

---

les mutations touchent des résidus directement impliqués dans la liaison à l'ADN, comme R248Q ou R273H, et les mutants de structures qui ont une conformation modifiée par rapport au p53 sauvage, comme R175H ou R282W (Cho *et al.*, 1994). Les mutants de p53 peuvent également être classés selon leur activité dans la cellule. Ils peuvent soit empêcher l'activité du p53 sauvage issu de l'allèle non muté (perte de fonctions), soit acquérir eux-mêmes des nouvelles activités, généralement dans le cas de mutant de structure (gain de fonctions) (revue par Liu *et al.*, 2014).

Les mutants de perte de fonction p53 ont une action de dominants-négatifs, due à leur capacité à se tétramériser avec le p53 sauvage, exprimé par le second allèle, diminuant ainsi son association à l'ADN et la trans-activation de gènes cibles (Kern *et al.*, 1992; Srivastava *et al.*, 1993). De nombreuses études ont ainsi démontré que les mutants de p53 suppriment le contrôle du cycle cellulaire ou l'apoptose quand ils sont surexprimés dans les cellules et favorisent la progression de tumeur en modèle animal (revue par Goh *et al.*, 2011). Des analyses biochimiques montrent que les mutants de p53 sont peu capables d'inhiber la transcription au sein du tétramère, nécessitant un ratio de trois mutants pour un p53 sauvage avant de bloquer l'activité transcriptionnelle (Chan *et al.*, 2004). A noter que le p53 mutant s'accumule fortement dans la plupart des cellules cancéreuses, rendant possible ce ratio de trois pour un. Un autre mécanisme décrit comme participant à la perte de fonction de p53 est l'agrégation de mutants de conformation de p53. En effet, des agrégats de p53 mutés, en structures de haut poids moléculaire, ont été observés dans des échantillons de tumeurs ou des lignées cancéreuses (Ano Bom *et al.*, 2012; Levy *et al.*, 2011). Une séquence APR (aggregation-prone region) est retrouvée au sein du cœur hydrophobe de p53 (Xu *et al.*, 2011). Les mutations de p53 peuvent entraîner son exposition et conduire à la nucléation de l'agrégation de la protéine : les régions APR s'auto-assemblent en une structure- $\beta$  formant un agglomérat de protéines. Il est proposé que les mutants de conformation de p53 ont un rôle dominant négatif, en entraînant la formation d'agrégats dans lesquels s'incorpore le p53 sauvage (Ishimaru *et al.*, 2003; Magzoub & Miranker, 2011; Silva *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2011). Les agrégats peuvent entraîner la lyse de la cellule (Lasagna-Reeves *et al.*, 2013). Les cellules voisines peuvent incorporer ces agrégats par macropinocytose, entraînant l'agrégation de leur propre p53, favorisant la progression tumorale (Forget *et al.*, 2013).

Alors que la perte de fonction par les mutants de p53 a longtemps été considérée comme seule responsable de la progression tumorale, des travaux ont révélé un rôle de gain de fonction des mutants de p53 (figure 27 ; revues par Liu *et al.*, 2014; Muller & Vousden, 2013). Ainsi, alors que le p53 sauvage ne s'oligomérisse pas avec les autres membres de sa famille, certains mutants de p53 sont capables d'interagir avec p63 et p73 inhibant leurs fonctions ou entraînant leur agrégation (Xu *et al.*, 2011). Les mutants de p53 peuvent interagir avec de nombreux facteurs de transcription, modulant leurs fonctions positivement ou négativement (figure 27). Cela conduit à une régulation transcriptionnelle aberrante de nombreuses protéines, impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, le métabolisme, ou encore l'architecture tissulaire (Di Agostino *et al.*, 2006; Chicas *et al.*, 2000; Freed-Pastor *et al.*, 2012; Stambolsky *et al.*, 2010). Les mutants

Model	Description	Examples
<p>1</p>	<p>Les mutants se lient directement sur diverses régions de l'ADN et régulent la transcription, possiblement en impliquant d'autres protéines et cofacteurs</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li> PML, EGR1, TOP1</li> <li> p300</li> </ul>
<p>2a</p>	<p>Les mutants augmentent la transcription en formant des complexes avec des facteurs de transcription et leurs cofacteurs et autres protéines régulatrices</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li> EGR1, TopBP1, PIN1, VDR</li> <li> ETS1, NF-κB, p63, p73, SP1, SREBP, NF-Y, ETS2</li> <li> p300, HDAC, CBP</li> </ul>
<p>2b</p>	<p>En réponse à un stimulus, les mutants recrutent des complexes de régulation transcriptionnelle, incluant facteurs de transcription, cofacteurs et protéines régulatrices</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li> VDR, PLK2</li> <li> NF-Y, SP1</li> <li> p300</li> </ul> <p>stimulus: TPA, vitamin D, DNA damage</p>
<p>3</p>	<p>Les mutants diminuent la transcription en se fixant aux facteurs de transcription, cofacteurs, protéines régulatrices, empêchant leur fixation sur l'ADN et/ou entraînant leur agrégation</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li> TopBP1, ANKRD11, VDR, SMAD2</li> <li> p63, p73, SP1</li> <li> p300</li> </ul>
<p>4</p>	<p>Les mutants interagissent avec des protéines non impliquées dans la transcription et modulent leurs activités</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li> NRD1, EFEMP2, TOP1, BTG2, MRE11</li> </ul>

**Figure 27 : Modèles des mécanismes d'action des p53 mutés** (d'après Muller & Vousden, 2013).

---

de p53 promeuvent aussi l'instabilité génétique en interagissant avec la topo-isomérase-1, ou encore MRE11, DNA nucléase impliquée dans la recombinaison homologue de l'ADN (Restle *et al.*, 2008; Song & Xu, 2007). Les mutants de p53 pourraient se lier à l'ADN, mais, contrairement au p53 sauvage, ils ne disposent pas d'élément de réponse spécifique (Göhler *et al.*, 2005). Ils se fixent alors sur des structures particulières de l'ADN modulant directement la transcription de gènes ou en recrutant des facteurs modifiant la structure de la chromatine. Par toutes ces modulations, les mutants de p53 participent à la progression tumorale, à la migration cellulaire et à l'invasion (Muller *et al.*, 2011).

La réactivation de la voie p53 est une stratégie prometteuse dans la lutte contre le cancer. De nombreuses molécules ont été développées dans ce cadre, avec différentes actions possibles : l'activation du p53 sauvage par sa stabilisation, ou la réactivation des mutants de p53 en rétablissant sa conformation (Khoo *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014). De nombreux composés ciblent l'interaction entre les ubiquitine-ligases et p53, afin de stabiliser ce dernier (table 1). Le premier composé présentant la capacité de dissocier MDM2/p53 est la Nutlin (Roche), dont des homologues sont actuellement en phase I d'essai clinique (NCT01164033, NCT01143740, NCT00623870, et NCT00559533) dans les tumeurs solides avancées, les malignités hématologiques, et les liposarcomes. Ils sont bien tolérés et présentent des activités cliniques (Saha *et al.*, 2013). Au niveau cellulaire, la Nutlin entraîne une accumulation de p53, notamment au niveau cytoplasmique et mitochondrial en favorisant l'apoptose de façon indépendante de l'activité transcriptionnelle (Vaseva *et al.*, 2009a). La Nutlin se fixant à MDM2, elle ne stabilise pas seulement p53, mais empêche l'ubiquitination de l'ensemble des cibles de MDM2, pouvant entraîner des effets secondaires. RITA inhibe également les complexes des ubiquitine-ligases avec p53, mais en ciblant le suppresseur de tumeur, évitant ainsi des effets sur d'autres voies régulées par MDM2 (pRb/E2F1, ...). Une autre stratégie consiste à restaurer la conformation des mutants de p53 en une conformation sauvage. Ces molécules modulent l'activité des mutants de structures, mais pas des mutants de contact. Parmi celles-ci, PRIMA se lie de façon covalente aux cystéines du DBD de p53 entraînant une modification conformationnelle des molécules de p53 mutés qui retrouvent une structure et des fonctions similaires au p53 sauvage.

---

## D. Régulation de la famille Bcl-2 par p53

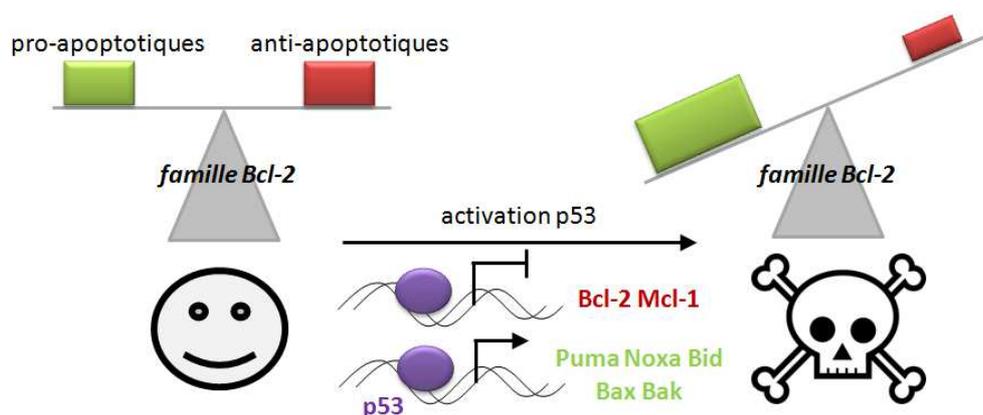
Les protéines de la famille Bcl-2 contrôlent le déclenchement de la voie intrinsèque de l'apoptose. L'activation de p53, suppresseur de tumeur majeur, régule ce déclenchement à différents niveaux, facilitant l'apoptose. En effet, si p53 est capable de moduler transcriptionnellement l'expression de membres de la famille Bcl-2, il a plus récemment été décrit comme capable d'interagir directement avec eux, à la mitochondrie (Mihara *et al.*, 2003).

### 1) Régulation transcriptionnelle de la famille Bcl-2 par p53

Dès 1994, Selvakumaran *et al* ont décrit la régulation de la balance Bax/Bcl-2 par p53. Ainsi, l'expression ectopique de p53 dans des cellules M1 de leucémie myeloïde entraîne une augmentation rapide de l'expression de Bax et une diminution celle de Bcl-2 (Selvakumaran *et al.*, 1994). Le promoteur de Bax contient quatre séquences présentant des homologies avec les sites consensus de liaison avec p53 (Miyashita & Reed, 1995). Le second pro-apoptotique effecteur, Bak est également une cible transcriptionnelle de p53 (Kannan *et al.*, 2001). Le suppresseur de tumeur module également l'expression de plusieurs BH3-seuls. Ainsi, Oda *et al* ont montré que le traitement de cellules murines primaires aux rayons X entraîne une induction de Noxa, dépendante de p53, nécessaire pour le déclenchement de l'apoptose (Oda *et al.*, 2000). L'équipe du professeur Volgenstein décrit en 2001 le gène PUMA (p53 upregulated mediator of apoptosis) dont le promoteur comprend deux éléments de réponse à p53, essentiel à son expression (Yu *et al.*, 2001). Ce gène code pour la protéine à BH3-seul Puma qui est induite rapidement par p53 lors de traitements génotoxiques, entraînant une mort rapide dans diverses lignées. Ainsi dans la lignée SaOs2 mutée pour p53, l'expression de p53 ectopique sensibilise les cellules à la doxorubicine, via l'induction de Puma suite au traitement (Nakano & Vousden, 2001). L'affinité de p53 mesurée en immunoprécipitation de chromatine quantitative étant plus forte pour le promoteur de Puma que pour le promoteur de Bax, le BH3-seul est un médiateur clef de la réponse apoptotique par p53 (Kaeser & Iggo, 2002). Le suppresseur de tumeur permet également l'induction de Bid, reliant les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose (Sax *et al.*, 2002).

En plus de son activation des gènes des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, p53 peut réprimer ceux des anti-apoptotiques (Selvakumaran *et al.*, 1994). Des éléments de réponses négatifs du suppresseurs de tumeur ont notamment été identifiés sur le promoteur de Bcl-2 (Miyashita *et al.*, 1994). Ainsi, p53 exprimé de façon ectopique dans des lignées hématopoïétiques se fixe sur le promoteur de Bcl-2, et inhibe son expression (Wu *et al.*, 2001). Par ailleurs l'expression ectopique de p53 entraîne également une diminution dose dépendante du niveau de Mcl-1 dans plusieurs lignées cellulaires humaines (Pietrzak & Puzianowska-Kuznicka, 2008). La fixation du facteur de transcription SP1 sur le promoteur du gène de Mcl-1 est diminuée en présence de p53. Le suppresseur de tumeur réprime donc l'expression d'au moins deux des principaux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

La protéine p53 joue largement son rôle de suppresseur de tumeur par la modulation transcriptionnelle des membres de la famille Bcl-2. En stimulant l'expression des pro-apoptotiques effecteurs et BH3-seuls et en réprimant l'expression des anti-apoptotiques, p53 déplace l'équilibre en faveur de la mort cellulaire (figure 28). Il participerait alors au *priming* des cellules, favorisant le déclenchement de l'apoptose.



**Figure 28 : p53 module transcriptionnellement la balance entre membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.** La protéine p53 activée par divers stimuli (dommage à l'ADN, stress métabolique, ...) va réprimer la transcription de membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et activer la transcription de membres pro-apoptotiques, déplaçant l'équilibre en faveur de la mort cellulaire.

---

## 2) Interactions de p53 avec des anti-apoptotiques

En parallèle de son activité de facteur de transcription, un nombre croissant d'études montre, depuis une dizaine d'années, que p53 favorise également la mort cellulaire au niveau cytoplasmique et mitochondrial. La translocation mitochondriale de p53 est observable dès 30 min après irradiation dans différents tissus *in vivo* et précède la transcription de gènes cibles au noyau, permettant une réponse apoptotique rapide (Erster *et al.*, 2004). Cette fonction mitochondriale est donc particulièrement importante pour la réponse apoptotique et engage notamment des interactions directes avec les membres de la famille Bcl-2.

En 2000, l'équipe du professeur Ute Moll a décrit l'accumulation rapide de p53 à la surface des mitochondries, suite à des dommages à l'ADN ou hypoxiques conduisant à la mort cellulaire dans diverses lignées humaines et murines (Marchenko *et al.*, 2000). Cette accumulation n'est pas observée lors de l'arrêt du cycle dépendant de p53, ou d'une apoptose induite indépendamment de p53. Cette fraction de p53 à la mitochondrie serait donc impliquée dans le déclenchement de l'apoptose par p53. L'utilisation d'un vecteur d'expression de p53 fusionné à une séquence d'adressage à la mitochondrie et dépourvue d'activité transcriptionnelle montre en effet que l'expression de ce p53 mitochondrial est suffisante pour induire l'apoptose dans les lignées testées (Mihara *et al.*, 2003). Les auteurs décrivent l'interaction entre p53 via son DBD et les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. Ils examinent ces complexes par immunoprécipitation dans différentes lignées après expression ectopique de p53 mitochondrial, ou après un stress conduisant à l'accumulation mitochondriale du p53 endogène sauvage. Les principaux mutants de p53 dérivés de tumeurs, endogènes dans les lignées ou exprimés de façon ectopique, n'interagissent pas avec les anti-apoptotiques et n'entraîne pas de mort cellulaire. Ces données suggèrent que p53 participerait au déclenchement de l'apoptose en interagissant avec les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 à la mitochondrie. En accord avec cette hypothèse, l'incubation de mitochondries isolées avec du p53 recombinant sauvage entraîne un relargage de cytochrome c qui est inhibé par un excès de Bcl-xL (Mihara *et al.*, 2003).

L'étude des complexes entre le suppresseur de tumeur et les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 par résonance magnétique nucléaire a confirmé l'implication du DBD de p53 dans son interaction avec Bcl-2 et Bcl-xL, mais aussi plus récemment Mcl-1 ou Bcl-w (Lee *et al.*, 2014; Petros *et al.*, 2004; Tomita *et al.*, 2006). p53

se fixe, via son DBD majoritairement basique, à la surface acide des anti-apoptotiques, éloignée de la poche hydrophobe -en particulier l'hélice  $\alpha 1$ , les boucles entre les hélices  $\alpha 3$ - $\alpha 4$  et les hélices  $\alpha 5$ - $\alpha 6$ . Par ailleurs, le DBD de p53 ne se lie pas à Bcl-xL en présence du BH3 de Bad (Petros *et al*, 2004). En accord avec ce résultat, Chipuck *et al* a montré que la fixation du BH3-seul Puma dans la poche hydrophobe de Bcl-xL entraîne le déplacement de p53 (Chipuk *et al.*, 2005). Cette équipe a proposé un mécanisme moléculaire pouvant être impliqué dans le déplacement de p53 de Bcl-xL par Puma (Follis *et al.*, 2013). L'insertion du BH3 de Puma dans la poche de Bcl-xL permet l'interaction aromatique pi-pi-stacking entre le résidu histidine-113 de l'hélice  $\alpha 3$  de Bcl-xL et le tryptophane-71 particulier du BH3-seul. Cette interaction entraîne le dépliage de l'hélice  $\alpha 3$  de Bcl-xL, perturbant la boucle  $\alpha 3$ - $\alpha 4$  et pouvant expliquer le déplacement de p53 de son site de fixation. Dans ce modèle, lors d'un stress cellulaire p53 serait stabilisé mais séquestré par Bcl-xL au niveau du cytoplasme. Le p53 accumulé au noyau activerait l'expression de Puma qui, en interagissant avec Bcl-xL, libérerait p53 qui aurait lui-même une fonction pro-apoptotique directe à la mitochondrie (figure 29A). En accord avec cette hypothèse, le traitement au BH3-mimétique ABT-737 diminue -sans abroger complètement- l'immunoprécipitation entre p53 et Bcl-xL (Follis *et al.*, 2014).

Hagn *et al* ont confirmé en résonance magnétique nucléaire les surfaces d'interaction du DBD de p53 sur Bcl-xL (Hagn *et al.*, 2010) Cependant leurs résultats indiquent que l'interaction avec p53 entraînerait une ouverture des hélices  $\alpha 3$  et  $\alpha 4$  de Bcl-xL facilitant la liaison avec des peptides BH3. Les auteurs suggèrent qu'en favorisant les interactions de Bcl-xL avec les BH3-seuls, p53 favoriserait la dissociation des complexes entre Bcl-xL et les pro-apoptotiques effecteurs Bax et Bak (figure 29 B). En accord avec cette hypothèse, une étude antérieure montre en immunoprécipitation que le p53 ectopique ou stabilisé à la suite d'un traitement au cisplatine se fixe à la boucle flexible de Bcl-2 (aa 32-68), entraînant la dissociation de Bax de la poche hydrophobe de Bcl-2 (Deng *et al.*, 2006). Par ailleurs, dans la publication de Mihara *et al*, les auteurs ne détectent pas de Bax coimmunoprécipité avec p53 en présence de Bcl-xL, suggérant l'absence de complexe ternaire p53/Bcl-xL/Bax en accord avec une libération de Bax de Bcl-xL lorsque p53 y est fixé (Mihara *et al.*, 2003). Les résultats récents de Follis *et al* confirment en résonance magnétique nucléaire l'importance du DBD de p53 pour l'interaction avec Bcl-xL, ainsi que la modulation de la conformation de l'anti-apoptotique suite à cette interaction. Par des mesures calorimétriques isothermales, ils

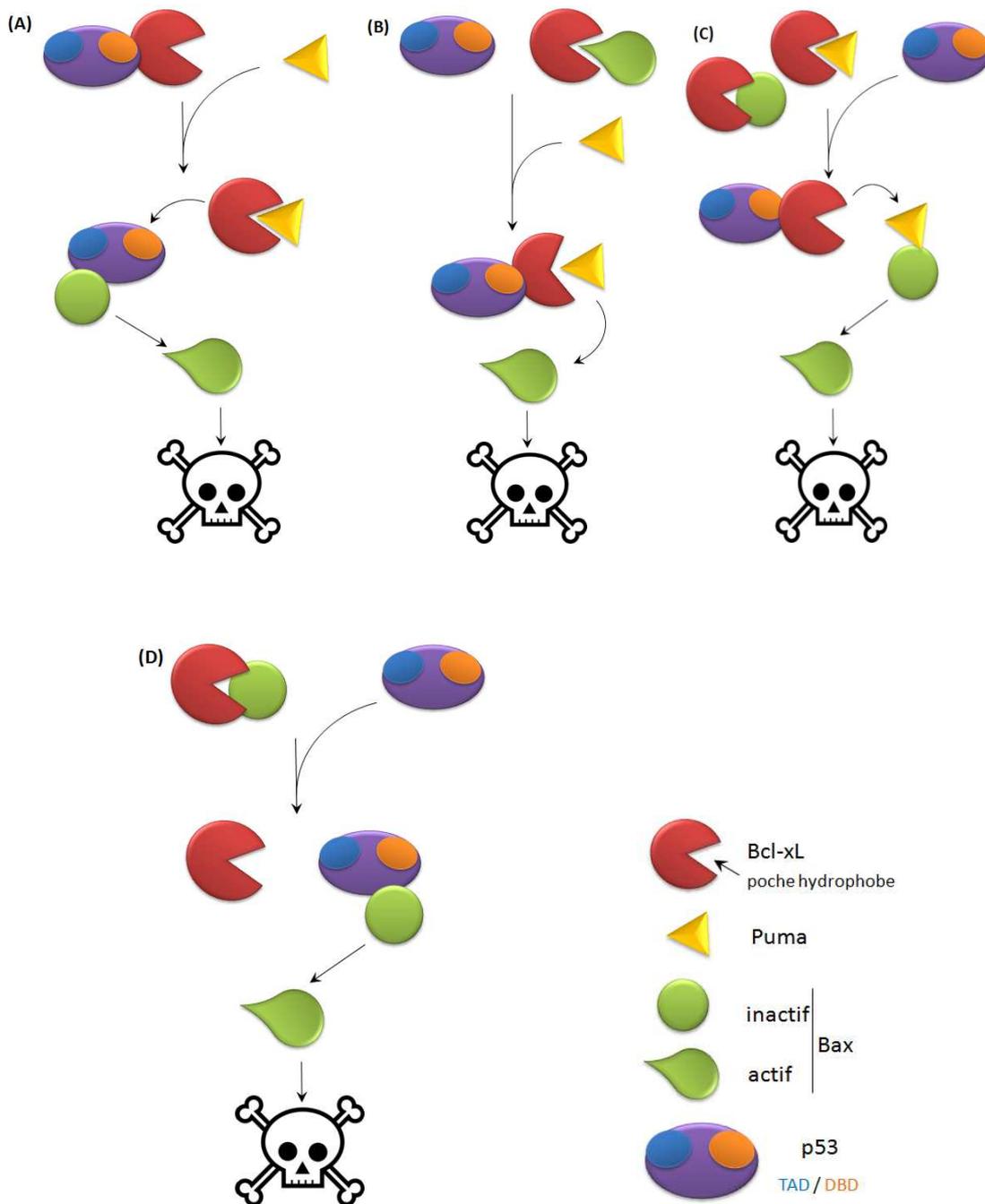
---

ont observé une augmentation faible de l'affinité de Bcl-xL pour le peptide BH3 de Bid après fixation de p53. Toutefois, la liaison de Bcl-xL avec Bax est maintenue lors de la stabilisation de p53 par exposition aux UV.

Les modalités de l'interaction entre le DBD de p53 et la surface acide en dehors de la poche hydrophobe des anti-apoptotiques - notamment Bcl-xL - sont désormais bien caractérisées. Ses conséquences restent néanmoins à clarifier que ce soit sur les activités du suppresseur de tumeur ou sur le réseau de protéines de la famille Bcl-2.

Han *et al* ont proposé un troisième modèle, impliquant une interaction compétitive entre Bim et p53 au niveau de la poche des principaux anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 (Han *et al.*, 2010). Ils décrivent un mécanisme par lequel p53, en se fixant aux anti-apoptotiques, peut libérer des BH3-seuls, alors capables d'activer Bax et Bak (figure 29 C). Cette hypothèse de compétition directe est confortée par l'existence d'une seconde interface de liaison entre le domaine N-terminal de p53 (aa 15-29, SN15 ou TAD1, et aa39-57 soit TAD2) et la poche hydrophobe de Bcl-xL et Bcl-2 (Bharatham *et al.*, 2011; Ha *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2013). Une comparaison des interactions de p53 avec Bcl-xL et Mcl-1 testées en résonance magnétique nucléaire et mesure calorimétrique isothermale montre que la liaison du DBD de p53 est faible sur Mcl-1, contrairement à Bcl-xL (Yao *et al.*, 2013). En revanche, Mcl-1 a une bonne affinité pour le TAD de p53. La protéine p53 se lierait donc préférentiellement à Bcl-xL via son DBD, à l'interface opposée de la poche hydrophobe, et à Mcl-1 via son TAD au niveau de la poche. Ces résultats sont en accord avec ceux de Follis *et al.*, qui montrent que si le domaine N-terminal de p53 est capable de lier Bcl-xL, son DBD est le médiateur dominant de cette interaction (Follis *et al.*, 2014). Le domaine de tétramérisation de p53 ne participerait pas directement à l'interaction avec Bcl-xL mais la stimulerait. Les auteurs suggèrent que la tétramérisation de p53 puisse promouvoir l'interaction à Bcl-xL en augmentant les concentrations locales de DBD du suppresseur de tumeur.

Si les modèles diffèrent, il est désormais clair que p53 interagit avec les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sur au moins deux sites, avec des profils de liaisons différents selon les homologues de Bcl-2. Un faisceau de données appuie l'importance de ces interactions dans le déclenchement de l'apoptose. La formation de ces complexes pourrait ainsi moduler l'activité du suppresseur de tumeur, mais aussi moduler le réseau d'interactions des protéines de la famille Bcl-2 par des changements de conformations majeur des anti-apoptotiques.



**Figure 29 : Modélisation des interactions directes entre p53 et les membres de la famille Bcl-2.** (A) Le DBD de p53 se lie à la face opposée à la poche hydrophobe de Bcl-xL. La liaison de Puma dans la poche entraîne la libération de p53, qui peut activer Bax (Follis *et al*, 2013). (B) L'interaction du DBD de p53 avec Bcl-xL entraîne une ouverture de la poche, favorisant l'insertion des BH3-seuls, libérant ainsi les pro-apoptotiques effecteurs (Hagn *et al*, 2010). (C) p53, en se fixant par son TAD dans la poche hydrophobe de Bcl-xL, libère ses partenaires pro-apoptotiques (Han *et al*, 2010). (D) p53 interagit directement avec Bak, le libérant de Mcl-1 et permettant son activation (Leu *et al*, 2004). Les anti-apoptotiques sont représenté en rouge, les BH3 seuls en jaune, Bax et Bak en vert, et p53 en violet, avec le TAD en bleu et le DBD en orange.

### 3) Activation des pro-apoptotiques effecteurs

En 2004, Chipuk *et al* ont décrit une activation directe de Bax par p53 (Chipuk *et al.*, 2004). Ils ont montré que la protéine p53 immuno-purifiée à partir de MCF7 préalablement irradiées (p53<sup>UVIP</sup>) ne peut pas perméabiliser les mitochondries isolées, de même que le Bax recombinant seul. En revanche, l'incubation des mitochondries isolées avec Bax et des concentrations croissantes de p53<sup>UVIP</sup> entraîne une perméabilisation dose dépendante. L'ajout de p53<sup>UVIP</sup> promeut également la formation d'oligomères de Bax recombinant en liposomes. Ces activités dépendent du domaine riche en proline, un p53 délété pour ce domaine (aa 62-91) ne reproduisant pas ces effets. Cette activation de Bax par p53<sup>UVIP</sup> en absence de toute autre protéine démontre une relation directe entre ces deux acteurs. Toutefois, les auteurs soulignent leur incapacité à détecter une interaction physique entre Bax et p53. L'absence d'interaction détectable entre Bax et p53 avait déjà été notée par Mihara *et al.*, par des expériences d'immunoprécipitations de protéines endogènes ou exogènes en lignée humaine (Mihara *et al.*, 2003). Les auteurs avaient également remarqué que la surexpression de Bax ne permet pas de moduler le complexe entre p53 et Bcl-xL, suggérant que Bax ne pouvait tamponner p53. L'interaction directe de p53 avec Bax reste alors une hypothèse controversée. L'équipe de Chipuk intègre néanmoins ces données à leur modèle décrit ci-dessus, proposant un système dans lequel p53 est séquestré par Bcl-xL (Follis *et al.*, 2013). L'incubation de mitochondries isolées avec p53<sup>UVIP</sup> et Bax recombinant entraîne la libération de cytochrome c, qui est inhibée en présence de Bcl-xL recombinant. Puma réprime cette inhibition par Bcl-xL via son BH3, en interagissant avec la poche hydrophobe et entraînant un changement de conformation de l'anti-apoptotique. Les auteurs ont alors observé une dissociation de p53 de Bcl-xL par Puma ou par son peptide BH3, permettant l'activation de Bax par le suppresseur de tumeur. Il est à noter que dans ce modèle, le potentiel activateur de Puma lui-même n'a pas été évalué.

L'interaction de p53 avec le second pro-apoptotique effecteur Bak est mieux documentée (figure 26 D). Dès 2004, une étude a montré que l'incubation de mitochondries isolées avec du p53 recombinant entraîne une dissociation des complexes Mcl-1/Bak, concomitant avec la formation de complexes Bak/p53, l'oligomérisation de Bak et la perméabilisation mitochondriale (Leu *et al.*, 2004). L'étude *in vitro* de l'interaction de p53 avec Bak a permis de déterminer qu'elle met en jeu le cœur globulaire du suppresseur de tumeur, et est de plus faible affinité que l'interaction

---

entre p53 et Bcl-xL (Sot *et al.*, 2007). Les auteurs suggèrent alors que l'interaction p53/Bak intervient dans un second temps, après la libération de Bak des anti-apoptotiques par des BH3-seuls ou p53 lui-même. Pietsch *et al* ont observé que la liaison de p53 à Bak se ferait via des résidus conservés du DBD (Pietsch *et al.*, 2008), notamment le résidu R-280 également impliqué dans la liaison à l'ADN et à Bcl-xL (Petros *et al*, 2004) et le résidu K120. L'interaction entre p53 et Bak impliquerait également la présence du domaine de tetramérisation du suppresseur de tumeur, potentiellement en augmentant la concentration locale de p53 selon le modèle proposé pour Bcl-xL (Follis *et al.*, 2014; Pietsch *et al.*, 2007). Plusieurs études indiquent ainsi qu'une activation directe des effecteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 par p53 est possible. La structure des complexes entre p53 et Bak semble proche de ceux entre p53 et Bcl-xL, bien que d'affinité moindre. Etant donné la similarité entre ces protéines et Bax, on peut s'attendre à ce qu'une interaction entre p53 et cet effecteur ait des modalités similaires, mais une telle interaction physique n'a pas à ce jour été décrite. Il faut noter que peu d'études se penchent sur l'interaction physique entre p53 et les pro-apoptotiques BH3-seuls. Seule une publication à ce jour montre par l'utilisation de protéines recombinantes en GST-pulldown qu'une liaison *in vitro* est possible entre le DBD de p53 et Puma ou Noxa (Park *et al.*, 2012).

Il semble donc que p53 soit capable de moduler les réseaux d'interactions de la famille Bcl-2 en ciblant physiquement les anti-apoptotiques, mais aussi en liant directement les pro-apoptotiques effecteurs. Bien que controversées, ces études suggèrent une activation directe de Bax et Bak par p53. Par ces différentes voies, p53 peut au niveau cytoplasmique déclencher rapidement une mort massive des cellules. Des nouvelles stratégies thérapeutiques, ciblant p53 à la mitochondrie, peuvent alors être envisagées (Galluzzi *et al.*, 2008; Vaseva *et al.*, 2009a).

---

## E. Objectifs de la thèse

L'ABT-737 est un composé chimique qui rompt les interactions entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, favorisant le déclenchement de la mort cellulaire. Au laboratoire, ce composé a été utilisé pour démontrer le rôle activateur, et pas seulement sensibilisateur, du BH3-seul Puma (Gallenne et al, 2009). Dans ce cadre, le traitement à l'ABT-737 des cellules de la lignée colorectale modèle HCT116 déplétées en p21, entraîne une libération rapide de l'effecteur Bax de Bcl-xL. La présence de Puma est requise pour l'activation de Bax et le déclenchement de l'apoptose. Cependant, les suppresseurs de tumeurs peuvent moduler les protéines de la famille Bcl-2, soit en régulant transcriptionnellement leur expression, soit par des interactions protéine/protéine. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'effet de deux voies majeures de suppression tumorale, à savoir la voie pRb/E2F1 et la voie p53, sur la réponse apoptotique induite par l'ABT-737 modulée par les membres de la famille Bcl-2.

Contrairement aux HCT116 p21<sup>-/-</sup>, certaines lignées présentent une apoptose tardive suite au traitement à l'ABT-737, à partir de 48h. Ce délai peut être le signe de la nécessité d'une réponse transcriptionnelle pour le déclenchement de la mort. En 2011, Song *et al* ont montré que le traitement de cellules de carcinome rénal PV-10 par l'ABT-737 entraîne l'activation transcriptionnelle de 430 gènes (Song *et al.*, 2011). Parmi ces gènes, PMAIP1, codant Noxa. Ce BH3-seul pourrait être impliqué dans la sensibilisation des cellules, de par son inhibition de Mcl-1, principal frein à la réponse à l'ABT-737 car non ciblé par celui-ci. Le délai de réponse à l'ABT-737 étant notamment observé dans des lignées mutées pour p53, et Noxa étant régulé transcriptionnellement par E2F1, nous nous sommes demandé si la voie E2F1/pRb pouvait être impliquée dans la sensibilisation à long terme des cellules au BH3-mimétique. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de la sensibilité de ces lignées, et en particulier à l'implication de la modulation de la transcription par pRb/E2F1 en réponse au BH3-mimétique.

Nous avons également observé que les cellules HCT116 parentales et p53<sup>-/-</sup> sont résistantes à l'ABT-737, contrairement à la lignée déficiente pour p21. Cette lignée p21<sup>-/-</sup> est décrite comme hyper-sensible à divers stimuli apoptotiques, que ce soit du fait de l'absence de p21 dans le cas de carence en nutriment (Braun *et al.*, 2011), ou de la forte expression en p53 qui la caractérise lors de traitements à différents agents

anticancéreux (Ferrandiz *et al.*, 2009). La mise sous silence de p21 ne permettant pas de sensibiliser les cellules de la lignée parentale à l'ABT-737, nous avons pu montrer que la sensibilité des p21<sup>-/-</sup> au BH3-mimétique est liée à la forte expression du suppresseur de tumeur. La seconde partie de ma thèse a été alors consacrée à la compréhension du rôle de p53 dans la sensibilité au BH3-mimétique.

Ces données devront permettre de mieux comprendre les régulations de l'apoptose par la famille Bcl-2 et les voies de suppressions tumorales, dans l'espoir de lever les résistances des cellules cancéreuses aux BH3-mimétiques.

Dans les cellules tumorales, les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont fréquemment surexprimées, favorisant la survie cellulaire et la résistance aux chimiothérapies (Warr & Shore, 2008). Des molécules inhibant ces anti-apoptotiques en mimant le domaine BH3 ont de ce fait été développées, afin de contourner l'action de ces protéines. Une de ces molécules, l'ABT-737, permet la libération des partenaires des protéines Bcl-2 et Bcl-xL en s'insérant dans leur poche hydrophobe et favorisant le déclenchement de l'apoptose. Le réseau d'interactions entre les protéines de la famille Bcl-2 est un élément essentiel dans la réponse aux BH3-mimétiques. De cette balance entre les membres pro- et anti-apoptotiques dépend l'amorce ou *priming* des cellules qui sont plus ou moins susceptibles de déclencher les signaux apoptotiques (Sarosiek *et al.*, 2013). Cependant, d'autres paramètres entrent en jeu dans la réponse à l'ABT-737 et complexifient le contrôle de l'issue du traitement. Une étude en FLIM-FRET montre que certains complexes protéiques de la famille Bcl-2 sont maintenus sous ABT-737, notamment les complexes de Bcl-xL avec Bim, alors que Bad ou encore Bid sont libérés de leur partenaires anti-apoptotiques (Liu *et al.*, 2012). Ces résultats, différents de ceux obtenus à partir des analyses *in vitro*, mettent en avant la nécessité d'étudier ces interactions dans des cellules vivantes. Par ailleurs, l'ABT-737 modifie le transcriptome des cellules traitées induisant de nombreux gènes dont le BH3-seul Noxa, qui peuvent en retour intervenir dans la réponse au BH3-mimétique (Song *et al.*, 2011). Les membres de la famille Bcl-2 sont également impliqués dans d'autres processus cellulaires que l'apoptose, qui peuvent alors être modulés en réponse au BH3-mimétique (section B2f de l'introduction). Enfin, l'ABT-737 ne cible pas l'ensemble des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, et Mcl-1 notamment constitue un frein majeur au déclenchement de l'apoptose par ce composé (Gallenne *et al.*, 2009). Cette complexité nécessite de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu suite à l'inhibition des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Par ailleurs, les voies p53 et pRb/E2F1 étant fréquemment altérées dans les cancers et ces altérations étant associées à la résistance aux thérapies anticancéreuses, il est intéressant d'évaluer le rôle de ces suppresseurs de tumeurs dans l'apoptose induite par les BH3-mimétiques.

---

## A. Implication de la voie pRb/E2F1 dans la réponse à l'ABT-737

Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur l'implication de la voie pRb/E2F1 dans la réponse à l'ABT-737. La protéine E2F1 diffère des autres membres de la famille E2F par son activité pro-apoptotique inédite, particulièrement régulée par la protéine à poche pRb. La voie de suppression tumorale pRb/E2F1 est fréquemment altérée dans les tumeurs, pouvant notamment conduire à la résistance aux thérapies (Engelmann & Pützer, 2012). Nous nous sommes alors demandés dans quelle mesure cette voie joue un rôle dans l'apoptose déclenchée par le BH3-mimétique.

Afin de nous focaliser sur l'implication de la voie pRb/E2F1, nous avons utilisé des lignées mutées pour p53 : une lignée de glioblastome U251 et trois lignées de cancers du sein MDA-MB-231, MDA-MB-468 et BT-549 (cette dernière présentant également une inactivation de pRb). Dans ce travail publié dans *Cell Death and Differentiation* en mai 2013, nous décrivons un processus inédit, par lequel une activation sub-létale des caspases, lors d'un traitement à l'ABT-737, entraîne le clivage de pRb. Suite à ce clivage il y a formation d'un complexe entre la forme tronquée de 68KDa de pRb et E2F1, complexe qui est recruté sur le promoteur de Noxa, entraînant sa transactivation. L'augmentation de l'expression de Noxa contribue à inhiber l'anti-apoptotique Mcl-1 qui est le frein majeur du déclenchement de l'apoptose car il n'est pas inhibé efficacement par l'ABT-737. Les cellules présentent alors une apoptose tardive, après 48h de traitement, dépendante de E2F1 et pRb. En accord avec ces résultats, la réactivation de la voie pRb/E2F1, par la Nutlin3a favorise la sensibilité à l'ABT-737 des cellules exprimant un faible niveau de pRb. Au cours de ma thèse, j'ai notamment étudié cette sensibilisation à l'ABT-737 par la Nutlin3a stabilisant pRb dans les lignées mutées pour p53, les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-468. La protéine pRb stabilisée par la Nutlin3a est clivée lors d'un traitement à l'ABT-737. Ce clivage entraîne l'induction de Noxa inhibant Mcl-1, conduisant au déclenchement de l'apoptose. En revanche, la Nutlin3a ne permet pas de sensibiliser une lignée présentant à la fois des altérations de p53 et de pRb (lignée BT-549).

Cette étude est en accord avec la notion que le déclenchement de la perméabilisation peut être limité à une partie des mitochondries dans la cellule (Tait *et al.*, 2010). Cette perméabilisation partielle lors du traitement à l'ABT-737 peut conduire à l'activation sub-létale d'un bas niveau de caspases. Le pRb clivé par les caspases

entraîne la modulation de l'expression de Noxa en coopération avec E2F1. Le BH3-seul inhibe alors Mcl-1, principal frein à la sensibilité à l'ABT-737, permettant l'amplification de la perméabilisation mitochondriale et de l'activation des caspases, et le déclenchement de l'apoptose.

1- Article : "pRb/E2F-1-mediated caspase-dependent induction of Noxa amplifies the apoptotic effects of the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737"

Bertin-Ciftci J, Barré B, Le Pen J, Maillet L, Couriaud C, Juin P, Braun F

# pRb/E2F-1-mediated caspase-dependent induction of Noxa amplifies the apoptotic effects of the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737

J Bertin-Ciftci<sup>1</sup>, B Barré<sup>2</sup>, J Le Pen<sup>1</sup>, L Maillet<sup>1</sup>, C Couriaud<sup>1</sup>, P Juin<sup>\*,1,3</sup> and F Braun<sup>\*,1</sup>

Although Bcl-2 family members control caspase activity by regulating mitochondrial permeability, caspases can, in turn, amplify the apoptotic process upstream of mitochondria by ill-characterized mechanisms. We herein show that treatment with a potent inhibitor of Bcl-2 and Bcl-xL, ABT-737, triggers caspase-dependent induction of the BH3-only protein, Mcl-1 inhibitor, Noxa. RNA interference experiments reveal that induction of Noxa, and subsequent cell death, rely not only on the transcription factor E2F-1 but also on its regulator pRb. In response to ABT-737, pRb is cleaved by caspases into a p68Rb form that still interacts with E2F-1. Moreover, pRb occupies the *noxa* promoter together with E2F-1, in a caspase-dependent manner upon ABT-737 treatment. Thus, caspases contribute to trigger the mitochondrial apoptotic pathway by coupling Bcl-2/Bcl-xL inhibition to that of Mcl-1, via the pRb/E2F-1-dependent induction of Noxa.

*Cell Death and Differentiation* (2013) 20, 755–764; doi:10.1038/cdd.2013.6; published online 22 February 2013

The Bcl-2 family, composed of anti- and pro-apoptotic proteins, are major regulators of apoptosis<sup>1–4</sup> upstream of mitochondrial permeability and caspase activity. Pro-apoptotic proteins include *multi-domain* proteins, such as Bax and Bak, and their upstream effectors the Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins, such as Bid, Bim, Puma, Bad, Noxa and so on. The anti-apoptotic members are frequently overexpressed in cancer cells and they promote survival, in great part, by physically interacting with the BH3 domain of their pro-apoptotic counterparts. Small molecules that bind to the BH3-binding groove of Bcl-2 homologs (the so-called ‘BH3 mimetics’) have been developed as pro-apoptotic inhibitors of these proteins.<sup>5</sup> There are subtle yet significant differences in the BH3-binding interfaces of Bcl-2 homologs: Bim or Puma interact with all known Bcl-2 homologs, whereas Bad interacts preferentially with Bcl-2 and Bcl-xL and Noxa with Mcl-1.<sup>6,7</sup> These differences explain why currently known BH3-mimetics only inhibit subsets of anti-apoptotic proteins.<sup>8</sup> One of these compounds is ABT-737, which occasionally presents *in vitro* monotherapy toxicity.<sup>5</sup> It potently inhibits the BH3-binding activity of Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-w but not that of Mcl-1 and Bfl-1.<sup>9</sup> ABT-737 promotes cell death by displacing, from its targets, ‘BH3 activators’ such as Bim or Puma (BH3-only proteins that can directly activate multi-domain proteins when free from anti-apoptotic proteins)<sup>10,11</sup> and/or active Bax.<sup>12</sup> Efficient induction of apoptosis by ABT-737 requires that pro-apoptotic proteins are not sequestered by an excess of empty

Mcl-1 or Bfl-1 that are not efficiently inhibited by ABT-737. Thus, sensitivity to ABT-737 is enhanced by combined treatments that decrease Mcl-1 expression and/or induce Noxa, a BH3-only protein that essentially functions as an inhibitor of Mcl-1.<sup>13–18</sup>

ABT-737 is a powerful tool to investigate how death signals induced by direct inhibition of subsets of anti-apoptotic Bcl-2 family members lead to cell demise. Caspase activity contributes to the final stages of cell death induced by inhibition of Bcl-2 homologs. However, executioner caspases were found to be required for full-blown Bax activation and mitochondrial permeabilisation in response to diverse stimuli.<sup>19</sup> In addition, when caspase activity is blocked, subsets of mitochondria remain refractory to permeabilisation and allow cells to survive to death stimuli.<sup>20,21</sup> Thus, caspase activity might also amplify the apoptotic process upstream of mitochondria, and fuel signals initiated by inhibition of some Bcl-2 homologs by ill-characterized mechanisms.

It is notable that, whereas the pro-apoptotic activity of ABT-737 relies on the nearly immediate ability of this compound to disrupt pre-existing complexes,<sup>8,22</sup> its effects on whole cells sometimes take numerous days to be manifest, implying that *de novo* synthesis of key actors might intervene. ABT-737 treatment was shown to induce the transcription of death receptor 5<sup>23</sup> and to induce a twofold change in the transcription of nearly 430 genes when added to renal carcinoma cells.<sup>24</sup> Most relevantly here, low-level activation

<sup>1</sup>UMR 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; <sup>2</sup>UMR 892 INSERM/6299 CNRS/ Université de Angers, Team 12 “Therapeutic targeting of colorectal cancer” Institut de Cancérologie de l’Ouest, Centre de Lutte contre le Cancer Paul Papin, Angers, France and <sup>3</sup>Institut de Cancérologie de l’Ouest, Centre de Lutte contre le Cancer René Gauducheau, Saint Herblain, France

\*Corresponding author: P Juin or F Braun, CRCNA, UMR 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, IRS-JUN, 8 quai moncoussu, Nantes 44000, France. Tel: +00 3322 8080 293 or +00 3322 80800 320, Fax: +00 3322 80800 204;

E-mail: philippe.juin@univ-nantes.fr or frederique.braun@univ-nantes.fr

**Keywords:** apoptosis; Bcl-2 family; pRb/E2F-1; caspase; Noxa

**Abbreviations:** BH, Bcl-2 homology; ChIP, chromatin immunoprecipitation

Received 05.7.12; revised 18.12.12; accepted 07.1.13; Edited by RA Knight; published online 22.2.13

of the caspase cascade was incriminated in some of these transcriptomic effects.<sup>24</sup> Thus, caspases may contribute to the long-term biological effects of Bcl-2/Bcl-xL inhibition. Whether and how this could actually amplify cell death induced by such inhibition remains to be determined.

In this manuscript, we show that caspase activity contributes to the response of cancer cells to ABT-737 by promoting the transcriptional induction of Noxa. Transcriptional pathways known to modulate levels of the Bcl-2 protein family (including that of Noxa) involve p53 or E2F-1.<sup>25,26</sup> E2F-1 differs from that of other E2F family members due to its ability to regulate not only cell-cycle progression but also apoptosis as it directly induces the expression of p73, of caspase 3 and 7 and of some pro-apoptotic Bcl-2 family members.<sup>27–34</sup> We show here that E2F-1 is a major contributor of caspase-dependent induction of Noxa in response to ABT-737 treatment. Caspases cleave the E2F-1 regulator pRb in ABT-737-treated cells, giving rise to a p68Rb truncated form, which has a direct role in Noxa and cell death inductions together with E2F-1. Thus, caspase activity provides a feed-forward mechanism that amplifies the mitochondrial apoptotic pathway by coupling inhibition of Bcl-2/Bcl-xL to that of Mcl-1, via the induction of E2F-1 transcription of Noxa by a pRb-dependent mechanism.

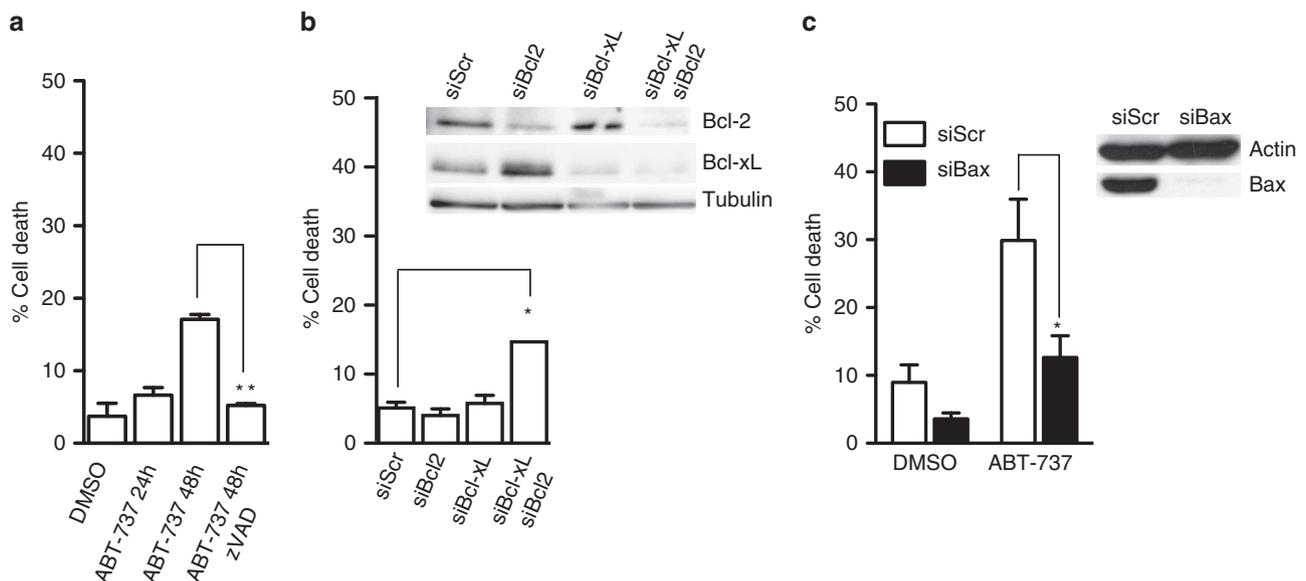
## Results

**ABT-737 induces late but specific Bax and caspase-dependent apoptosis in the glioma U251 cells.** The effects of ABT-737 were investigated on glioma U251 cells in which significant cell death rates were measured only after 48 h of treatment with 2  $\mu$ M of ABT-737, whereas no cell death was detected at earlier time points (Figure 1a). These delayed effects of ABT-737 were confirmed to be on-target

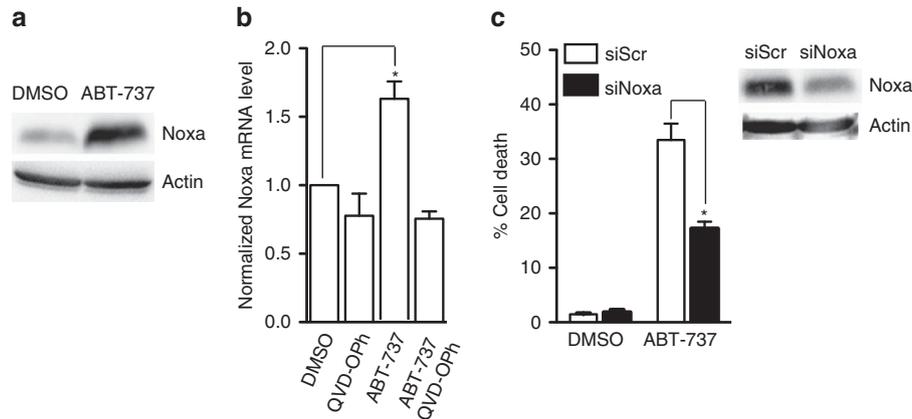
effects, as simultaneous silencing of Bcl-2 and Bcl-xL, but not that of either one alone, induced cell death at a similar rate to that measured upon ABT-737 treatment (Figures 1a and b). This indicates that the viability of U251 requires the sustained and combined activities of Bcl-2 and Bcl-xL. Consistent with a role for the canonical mitochondrial apoptotic pathway in delayed cell death that results from Bcl-2/Bcl-xL inhibition, knock down of Bax expression by siRNA significantly reduced cell death rates induced by ABT-737 treatment (Figure 1c). Finally, pre-treatment of U251 cells with a pan-caspase inhibitor before addition of ABT-737 inhibited cell death (Figure 1a), showing that the late effects of ABT-737 on cell viability rely on caspase activation.

**E2F-1-dependent induction of the BH3-only Noxa has a key role in the induction of U251 cell death by ABT-737.** The delayed effects on cell death of ABT-737 suggest that the mounting of a death signal, possibly via the *de novo* synthesis of a key factor, might contribute to the response. Kraft and colleagues recently identified the noxa gene (PMAIP1) as one gene whose expression is strongly induced by ABT-737.<sup>24</sup> Consistently, we observed a strong increase of Noxa expression in U251 cells upon ABT-737 treatment at both protein and mRNA levels (Figures 2a and b). Importantly, silencing of Noxa significantly decreased cell death rates induced by ABT-737 treatment (Figure 2c), indicating that such induction has a role in cell death induction.

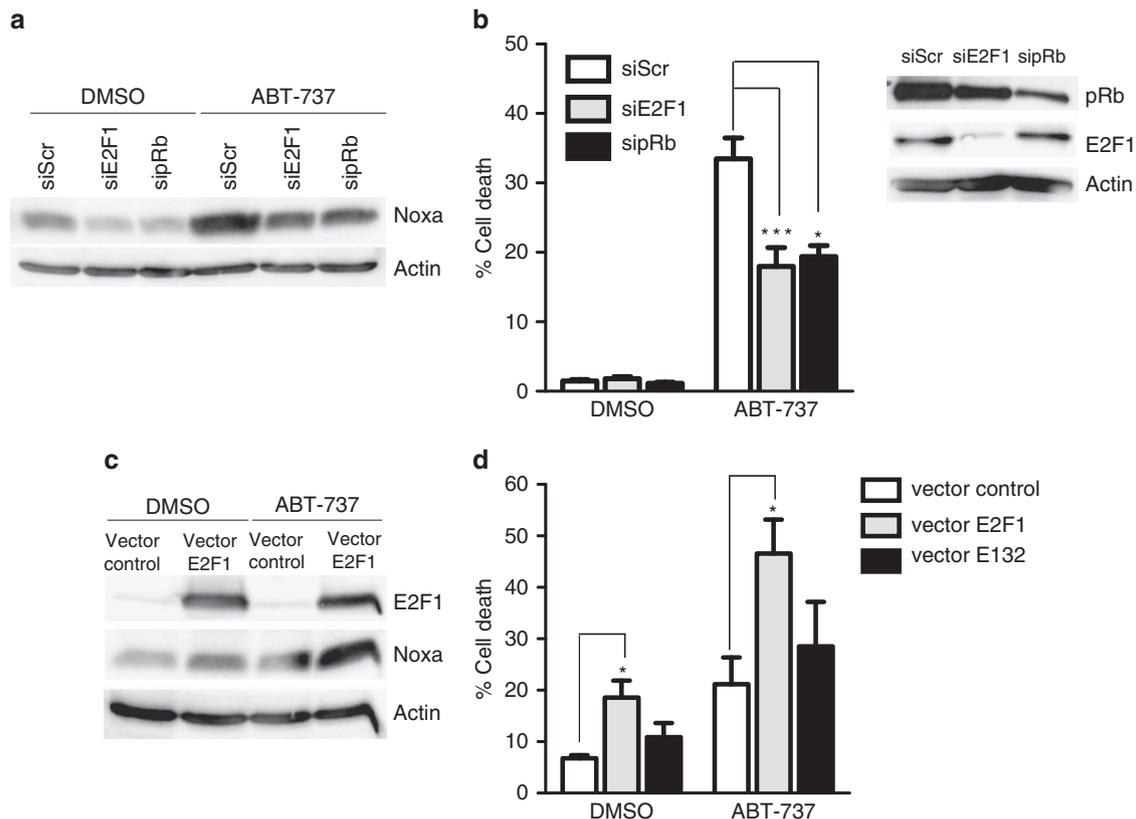
Transcriptional factors such as p53 and E2F-1 are known to regulate Noxa expression. As U251 cells express a mutated p53 (R273H), we focused on E2F-1, as the mRNA levels of another E2F-1 target p73 were also found to be upregulated by ABT-737 (Supplementary Figure S1A). Silencing of E2F-1 by RNA interference prevented Noxa induction by ABT-737



**Figure 1** ABT-737 induces caspases and Bax-dependent cell death in U251. (a) U251 cells were treated for 24 or 48 h by ABT-737 at 2  $\mu$ M and/or Z-VAD-FMK at 50  $\mu$ M (zVAD). (b and c) U251 cells were transfected with the indicated siRNA. Forty-eight hours later, cells were harvested (b) or treated by ABT-737 at 2  $\mu$ M for an additional 48 h (c). Western blot analysis of Bcl-2, Bcl-xL (b) and Bax (c) was performed. Cell death in a–c was assessed by a trypan blue staining procedure. Data presented in a–c are mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments



**Figure 2** The BH3-only Noxa is involved in ABT-737 induction of cell death. (a) U251 cells were treated by ABT-737 at 2  $\mu$ M for 48 h and western blot analysis of Noxa was performed. (b) *noxa* mRNA levels were measured in U251 cells treated or not by ABT-737 at 2  $\mu$ M and/or QVD-OPh at 10  $\mu$ M for 48 h by real-time RT-PCR analysis and normalized to *rplpO* and  $\beta_2$ -microglobulin. (c) U251 cells were transfected with control (siScr) or Noxa siRNAs. Forty-eight hours later, cells were treated by ABT-737 at 2  $\mu$ M for an additional 48 h. Western blot analysis of Noxa was performed and cell death was assessed by a trypan blue staining. Data presented in b and c are mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments



**Figure 3** E2F-1 and pRb are involved in the induction of cell death and Noxa by ABT-737. (a and b) U251 cells were transfected with the indicated siRNA. Forty-eight hours later, cells were treated by ABT-737 at 2  $\mu$ M for an additional 48 h. Western blot analysis of Noxa (a), pRb and E2F-1 (b) was performed, and cell death was assessed by a trypan blue staining (b). (c and d) U251 cells were transfected with pcDNA3Flag (vector control), pE2F1Flag (E2F1) or pE2F1E132 (E132) vector. Twenty-four hours later, cells were treated by ABT-737 at 2  $\mu$ M for an additional 48 h. (c) Western blot analysis of Noxa and E2F-1 was performed and (d) cell death was assessed as in b. Data presented in b and d are mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments

(Figure 3a) and decreased cell death rates (Figure 3b). Conversely, transient overexpression of E2F-1 in U251 cells increased Noxa expression (Figure 3c), affected cell viability by itself and enhanced cell sensitivity to ABT-737 treatment

(Figure 3d). By contrast, overexpression of a transcriptionally inactive mutant of E2F-1 (E132)<sup>30</sup> had no effect (Figure 3d). Notably, upregulation of Noxa and sensitization to ABT-737 induction of cell death by overexpression of E2F-1 were also

observed in the colorectal cancer p53-null HCT116 cells (Supplementary Figure S2), establishing that p53 is dispensable for E2F-1-dependent induction of Noxa.

Taken together, these results indicate that ABT-737 treatment induces E2F-1-dependent Noxa upregulation, thereby contributing to cell death induced by the inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL.

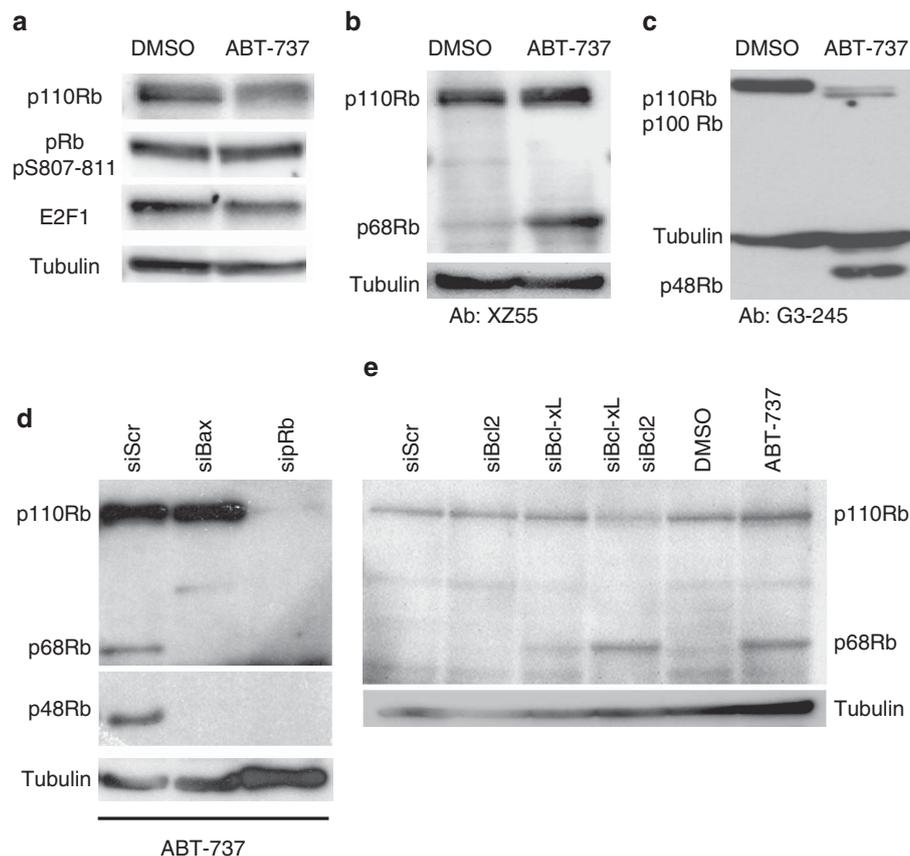
**The E2F-1 regulatory protein pRb is cleaved by caspases upon ABT-737 treatment.** To understand how ABT-737 treatment might influence E2F-1 activity, we investigated its influence on the expression of E2F-1 and of its regulator pRb. We observed no detectable modification in the expression levels of E2F-1 upon ABT-737 treatment (Figure 4a). We did not detect any modification of the phosphorylation of full-length pRb at Ser 807–811, a phosphorylation that relieves E2F-1 effects on cell-cycle progression from the negative regulation of pRb (Figure 4a). However, ABT-737 treatment modified the size of pRb polypeptides. Three bands of 100, 68 and 48 kDa, respectively, in addition to the 110 kDa band corresponding to full-length pRb, were immunodetected in lysates from ABT-737-treated U251 cells (Figures 4b and c). These bands were not detected in ABT-737-treated cells in which pRb was silenced, confirming that they all correspond to pRb polypeptides (Figure 4d). Notably, the truncated pRb

polypeptides were also observed in cells in which Bcl-2 and Bcl-xL were silenced simultaneously, but not when either one of them was downregulated alone, indicating that their appearance results from an on-target effect of ABT-737 (Figure 4e).

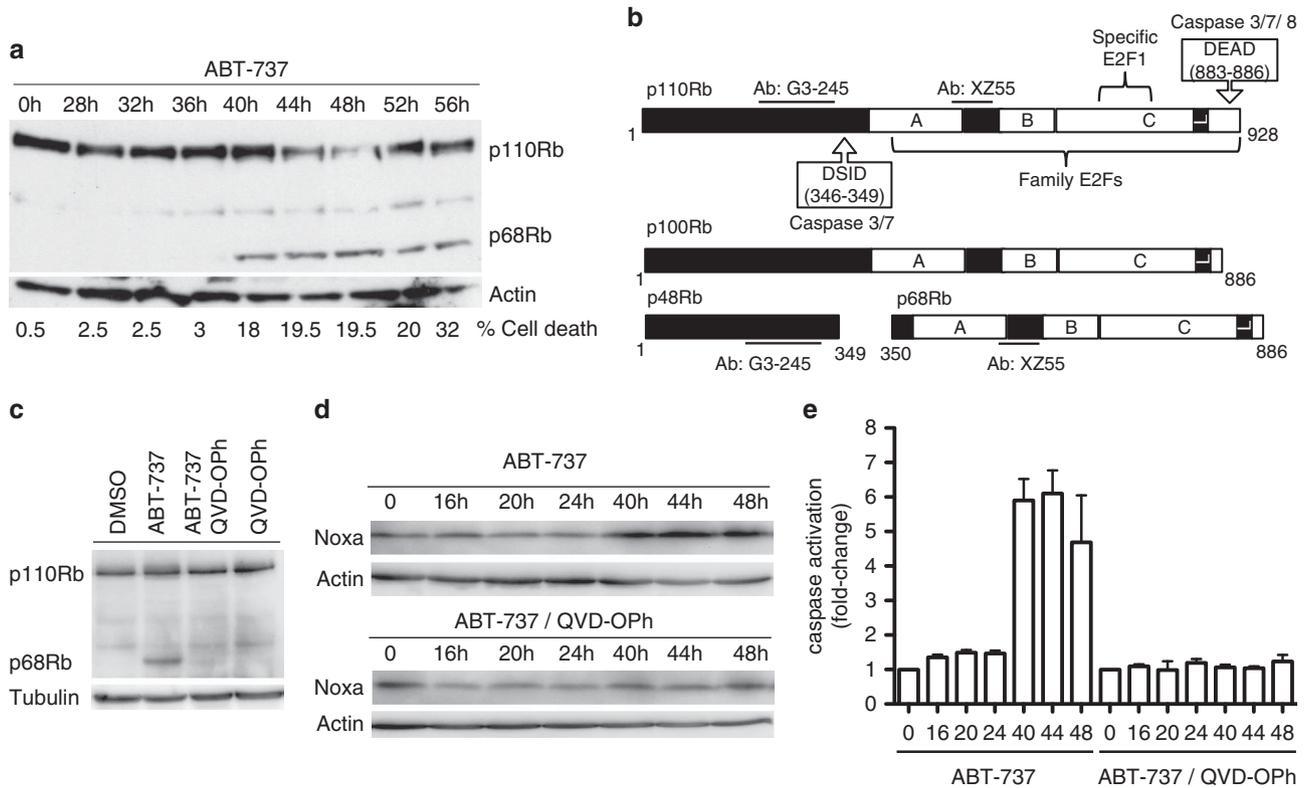
Kinetic analysis of ABT-737-treated U251 cells indicated that the appearance of the truncated forms of pRb was concomitant with increases in cell death rates, suggesting that it may associate with a pro-death mechanism (Figure 5a, see also below). It is documented that cleavage of pRb by caspases 3 and 7 at the DEAD site truncates pRb at the C-terminal end, giving rise to a band of 100 kDa, whereas two bands of 48 and 68 kDa, respectively, are obtained after cleavage at the DSID site (Figure 5b).<sup>35–37</sup> In U251 cells pre-treated with a pan-caspase inhibitor before ABT-737, the p68Rb form was no longer detected (Figure 5c). Moreover, neither the p68Rb nor the p48Rb forms were detected after treatment of cells with ABT-737 in which Bax expression had been silenced (Figure 4d).

These data support the notion that pRb is cleaved by caspases that are activated as a result of Bax-dependent mitochondrial permeabilisation in response to ABT-737.

**pRb contributes to caspase-dependent induction of Noxa.** As pRb cleavages occurred concomitantly to cell death and as Noxa is an actor of this cell death, we wondered



**Figure 4** pRb is truncated upon ABT-737 treatment in a Bax-dependent manner. (a–c) U251 cells were treated by ABT-737 at 2  $\mu$ M for 48 h and western blot analysis of proteins expression were performed. (d and e) U251 cells were transfected with the indicated siRNA. Forty-eight hours later, cells were harvested (e) or treated by ABT-737 at 2  $\mu$ M or not for an additional 48 h (d and e). Western blot analysis of protein expression was performed. Antibody (Ab) XZ55 directed against the full-length pRb, p100Rb and pRb68 forms was used in a, b, d and e panels while Ab G3-245 directed against the full-length pRb, p100Rb and pRb48 forms was used in c and d panels



**Figure 5** pRb truncation and Noxa induction are caspase dependent. (a) U251 cells were treated by ABT-737 at 2  $\mu$ M for indicated time. Western blot analysis of pRb expression with antibody (Ab) XZ55 was performed and cell death was assessed by a trypan blue staining. (b) Scheme of pRb with caspase cleavage sites, E2F interaction sites, antibody fixation sites and pRb cleaved forms p48Rb, p68Rb and p100Rb. (c) U251 cells were treated by ABT-737 at 2  $\mu$ M for 48 h (c), or for indicated time (d and e), and/or the pan caspase inhibitor QVD-OPh at 10  $\mu$ M. Western blot analysis of pRb (Ab XZ55) (c) or Noxa (d) was performed and caspase activities were measured (e). Data presented in e are mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments

if pRb might have a role in Noxa induction upon ABT-737 treatment. Consistent with a positive role for pRb in these events, silencing of pRb by RNA interference prevented the upregulation of Noxa by ABT-737, as observed when E2F-1 was silenced (Figure 3a). Moreover, it had no effect on the viability of U251 cells by itself but it significantly decreased cell death rates induced by ABT-737 treatment (Figure 3b).

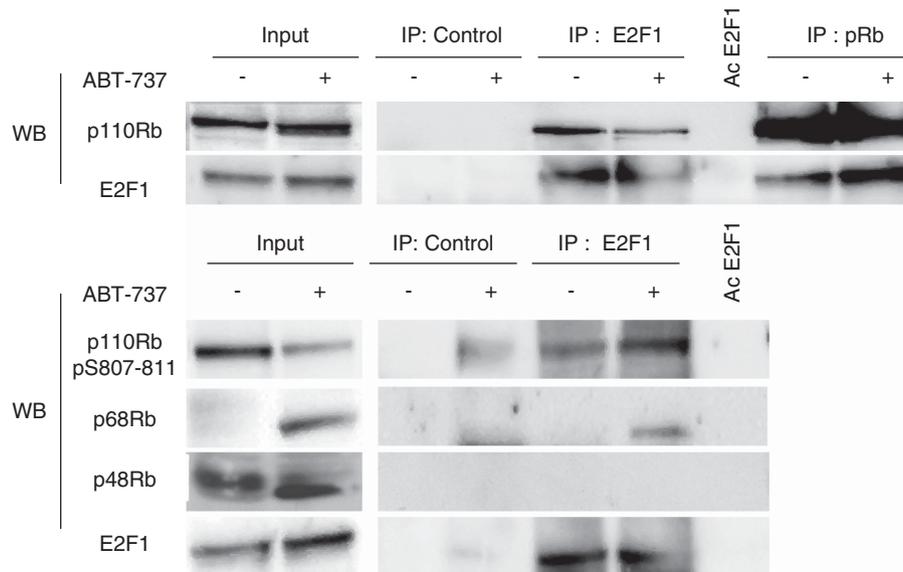
Involvement of pRb in Noxa induction prompted us to investigate whether caspases contribute to Noxa induction upon ABT-737 treatment. Pretreatment of U251 cells with a pan-caspase inhibitor impeded the induction of Noxa (at both protein and mRNA levels) by ABT-737 (Figures 2b and 5d). Importantly, kinetics of pRb cleavages and Noxa induction followed the kinetics of caspase activation. Indeed, induction of Noxa was detected at 40 h of ABT-737 treatment (Figure 5d), a time point that coincided with detectable appearance of pRb cleavage products (Figure 5a), detectable enhancement of specific caspase activity (Figure 5e) and detectable enhancement of cell death rates (Figure 5a). This puts forth a temporal link between caspase activation and Noxa induction by ABT-737.

Taken altogether, these data argue that pRb and caspases participate to Noxa induction in response to ABT-737.

**pRb and E2F-1 bind to the Noxa promoter upon ABT-737 treatment.** The regulation of E2F-1 transcriptional activity by pRb is, in great part, due to a physical interaction between

these two proteins.<sup>27,28</sup> It is well established that the binding of the hypophosphorylated pRb to E2F-1 inhibits the ability of the latter to induce the expression of genes involved in cell-cycle progression.<sup>38</sup> By contrast, recent data showed that hyperphosphorylated pRb can maintain an interaction with E2F-1<sup>39</sup> and that pRb may also function, in certain instances, as a binding partner for E2F-1 to positively upregulate pro-apoptotic genes, such as p73.<sup>40,41</sup> To further understand how, upon ABT-737 treatment, E2F-1 and pRb contribute to induce Noxa expression and cell death, we studied the interactions between E2F-1 and the forms of pRb, in addition to their individual and combined presence on the *noxa* promoter.

By co-immunoprecipitation assays using antiE2F-1 antibodies and lysates from ABT-737 or mock-treated cell, we observed that E2F-1 interacted with full-length pRb in U251 cells treated with ABT-737 or not (Figure 6, top panel), even in its phosphorylated form (Figure 6, bottom panel). The p68Rb form, but not the p48Rb form, co-immunoprecipitated with anti E2F-1 antibodies upon ABT-737 treatment (Figure 6, bottom panel). This is consistent with the fact that p68Rb still harbors the domain of interaction with E2F-1, whereas p48Rb does not (Figure 5b).<sup>38</sup> The use of pRb antibodies (that recognized both full-length and p68Rb forms) in reverse immunoprecipitation experiments confirmed that E2F-1 co-immunoprecipitated with pRb in cells treated with ABT-737 or not (Figure 6, top panel).



**Figure 6** E2F-1 interacts with full-length and truncated p68Rb upon ABT-737 treatment. U251 cells were treated by ABT-737 at 2  $\mu$ M for 48 h and cells lysates were immunoprecipitated (IP) with an anti-E2F-1 (antibody (Ab) C-20) or an anti-pRb antibody (Ab 4H1). The presence of E2F-1, full-length pRb or p68Rb (Ab XZ55), p48Rb (Ab G3-245) truncated forms and phosphorylated form of pRb (Ab pS807-pS811) were analyzed by western blot

The data above suggest that pRb may cooperate with E2F-1 to induce Noxa transcription upon ABT-737 treatment. Thus, we studied the ability of these two proteins to occupy *noxa* and *p73* promoter regions. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments showed that both E2F-1 and pRb were present on *noxa* and *p73* promoter regions and that this occupancy was increased by ABT-737 treatment (Figure 7a). Also, in correlation with the expression patterns of these genes following ABT-737 treatment, RNA polymerase II was observed bound to these promoters. The recruitment of pRb on these promoters appeared specific as it was not recruited on the promoter of *plk1* (a E2F-1 target gene involved in cell-cycle progression), whereas E2F-1 was present as expected (Figure 7a).

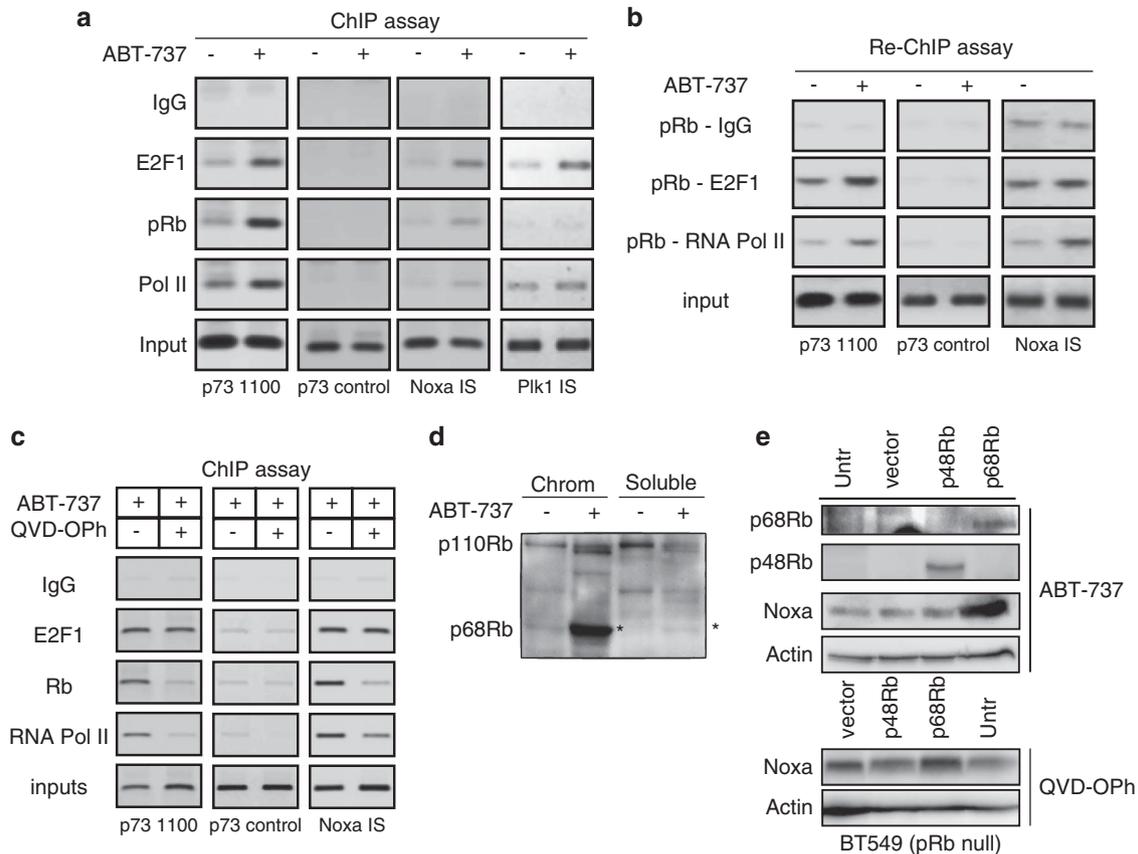
To further investigate whether E2F-1 and pRb occupy promoter regions in ABT-737-treated cells as binding partners, serial chromatin immunoprecipitation assays were performed (Figure 7b). E2F-1 and pRb were indeed recruited together on *noxa* and *p73* promoters upon ABT-737. Moreover, the pRb complexes present on these promoters were associated with RNA polymerase II stabilization in response to ABT-737. These results indicate that pRb-E2F1-RNA polymerase II complexes bind specifically to *noxa* and *p73* promoter regions, supporting the notion that these complexes function as transcriptional inducers of these genes in response to ABT-737.

The antibodies used in the ChIP assays cannot discriminate full-length pRb from its p68Rb-truncated form. We thus performed numerous assays to investigate whether caspase-cleaved p68Rb contributes to E2F-1 transcriptional activation of pro-apoptotic genes upon ABT-737 treatment. First, we performed ChIP assays in cells pretreated with a pan caspase inhibitor before ABT-737 (Figure 7c) to evaluate a role for caspases in pRb recruitment to critical promoters. We observed that the recruitment of pRb, and that of RNA

polymerase II, on *p73* and *noxa* promoters in ABT-737-treated cells were strongly reduced by caspase inhibition. Second, we analyzed the presence of pRb forms in the chromatin and in the soluble fractions of nuclear extracts of U251 cells treated with ABT-737 or not. The full-length pRb form was detected in both fractions of untreated cells while p68Rb strongly accumulated in the chromatin fraction of treated cells (Figure 7d). Third, we directly tested the ability of p68Rb to induce Noxa expression independently from caspases. Breast cancer BT549 pRb-negative cell line was infected with retroviruses allowing expression p48Rb or p68Rb truncated forms alongside with a GFP marker (Figure 7e). The ectopic expression of p68Rb was sufficient by itself to trigger a dramatic accumulation of Noxa in BT549 cells treated with a pan-caspase inhibitor. Induction of Noxa by ectopic p68Rb was also patent in ABT-737-treated BT549 cells. By contrast, no Noxa induction was observed in uninfected cells or in cells expressing ectopic p48Rb (Figure 7e).

As the recruitment of pRb on the *noxa* and *p73* promoter together with RNA polymerase II is caspase-dependent, as the p68Rb form is chromatin bound and as its ectopic expression leads to Noxa induction, our data strongly argue that caspase cleavage of pRb into p68Rb contributes to Noxa transcription in ABT-737-treated cells.

**Nutlin-3a sensitizes p53-mutated breast cancer cells to ABT-737 by upregulating Noxa in a pRb- and E2F-1-dependent manner.** As treatment with the Mdm2 inhibitor Nutlin-3a was shown to enhance the pRb/E2F-1 pathway,<sup>33,34</sup> we reasoned that it may increase cell sensitivity to ABT-737, provided pRb is present. We found that combination of Nutlin-3a to ABT-737, but not treatment with anyone alone, induced dramatic cell death in the breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-468, cells that carry p53 mutations (R280K and R273H, respectively) and



**Figure 7** pRb and E2F-1 are recruited together on *noxa* and *p73* promoters upon ABT-737 treatment. (**a–c**) U251 cells were treated or not by ABT-737 at 2  $\mu$ M for 48 h and/or the pan caspase inhibitor QVD-OPh at 10  $\mu$ M. Soluble chromatin was immunoprecipitated (**a** and **c**), or used for serial chromatin immunoprecipitation assays (Re-ChIP) (**b**), with indicated antibodies directed against pRb (antibody (Ab) 4H1), E2F-1 (Ab C-20) and RNA polymerase II (Pol II). DNA was amplified using primers that cover the E2F-1-binding sites of the indicated promoters and amplicons visualized on agarose gel. (**d**) U251 cells were treated or not by ABT-737 at 2  $\mu$ M for 48 h. Chromatin and soluble nuclear fractions were extracted and western blot analysis of pRb (Ab XZ55) was performed. (**e**) BT549 cells were infected for 48 h, or not (Untr), with retroviruses expressing either GFP alone (vector: pMIG), p48Rb or p68Rb truncated forms and treated with ABT-737 at 2  $\mu$ M (top panel) or with the pan caspase inhibitor QVD-OPh at 10  $\mu$ M (bottom panel). Noxa and/or pRb (Abs XZ55 and G3-245) expression were analyzed by western blot

constitutively express low levels of pRb (Figures 8a and b). A strong induction of Noxa protein expression, associated with a cleavage of pRb, was detected in both the cell lines treated with ABT-737 and Nutlin-3a (Figure 8b). Moreover, silencing of either Bax, Noxa, pRb or E2F-1 lead to a decrease of MDA-MB-231 cell death in response to the combination treatment ABT-737/Nutlin-3a (Figure 8c). Silencing of E2F-1 and pRb impeded Noxa induction in ABT-737/Nutlin-3a-treated cells, suggesting that they regulate Noxa expression under these conditions (Figure 8c). By contrast, neither cell death nor induction of Noxa were observed in ABT-737/Nutlin-3a-treated BT549 cells, which lack pRb expression, consistent with the notion that cell death induced by ABT-737/Nutlin-3a involves pRb (Figures 8a and d).

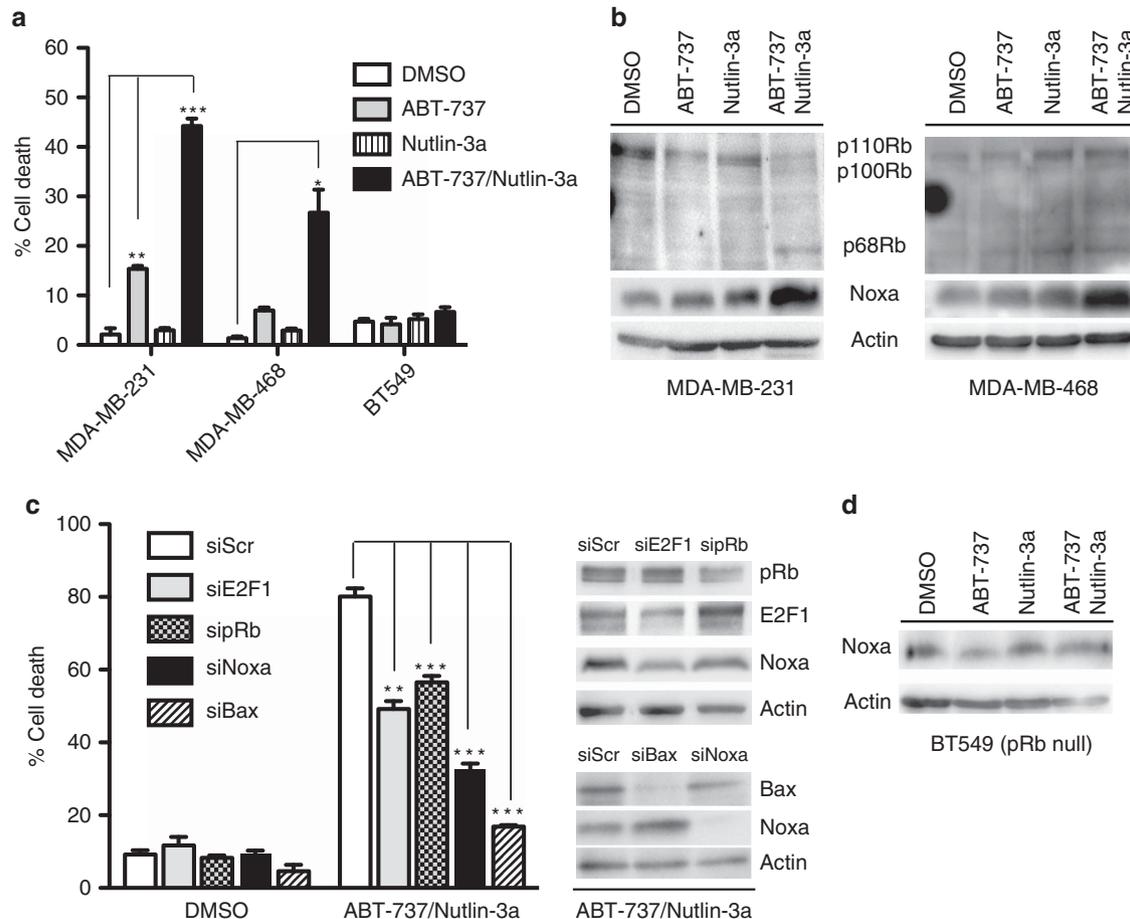
Thus, cell death induced by ABT-737 combined with Nutlin-3a may recruit pRb and E2F-1 and relies on their ability to increase Noxa expression.

## Discussion

We report here that inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL by ABT-737 enhances a caspase-dependent increase in Noxa induction mediated by E2F-1 and, less expectedly, by its

regulator protein pRb. Transcriptional upregulation of Noxa was previously described in response to treatment with BH3-mimetics.<sup>24,42</sup> As Noxa potently binds to Mcl-1,<sup>6</sup> its ability to promote ABT-737 induction of cell death generally relies on its capacity to inhibit Mcl-1 that is not targeted by ABT-737.<sup>13–17</sup> Silencing of Mcl-1 increased cell death rates in ABT-737-treated U251 cells (without affecting Noxa expression in untreated or ABT-737-treated cells, Supplementary Figures S3A and S3B). This is consistent with the notion that, in these cells, Mcl-1 represents a major restraint to ABT-737 efficiency that Noxa induction contributes to overcome. The novel perspective that emerges from our study is that caspases impact on mitochondrial permeability by triggering Noxa-mediated Mcl-1 inhibition in response to inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL and that this occurs via transcription-dependent mechanisms that involve E2F-1 and pRb.

The transcription factor E2F-1 is a key actor of this caspase-dependent induction of Noxa, as evidenced by its role in cell death induced by ABT-737, by its influence on Noxa expression and its ability to occupy the *noxa* promoter. E2F-1 was already described to promote apoptosis in response to either DNA damage or oncogenic stress, in part,



**Figure 8** Nutlin-3a sensitizes MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells to ABT-737 by upregulating Noxa. (a and b) MDA-MB-231, MDA-MB-468 and BT549 cells were treated by ABT-737 at 2  $\mu$ M and/or Nutlin-3a at 10  $\mu$ M for 48 h. (a) Cell death was assessed by trypan blue staining and (b) Noxa and pRb (antibody (Ab) XZ55) expression levels were analyzed by western blot. (c) MDA-MB-231 cells were transfected with the indicated siRNA. Forty-eight hours later, cells were treated by ABT-737 at 2  $\mu$ M and Nutlin-3a at 10  $\mu$ M for 48 h. Western blot analysis of Bax, Noxa, E2F-1 and pRb was performed and cell death was assessed as in a. (d) BT549 cells were treated by ABT-737 at 2  $\mu$ M and/or Nutlin-3a at 10  $\mu$ M for 48 h and Noxa expression was analyzed by western blot. Data presented in a and c are mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments

through regulating the transcription of genes encoding for BH3-only proteins.<sup>25,27,28,30</sup> In U251 cells, ABT-737 had no effect on Puma expression, which appeared dispensable for efficient induction of apoptosis (Supplementary Figures S3A and S3C). By contrast, the E2F-1 target gene *p73* was enhanced upon ABT-737 treatment (Supplementary Figure S1A) and its silencing affected cell death and also impeded the expression of Noxa (Supplementary Figure S1B). Thus, *p73* may by itself contribute to cell death in response to ABT-737. This suggests that E2F-1 (and pRb as discussed below) may regulate Noxa transcription (and cell death) not only directly but also indirectly via its transcriptional target *p73*.

A recent work showed that pRb participates (even in its phosphorylated form) to form a transcriptionally active complex with E2F-1 to regulate expression of pro-apoptotic genes.<sup>40,41</sup> Our data are mostly consistent with these data, as they show that, upon ABT-737 treatment, pRb interacts with E2F-1, is recruited to both *noxa* and *p73* promoters and contributes to Noxa expression and to cell death induction, contrary to current understanding of the regulation of E2F-1 by

pRb. Strikingly, our data establish that caspase cleavage of pRb may favor these molecular events. One feature of pRb is that it can provide a link between caspase activation and E2F-1 activity as it is cleaved by caspases during chemotherapy-induced cell death, at two distinct sites.<sup>37</sup> Upon ABT-737 treatment also, pRb is cleaved at these two sites and gives rise to the p68Rb and p48Rb forms. Cleavage of pRb was proposed to promote apoptosis via the release of E2F-1 from cleaved pRbs.<sup>37,43</sup> Nevertheless, the p68Rb-truncated form keeps the domain of interaction with E2F-1 and, in agreement, we found that p68Rb interacts with E2F-1 upon ABT-737 treatment. As caspase activity is required to upregulate Noxa and as a siRNA-targeting pRb expression impedes the induction of Noxa, we propose that p68Rb has an active role in the E2F-1 upregulation of Noxa (Supplementary Figure S4). We suggest that it does so by engaging complexes in which E2F-1 is transcriptionally active and that encompass RNA polymerase II. Supporting this, we found that the p68Rb truncated form is present in the chromatin fraction of ABT-737-treated cells, that caspase inhibition affects the recruitment of pRb and RNA polymerase II on *noxa* and *p73*

promoters and that ectopic expression of p68Rb in the BT549 pRb-negative cells promotes a strong induction of Noxa independently from caspases.

In conclusion, our studies put forth the notion that, upon inhibition of Bcl-2/Bcl-xL, caspases can trigger Mcl-1 inhibition through induction of Noxa. They do so by generating a cleaved form of p68Rb that exerts a previously unforeseen positive regulation of the *noxa* promoter together with E2F-1, with which it interacts. Enhancement of this transcriptional pathway may constitute an efficient way to overcome cancer cell resistance to ABT-737, independently of p53, as exemplified by the fact that the combination of ABT-737 with Nutlin-3a induces Noxa and promotes cell death in breast cancer cells carrying mutant p53, provided pRb is expressed.

## Materials and Methods

**Cell lines and cell culture.** The U251, MDA-MB-231, MDA-MB-468 and BT 549 cell lines obtained from ATCC, were grown in DMEM and RPMI medium, respectively. HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells, grown in McCoy's 5A, were kindly provided by Dr B. Vogelstein (The John Hopkins Kimmel Cancer Center, Baltimore, MD, USA). When specified, ABT-737 was used at 2  $\mu$ M, Nutlin-3a (Sigma, St Louis, MO, USA) at 10  $\mu$ M, zVAD-FMK (Promega, Madison, WI, USA) at 50  $\mu$ M and QVD-OPh (R&D System, Minneapolis, MN, USA) at 10  $\mu$ M.

**Plasmids, siRNAs and transfection.** The E2F-1 cDNA from pSG5LHAE2F1 vector (Addgene, Cambridge, MA, USA, ref. 10736)<sup>44</sup> was cloned into pcDNA3Flag from pcDNA3Flagp53 (Addgene ref. 10838)<sup>45</sup> and the resulting plasmid, named pE2F1Flag, was sequenced. The E132 E2F-1, which carries a point mutation within the DNA-binding domain, was expressed from a plasmid obtained from Addgene (ref. 24224).<sup>46</sup> Following siRNAs were used: siBax (HSC.RNAI.N138761.10.1), siBcl-2 (HSC.RNAI.N000633.6.1), siBcl-xL (BCL2L1 ON-TARGETplus L-003458-00), siE2F1 (HSC.RNAI.N005225.10.3), siNoxa (AC224U4), siPuma (ON-TARGETplus smart pool t-004380-00-0005), sip73 (HSC.RNAI.N0055427.10.8), sipRb (sc-29468) and SiScramble (siScr) (SC37007). Plasmids and siRNAs were transfected according to manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using Lipofectamine 2000 and lipofectamine RNAi Max, respectively.

**Retroviral production.** The bicistronic retroviral pMIG vector containing an internal ribosome entry site upstream of the enhanced GFP gene,<sup>47</sup> was used to introduce cDNAs corresponding to p48Rb or p68Rb using BglII/HpaI and BamHI/PmeI sites, respectively. Retroviruses were produced in Phoenix cells maintained in DMEM with 10% (vol/vol) FBS. Briefly, 10 Phoenix cells were transfected with 45  $\mu$ g of pMIG (mock, encoding p48Rb or p68Rb) and 5  $\mu$ g of pVSVG (encoding the vesicular stomatitis virus G protein) complexes with PEI.<sup>6</sup> Forty-eight hours after transfection, viral supernatants were collected. MOI was determined by flow cytometry and BT549 cells were infected at MOI of 1.

**Cellular assays.** Cell viability was determined by a trypan blue staining procedure. Caspase activities were measured using the Caspase Glow assay system according to the manufacturer's protocol (Promega) and were normalized to the activity measured under control condition. Immunoprecipitations were performed at 4 °C on cell extracts (500  $\mu$ g) from cells lysed in lysis buffer (HEPES 10 mM; NaCl 150 mM; 1% CHAPS; pH 7.4; protease inhibitors; 0.5% Nonidet P-40). Cell extracts were precleared with 20  $\mu$ l of protein G-agarose (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 1 h, and cleared extracts were immunoprecipitated with 4  $\mu$ g of the indicated antibodies overnight followed by the addition of 50  $\mu$ l of protein G-agarose for 1 h. Immunoprecipitated proteins were washed in lysis buffer and once with 10 mM Tris, pH 8, 100 mM EDTA and then eluted with heated sample buffer. To extract proteins from the chromatin and soluble nuclear fraction, cells were collected with a rubber scraper. The pellet was resuspended in solution A (10 mM Hepes pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF) and submitted to three freezing/thawing cycles. The mixture was centrifuged at 2000 r.p.m. for 5 minutes. The pellet was washed in solution A and then resuspended in solution C (20 mM Hepes pH 7.9, 25% glycerol, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM

PMSF). The mixture was incubated for 30 min in ice and then centrifuged at 12 000 r.p.m. for 15 min. The supernatant represents the soluble nuclear fraction. The pellet, corresponding to the chromatin fraction, was resuspended in lysis buffer (SDS: 1%; EDTA: 10 mM; Tris-HCl pH 8.1: 50 mM; protease inhibitors Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 100  $\times$ ) and sonicated. The mixture was centrifuged at 13 000 r.p.m. and the supernatant that corresponds to the chromatin fraction was collected.

**RNA extraction and quantitative real-time PCR.** Total RNAs were extracted with RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The quality of the RNAs was assessed by analysis on an Agilent 2100 bioanalyser (Agilent Biotechnologies, Santa Clara, CA, USA). RNAs were retro-transcribed using Superscript transcriptase (Superscript II, Invitrogen). Following forward and reverse primers were used: p73 (5'-CTTCAACGAAGACAGTCTG-3' and 5'-AAGTTGTACAGGATGGTGGT-3'), Noxa (5'-GCTGGAAGTCGAGTGTGCTA-3' and 5'-CCTGAGCAGAAGAGTTTGA-3'). Real-time PCR was carried out as previously described.<sup>48</sup>

**Immunoblot analysis and antibodies.** After two washings with cold PBS, cells were lysed in ice-cold lysis buffer (SDS: 1%; EDTA: 10 mM; Tris-HCl pH 8.1: 50 mM; protease inhibitors Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 100  $\times$ ) 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). Following antibodies were used: actin (MAB1501R, Millipore),  $\beta$ -tubulin (T0198, Sigma), Bax (A3533, Dako, Glostrup, Denmark), Bcl-2 (1017-1, Epitomics, Burlingame, CA, USA), Bcl-xL (1018-1, Epitomics), E2F-1 (3742, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), Mcl-1 (sc-819, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), Noxa (ALX-804-408, Enzo Life Science, New York, NY, USA), pRb XZ55 (554144, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), pRb G3-245 (554136, BD Pharmingen), phospho-pRb (S807-811) (558389, BD Pharmingen), p73 (5B429, Imgenex, San Diego, CA, USA), Puma (4743, Sigma), and Flag (F1804, Sigma). The following antibodies against E2F-1 C-20 (sc-193, Santa Cruz Biotechnologies), pRb 4H1 (9309, Cell Signaling) and polymerase II (sc-899, Santa Cruz Biotechnologies) were used for immunoprecipitations and ChIP assays.

**ChIP and serial ChIP assay.** Single (ChIP) and serial ChIP experiments were performed essentially as previously described.<sup>49</sup> The following primers were used: NOXA IS: 5'-CGTCTAGTTTCCCTACGTC-3'; 5'-AGATGCCAACTACACAC G-3', p73-1100: 5'-TGAGCCATGAAGATGTGC-3'; 5'-GCTGCTTATGGTCTGATG CTTATG-3',<sup>39</sup> p73 control 5'-CAATTGTCCCCCTCTTCTGA-3'; 5'-GTGGCAGAA GGGTGTCTAAA-3' and PLK1 IS 5'-GTTTCCCGGCTGGGTCCG-3'; 5'-AAGC TGCCTGCAGACCTCG-3'.

**Data analysis.** Data were from at least three independent experiments. Statistical analysis of data was performed using one-tailed Student's *t*-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 O. Micheau and B. Mignotte for their kind gift of the pMIG plasmid and of pRb cDNA, respectively. We thank members of the lab 'Cell Survival and Tumor Escape in Breast Cancer' for their technical advice and for fruitful comments. JB-C and JLP are supported by grants from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur and from INSERM Region, respectively. PJ is supported by ARC (no. SFI20101201568), Fondation de France (Tumor committee), Région Pays de Loire and Canceropole Grand Ouest (2010-12798).

1. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007; **26**: 1324–1337.
2. Lalier L, Cartron P-F, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B *et al*. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 2007; **12**: 887–896.
3. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 2010; **37**: 299–310.

4. Kelly PN, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 1414–1424.
5. Chonghaile TN, Letai A. Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene* 2009; **27**: S149–S157.
6. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JL, Hinds MG *et al*. Differential targeting of pro-survival Bcl-2 proteins by their BH3-Only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 2005; **17**: 393–403.
7. Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1813**: 508–520.
8. Aranovich A, Liu Q, Collins T, Geng F, Dixit S, Leber B *et al*. Differences in the mechanisms of proapoptotic BH3 proteins binding to Bcl-XL and Bcl-2 quantified in live MCF-7 cells. *Mol Cell* 2012; **45**: 754–763.
9. Oltsdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA *et al*. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; **435**: 677–681.
10. Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, Letai A. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest* 2007; **117**: 112–121.
11. 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.
12. 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.
13. van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE *et al*. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 2006; **10**: 389–399.
14. Tagscherer KE, Fassl A, Campos B, Farhadi M, Kraemer A, Böck BC *et al*. Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 2008; **27**: 6646–6656.
15. Okumura K, Huang S, Sinicrope FA. Induction of Noxa sensitizes human colorectal cancer cells expressing Mcl-1 to the small-molecule Bcl-2/Bcl-xL inhibitor, ABT-737. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 8132–8142.
16. Zall H, Weber A, Besch R, Zantl N, Häcker G. Chemotherapeutic drugs sensitize human renal cell carcinoma cells to ABT-737 by a mechanism involving the Noxa-dependent inactivation of Mcl-1 or A1. *Mol Cancer* 2010; **9**: 164.
17. Zhang L, Lopez H, George NM, Liu X, Pang X, Luo X. Selective involvement of BH3-only proteins and differential targets of Noxa in diverse apoptotic pathways. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 864–873.
18. Quinn BA, Dash R, Azab B, Sarkar S, Das SK, Kumar S *et al*. Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2011; **10**: 1397–1411.
19. Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA Jr, Booth CJ, Mehal WZ *et al*. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 2006; **311**: 847–851.
20. Tait SWG, Parsons MJ, Llambi F, Bouchier-Hayes L, Connell S, Muñoz-Pinedo C *et al*. Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Dev Cell* 2010; **18**: 802–813.
21. Llambi F, Moldoveanu T, Tait SWG, Bouchier-Hayes L, Temirov J, McCormick LL *et al*. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell* 2011; **44**: 517–531.
22. Buron N, Porceddu M, Brabant M, Desgué D, Racœur C, Lassalle M *et al*. Use of human cancer cell lines mitochondria to explore the mechanisms of BH3 peptides and ABT-737-induced mitochondrial membrane permeabilization. *PLoS One* 2010; **5**: e9924.
23. Song JH, Kandasamy K, Kraft AS. ABT-737 induces expression of the death receptor 5 and sensitizes human cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2008; **283**: 25003–25013.
24. 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.
25. Stevens C, La Thangue NB. The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)* 2004; **3**: 1071–1079.
26. Polager S, Ginsberg D. p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 738–748.
27. Polager S, Ginsberg D. E2F—at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol* 2008; **18**: 528–535.
28. laquinta PJ, Lees JA. Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 2007; **19**: 649–657.
29. Stiewe T, Pützer BM. Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet* 2000; **26**: 464–469.
30. Hershko T, Ginsberg D. Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* 2004; **279**: 8627–8634.
31. Zhao Y, Tan J, Zhuang L, Jiang X, Liu ET, Yu Q. Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 16090–16095.
32. Hao H, Dong Y, Bowling MT, Gomez-Gutierrez JG, Zhou HS, McMasters KM. E2F-1 induces melanoma cell apoptosis via PUMA up-regulation and Bax translocation. *BMC Cancer* 2007; **7**: 24.
33. Ambrosini G, Sambol EB, Carvajal D, Vassilev LT, Singer S, Schwartz GK. Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene* 2007; **26**: 3473–3481.
34. Peirce SK, Findley HW. The MDM2 antagonist nutlin-3 sensitizes p53-null neuroblastoma cells to doxorubicin via E2F1 and Tap73. *Int J Oncol* 2009; **34**: 1395–1402.
35. An B, Dou QP. Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res* 1996; **56**: 438–442.
36. Bouillier AL, Trinh E, Loeffler JP. Caspase-dependent cleavage of the retinoblastoma protein is an early step in neuronal apoptosis. *Oncogene* 2000; **19**: 2171–2178.
37. Fattman CL, Delach SM, Dou QP, Johnson DE. Sequential two-step cleavage of the retinoblastoma protein by caspase-3/-7 during etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* 2001; **20**: 2918–2926.
38. Dick FA. Structure-function analysis of the retinoblastoma tumor suppressor protein—is the whole a sum of its parts? *Cell Div* 2007; **2**: 26.
39. Cecchini MJ, Dick FA. The biochemical basis of CDK phosphorylation-independent regulation of E2F1 by the retinoblastoma protein. *Biochem J* 2011; **434**: 297–308.
40. Julian LM, Palander O, Seifried LA, Foster JEG, Dick FA. Characterization of an E2F1-specific binding domain in pRb and its implications for apoptotic regulation. *Oncogene* 2008; **27**: 1572–1579.
41. Ianari A, Natale T, Calo E, Ferretti E, Alesse E, Screpanti I *et al*. Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer Cell* 2009; **15**: 184–194.
42. Albershard TC, Salerno BL, Soderquist RS, Bates DJP, Pletnev AA, Kisselev AF *et al*. Multiple BH3 mimetics antagonize anti-apoptotic MCL1 by inducing the endoplasmic reticulum stress response and up-regulating BH3-only protein NOXA. *J Biol Chem* 2011; **286**: 24882–24895.
43. Katsuda K, Kataoka M, Uno F, Murakami T, Kondo T, Roth JA *et al*. Activation of caspase-3 and cleavage of Rb are associated with p16-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 2002; **21**: 2108–2113.
44. Sellers WR, Novitsch BG, Miyake S, Heith A, Otterson GA, Kaye FJ *et al*. Stable binding to E2F is not required for the retinoblastoma protein to activate transcription, promote differentiation, and suppress tumor cell growth. *Genes Dev* 1998; **12**: 95–106.
45. Gjoerup O, Zaveri D, Roberts TM. Induction of p53-independent apoptosis by simian virus 40 small t antigen. *J Virol* 2001; **75**: 9142–9155.
46. Helin K, Wu CL, Fattaey AR, Lees JA, Dynlacht BD, Ngwu C *et al*. Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev* 1993; **7**: 1850–1861.
47. Pear WS, Miller JP, Xu L, Pui JC, Soffer B, Quackenbush RC *et al*. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* 1998; **92**: 3780–3792.
48. Braun F, Bertin-Ciftci J, Gallouet A-S, Millour J, Juin P. Serum-nutrient starvation induces cell death mediated by Bax and Puma that is counteracted by p21 and unmasked by Bcl-xL inhibition. *PLoS One* 2011; **6**: e23577.
49. Barré B, Perkins ND. The Skp2 promoter integrates signaling through the NF-kappaB, p53, and Akt/GSK3beta pathways to regulate autophagy and apoptosis. *Mol Cell* 2010; **38**: 524–538.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

## **B. Implication de la voie p53 dans la réponse à l'ABT-737**

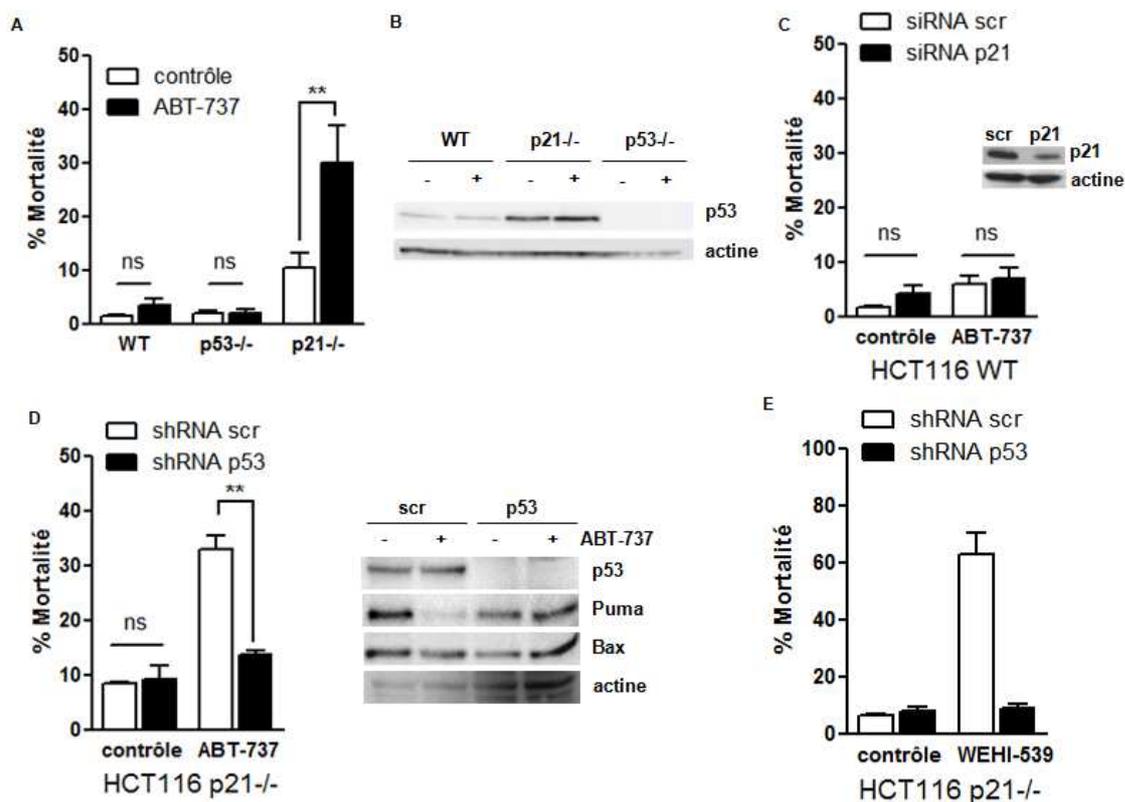
Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'implication de la voie p53 dans la réponse à l'ABT-737. L'altération fréquente de la voie p53 dans les cancers étant impliquée dans la résistance aux thérapies anticancéreuses, nous nous sommes demandés dans quelle mesure p53 joue-il un rôle dans la sensibilité à l'ABT-737. Au moins deux rôles du suppresseur de tumeur peuvent être envisagés : d'une part les membres de la famille Bcl-2 participant à la sensibilité au BH3-mimétique sont des cibles transcriptionnelles de p53, d'autre part p53 peut directement interagir avec certains membres au niveau du cytoplasme et favoriser le déclenchement de l'apoptose (section D de l'introduction). Il a été montré au sein de l'équipe que l'ABT-737 induit une mort apoptotique dans les cellules de cancer colorectal HCT116 présentant un p53 sauvage mais déficientes en p21, et ceci en ciblant plus particulièrement Bcl-xL conduisant à la libération de Bax qui est activé par Puma (Gallenne *et al.*, 2009). Les principaux acteurs de la sensibilité au BH3-mimétiques dans ce modèle sont donc Bcl-xL, Bax et Puma. La protéine Mcl-1 n'étant pas inhibée par l'ABT-737, elle constitue un frein au déclenchement de l'apoptose par le BH3-mimétique. L'action anti-apoptotique de Mcl-1 peut être inhibée par le BH3-seul Noxa. Les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> utilisées dans cette étude sont caractérisées par un niveau élevé de p53 (Ferrandiz *et al.*, 2009). Nous avons alors utilisé ce modèle pour déterminer l'implication du suppresseur de tumeur dans la sensibilité à l'ABT-737 et les mécanismes mis en œuvres.

### **1) p53 est-il impliqué dans la sensibilité à l'ABT-737 ?**

Afin d'évaluer l'implication de p53 dans la sensibilité au BH3-mimétique, nous avons comparé la sensibilité des lignées isogéniques de cancer colorectal HCT116 parentales WT, p21<sup>-/-</sup> et p53<sup>-/-</sup>, après 24h de traitement à 2 $\mu$ M d'ABT-737 (figure 30A). La lignée p21<sup>-/-</sup> est caractérisée par l'absence de p21 mais également par une forte expression de p53 (figure 30B ; Ferrandiz *et al.*, 2009). En accord avec les données précédentes, la lignée p21<sup>-/-</sup> présente un taux de 30% de mortalité suite au traitement. Les lignées WT et p53<sup>-/-</sup> ne présentent quant à elles pas d'augmentation de la mortalité après traitement au BH3-mimétique. La transfection de la lignée parentale par un siRNA ciblant p21 ne permet pas d'augmenter la mortalité de ces cellules suite au traitement à l'ABT-737 (figure 30C). En revanche, l'infection des cellules p21<sup>-/-</sup> par un shRNA dirigé contre p53 leur confère une résistance au traitement (figure 30D). Ces données

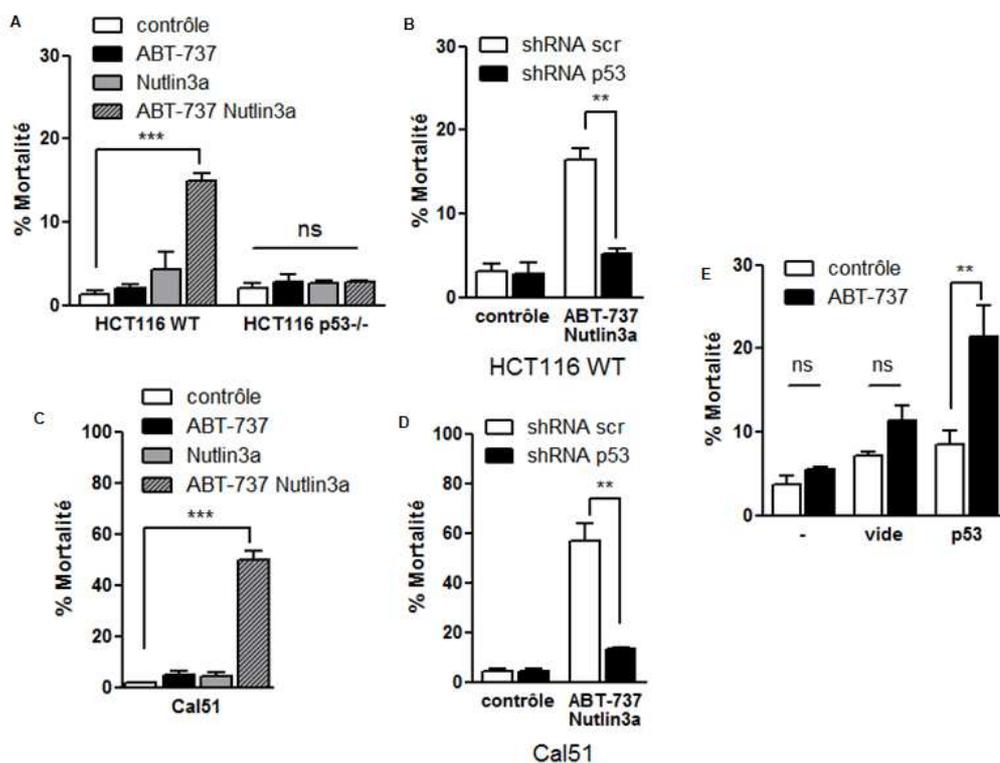
indiquent que la sensibilité des HCT116 p21<sup>-/-</sup> à l'ABT-737 est liée à leur forte expression de p53 et non à l'absence de p21. Par ailleurs, des résultats similaires ont été obtenus après 24h de traitement à 2µM de WEHI-539, inhibiteur spécifique de Bcl-xL qui entraîne 63% de mortalité dans les HCT116 p21<sup>-/-</sup> confirmant leur dépendance à Bcl-xL, et l'implication de p53 dans le processus de mort cellulaire (figure 30E).

Afin de vérifier si la stabilisation de p53 est suffisante pour augmenter la mortalité des cellules résistantes lors d'un traitement au BH3-mimétique, les cellules HCT116 WT et p53<sup>-/-</sup> sont co-traitées 24h à 2µM d'ABT-737 et 10µM de Nutlin3a, un inhibiteur de l'ubiquitine-ligase MDM2 impliquée dans la dégradation de p53 (figure31A). La stabilisation de p53 dans la lignée parentale entraîne une sensibilisation au BH3-mimétique qui n'est pas observée dans les p53<sup>-/-</sup>. Cependant, la Nutlin3a ne ciblant pas spécifiquement p53, les cellules HCT116 WT ont été infectées par un shRNA



**Figure 30 : p53 participe à la sensibilité des HCT116 p21<sup>-/-</sup> à l'ABT-737.** Les lignées HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup> et p21<sup>-/-</sup> ont été traitées 24h à 2µM d'ABT-737 avant évaluation de la mortalité et western-blot (A&B). Les cellules HCT116 WT ont été transfectées par un siRNA contrôle ou dirigé contre p21, avant 24h de traitement à 2µM d'ABT-737 et évaluation de la mort et western blot (C). Les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> ont été infectées par un shRNA contrôle ou dirigé contre p53, avant 24h de traitement à 2µM d'ABT-737(D) ou de WEHI-539 (E) et évaluation de la mort et western blot. L'évaluation de la mort se fait en coloration bleu trypan, les résultats représentent 3 répliquas biologiques.

dirigé contre p53 pour confirmer le rôle du suppresseur de tumeur. Nous observons que la sensibilité de ces cellules à l'ABT-737 en combinaison à la Nutlin3a est abrogée indiquant que l'effet de la Nutlin3a est dépendant de p53 (figure 31B). Des résultats similaires ont été obtenus dans la lignée de cancer du sein Cal51 exprimant également un p53 sauvage (figure 31C-D). La stabilisation de p53 endogène est donc suffisante pour sensibiliser des cellules à l'ABT-737. L'expression de p53 exogène dans la lignée HCT116 p53<sup>-/-</sup> en transfection transitoire conduit également à une sensibilisation à l'ABT-737 (figure 31E). Cette sensibilisation est néanmoins modeste ce qui pourrait être due à la faible efficacité de transfection (~30%) et d'un bruit de fond de mortalité augmenté par le stress de la transfection.



**Figure 31: la stabilisation et la surexpression de p53 sont suffisantes pour sensibiliser les cellules résistantes à l'ABT-737.** Les cellules HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup> (A) ou Cal51 (C) sont traitées 24h à 2µM d'ABT-737 et/ou 10µM de Nutlin3a avant évaluation de la mort. Les HCT 116 WT (B) et Cal51 (D) sont infectées par un shRNA dirigé contre p53 avant traitement 24h à 2µM d'ABT-737 et 10µM de Nutlin3a, et évaluation de la mort. Les HCT116 p53<sup>-/-</sup> sont transfectées par un plasmide pcDNA3 vide, ou d'expression de p53, avant 24h de traitement à 2µM d'ABT-737 et évaluation de la mort (E). L'évaluation de la mort se fait en coloration bleu trypan, les résultats représentent 3 répliquas biologiques.

---

L'augmentation du niveau de p53, endogène ou de façon ectopique, est donc suffisante pour sensibiliser les cellules résistantes à l'ABT-737. L'ensemble de ces résultats confirme un rôle de p53 dans la sensibilité au BH3-mimétique. Nous avons voulu déterminer quels mécanismes étaient impliqués dans ce rôle du suppresseur de tumeur.

## **2) La voie transcriptionnelle de p53 est-elle impliquée dans l'apoptose induite par l'ABT-737 ?**

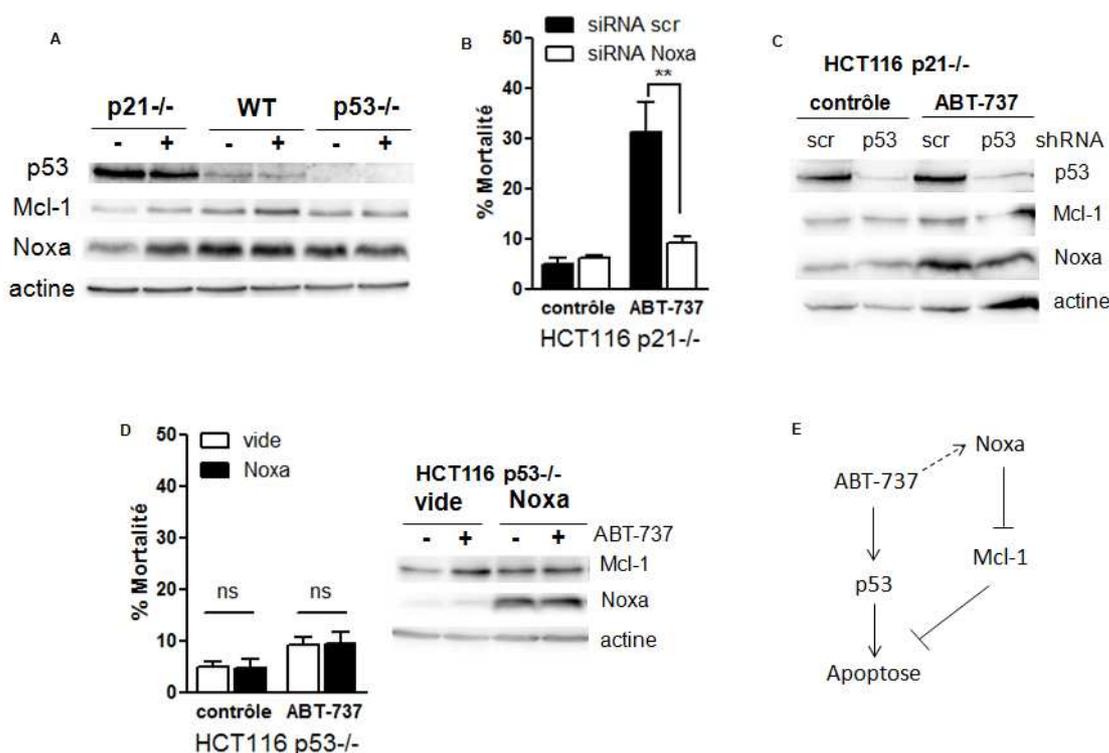
Nous avons montré l'importance de p53 dans la sensibilité à l'ABT-737 médiée par Bax et Puma. Ce suppresseur de tumeur est décrit initialement comme un facteur de transcription majeur permettant l'activation de gènes impliqués entre autre dans le cycle cellulaire ou l'apoptose. De nombreux gènes permettant l'expression de protéines de la famille Bcl-2, tel que Noxa, Puma ou encore Bax sont des cibles de p53. Le rôle de p53 dans la sensibilité à l'ABT-737 pourrait être lié à sa capacité à activer la transcription de ces gènes cibles, déplaçant la balance entre les pro- et les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, en faveur de la mort cellulaire.

### *a. L'induction de Noxa régule la sensibilité des HCT116 p21<sup>-/-</sup> à l'ABT-737 indépendamment de p53.*

La protéine Mcl-1 constitue un frein majeur à l'ABT-737 (Gallenne *et al*, 2009). Dans la première partie de mon travail sur la voie pRb/E2F1, nous avons montré que l'induction de Noxa lors d'un traitement à l'ABT-737 pouvait participer à la sensibilité au BH3-mimétique. Nous nous sommes alors demandés si p53 pouvait avoir un rôle similaire d'induction de l'expression de Noxa lors d'un traitement à l'ABT-737. Nous avons analysé l'expression de Noxa dans les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> lors d'un traitement à l'ABT-737. Le niveau de Noxa augmente dans les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> lors du traitement au BH3-mimétique, comme observé préalablement dans les cellules U251 (Bertin-Ciftci *et al*, 2013 ; figure 32A). En revanche, le niveau de Noxa n'est pas modifié dans les cellules HCT116 WT et p53<sup>-/-</sup> suggérant que la sensibilité des p21<sup>-/-</sup> à l'ABT-737 pourrait résulter de cette différence d'induction de Noxa. Il faut cependant noter que les cellules HCT116 parentales et p53<sup>-/-</sup> présentent un taux basal plus élevé de Noxa que les cellules p21<sup>-/-</sup>. L'extinction de Noxa par siRNA dans les cellules HCT116

p21<sup>-/-</sup> entraîne une baisse de la sensibilité à l'ABT-737 indiquant que Noxa contribue à l'apoptose induite par le BH3-mimétique dans les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> (figure 32B).

Afin de déterminer si p53 participe au déclenchement de l'apoptose dans les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> traitées à l'ABT-737 en permettant l'induction de Noxa, nous avons analysé l'influence de la mise sous silence de p53 sur l'expression de Noxa. L'extinction de p53 ne permet pas de bloquer l'induction de Noxa lors du traitement des p21<sup>-/-</sup> à l'ABT-737 (figure 32C). La surexpression de Noxa ne permet pas par ailleurs de sensibiliser les cellules HCT116 p53<sup>-/-</sup> au BH3-mimétique (figure 32D). Ces données indiquent que l'induction de Noxa est indépendante de p53 et qu'elle n'est pas suffisante pour sensibiliser les cellules à l'ABT-737 en absence de p53. L'extinction de E2F1 par siRNA ne modifie pas la sensibilité des cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> à l'ABT-737 et n'affecte



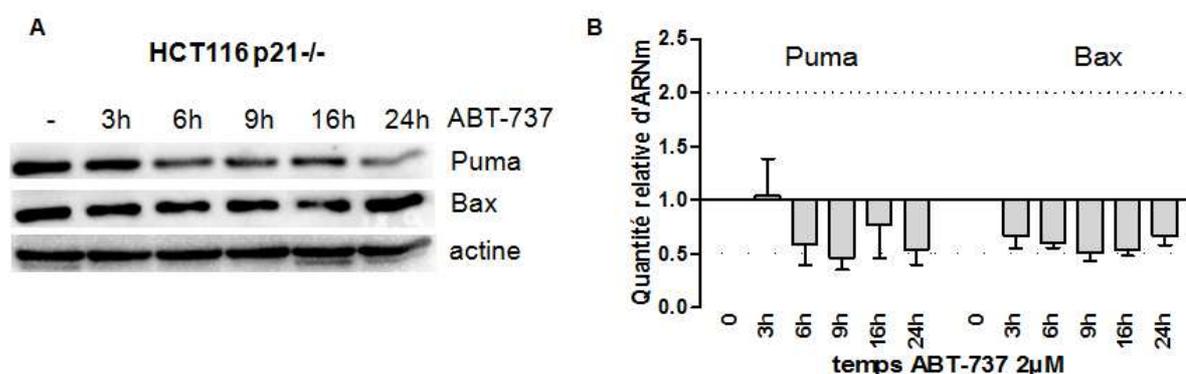
**Figure 32 : L'induction de Noxa régule la sensibilité des HCT116 p21<sup>-/-</sup> à l'ABT-737 indépendamment de p53.** Les lignées HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup> et p21<sup>-/-</sup> sont traitées à l'ABT-737 avant analyse des protéines par western blot (A). Les p21<sup>-/-</sup> sont transfectées par des siRNA contrôle ou dirigé contre Noxa, avant 24h de traitement à 2µM d'ABT-737, avant évaluation de la mortalité par bleu trypan (B). Les HCT116 p21<sup>-/-</sup> sont infectées avec un shRNA contrôle u dirigé contre p53, puis traité 24h à l'ABT-737 avant analyse par western-blot (C). Les HCT116 p53<sup>-/-</sup> sont transfectées par un vecteur d'expression de Noxa puis traitées 24h à l'ABT-737 avant évaluation de la mortalité et analyse western-blot (D). Le traitement à l'ABT-737 entraîne une stabilisation de Noxa, qui inhibe Mcl-1, favorisant l'apoptose qui nécessite la présence de p53 (E).

pas l'expression de Noxa (données non présentées), indiquant que la voie pRb/E2F1 ne serait pas impliquée dans l'induction de Noxa dans ce modèle cellulaire où la voie p53 est active. L'ensemble de ces données indique que l'induction de Noxa joue un rôle dans la sensibilité des cellules p21<sup>-/-</sup> à l'ABT-737, mais cette induction est indépendante de p53 et n'est pas suffisante pour sensibiliser les cellules à l'ABT-737 en absence de p53 (figure 32E).

*b. Etude de l'activité transcriptionnelle de p53 en réponse à l'ABT-737*

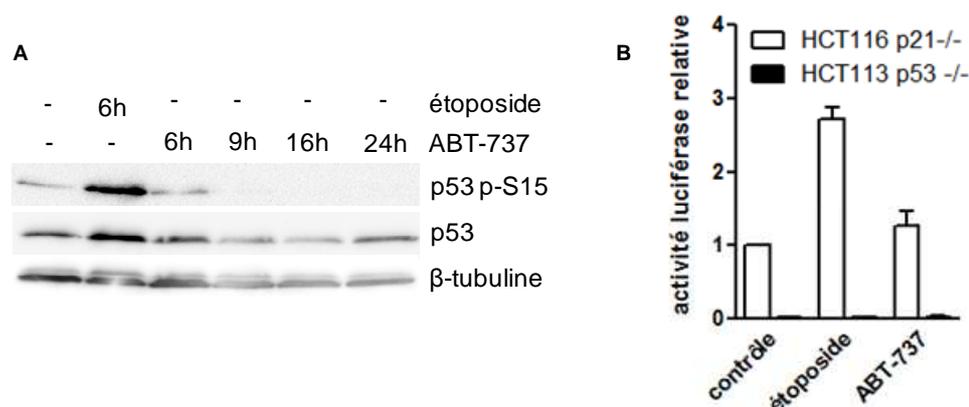
Puma et Bax sont les principaux acteurs de la sensibilité à l'ABT-737 dans les cellules HCT116 déficientes pour p21 (Gallenne *et al.*, 2009) or il s'agit de cibles transcriptionnelles de p53. Une des hypothèses est que la fonction apoptotique de p53 consiste à augmenter l'expression de Bax et Puma sous BH3-mimétique. Nous avons examiné leurs niveaux protéiques et d'ARNm lors d'un traitement à l'ABT-737. L'expression de Puma et Bax n'est pas augmentée que ce soit au niveau protéique ou ARNm suite à un traitement à l'ABT-737 (figure 33A et B). De plus, l'extinction de p53 dans les p21<sup>-/-</sup>, qui abroge la sensibilité à l'ABT-737, n'entraîne pas de diminution du niveau de Bax, ni de diminution de l'activateur Puma (figure 30D). Ainsi, le rôle pro-apoptotique de p53, lors d'un traitement au BH3-mimétique, ne serait pas lié à la transactivation de ces deux acteurs de l'apoptose.

Nous avons alors voulu déterminer si l'activité transcriptionnelle globale de p53, pourrait favoriser l'apoptose suite à un traitement ABT-737 via d'autres cibles. Afin de



**Figure 33 : L'expression de Puma et de Bax n'est pas augmentée lors d'un traitement à l'ABT-737.** Les HCT116 p21<sup>-/-</sup> sont traitées à 2µM d'ABT-737 pendant différents temps, avant western-blot (A) et qPCR (B), pour évaluer l'expression de Puma et Bax.

tester cette hypothèse, nous avons utilisé un système rapporteur basé sur l'activité luciférase. Nous avons transfecté les lignées HCT116 p21<sup>-/-</sup> et p53<sup>-/-</sup> avec un vecteur d'expression de la luciférase sous contrôle d'un promoteur comportant des éléments de réponses consensus à p53. Ainsi, la mesure de l'activité luciférase est le reflet de l'activité transcriptionnelle de p53 dans les cellules. La spécificité du système est contrôlée par l'absence d'activité luciférase dans la lignée p53<sup>-/-</sup>. Comme attendu, lors d'un traitement avec un génotoxique classique, ici l'étoposide, l'activité transcriptionnelle de p53 est rapidement augmentée (figure 34). Par western-blot, nous observons que ce traitement entraîne une stabilisation de p53 et l'augmentation de la phosphorylation sur la sérine en position 15, généralement considérée comme marqueur précoce de l'activation transcriptionnelle de p53 (Shieh *et al.*, 1997). En revanche, un traitement à l'ABT-737 n'entraîne pas de modification de l'activité luciférase et donc de l'activité transcriptionnelle de p53, en accord avec l'absence de phosphorylation sur la Ser-15 et l'absence de stabilisation du suppresseur de tumeur. Nous observons au contraire une déphosphorylation de p53 accompagnée d'une baisse de la quantité de protéine à partir de 9h de traitement. Il semble donc que les voies d'activation transcriptionnelle de p53 ne soient pas déclenchées lors du traitement à l'ABT-737. L'ensemble de ces données indiquent que l'activité transcriptionnelle de p53 n'est pas augmentée lors un traitement à l'ABT-737 des HCT116 p21<sup>-/-</sup>.

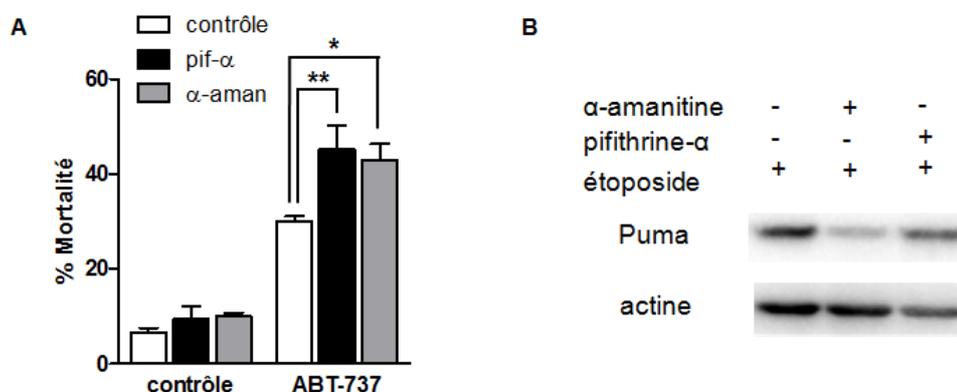


**Figure 34: La fonction transcriptionnelle de p53 n'est pas activé lors d'un traitement à l'ABT-737. (A)** Les HCT116 p21<sup>-/-</sup> sont traitées différents temps à 2μM d'ABT-737, ou 50μM d'étoposide, avant western blot. **(B)** Les HCT116 p21<sup>-/-</sup>, ou p53<sup>-/-</sup> en contrôle négatifs, sont transfectées avec un vecteur d'expression de la luciférase sous contrôle d'un promoteur synthétique répondant à p53. L'activité luciférase est mesurée après 6h de traitement à 2μM d'ABT-737, ou 50μM d'étoposide.

Toutefois, cela n'exclut pas que l'activité transcriptionnelle basale de p53 soit nécessaire à la sensibilité des cellules HCT116 au BH3-mimétique. Pour étudier ce point, nous avons utilisé un inhibiteur de la fonction transcriptionnelle de p53, la pifithrine- $\alpha$  (Charlot *et al.*, 2006), ou un inhibiteur global de la transcription, l' $\alpha$ -amanitine.

Un prétraitement à l' $\alpha$ -amanitine ou la pifithrine- $\alpha$  ne diminue pas la sensibilité des cellules HCT116 p21-/- à l'ABT-737 (figure 35A). Au contraire, leur mortalité est augmentée lors d'un co-traitement de l'ABT-737 avec la pifithrine- $\alpha$  ou l' $\alpha$ -amanitine, de 30 à 45 et 42% respectivement. De manière intéressante, l' $\alpha$ -amanitine a été décrit comme favorisant l'apoptose des HCT116 parentales en entraînant la translocation de p53 à la mitochondrie (Arima *et al.*, 2005a). Cette accumulation de p53 à la mitochondrie pourrait être impliquée dans l'augmentation de la mortalité sous ABT-737 des cellules HCT116 p21-/. L'effet de la pifithrine- $\alpha$  et de l' $\alpha$ -amanitine est contrôlé en analysant l'expression de Puma après traitement à un génotoxique classique l'étoposide (figure 35B). La pifithrine- $\alpha$  contrecarre l'induction de Puma tout comme l' $\alpha$ -amanitine indiquant que ces deux composés bloquent l'activation transcriptionnelle de p53 dans nos conditions.

Ces résultats indiquent non seulement que la fonction transcriptionnelle de p53 n'est pas activée sous ABT-737, mais aussi que l'activité transcriptionnelle de p53 n'est pas requise pour la sensibilité au BH3-mimétique.

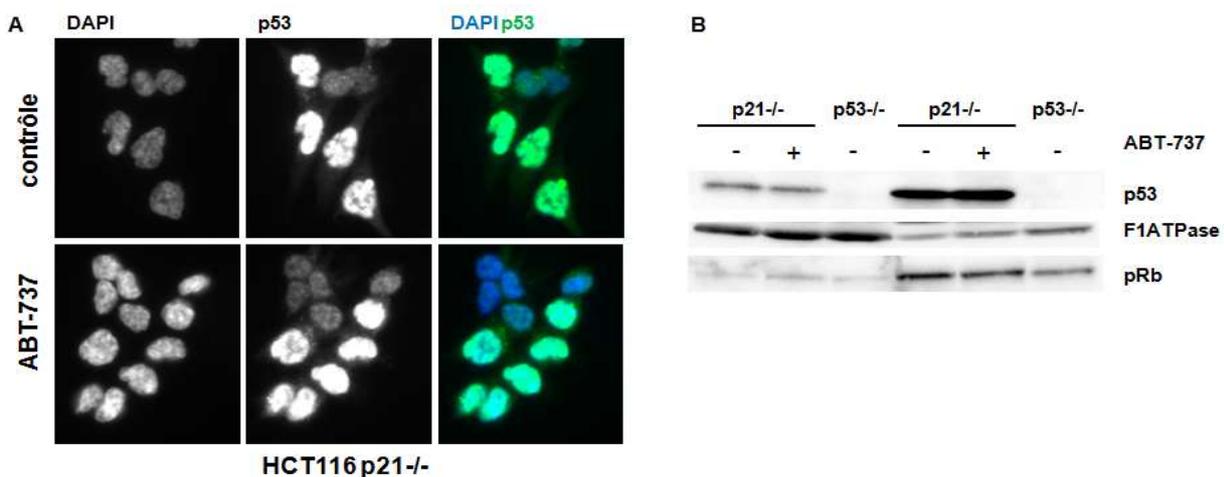


**Figure 35 : L'activité transcriptionnelle de p53 n'est pas requise pour la sensibilité à l'ABT-737.** Les HCT116 p21-/- sont traitées 24h à 10 $\mu$ M de pifithrine- $\alpha$ , et/ou 10 $\mu$ M d'  $\alpha$ -amanitine, puis 24h supplémentaires 2 $\mu$ M d'ABT-737, avant évaluation de la mortalité par bleu trypan **(A)**, et western-blot **(B)**.

*a. p53 est localisé au cytoplasme et au noyau mais sa localisation n'est pas modifiée sous ABT-737*

L'activité transcriptionnelle de p53 ne semble pas impliquée dans la sensibilité à l'ABT-737. Pour déterminer si une fonction cytoplasmique du suppresseur de tumeur pouvait participer à cette sensibilité, nous avons dans un premier temps déterminé si p53 était présent à l'extérieur du noyau dans les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup>, et si un traitement à l'ABT-737 modifiait la localisation de p53.

Après 6H de traitement des cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> à l'ABT-737, nous avons réalisé des marquages immunocytochimiques en utilisant un anticorps dirigé contre p53. Nous observons que si p53 est majoritairement nucléaire, une fraction conséquente de p53 est retrouvée au niveau du cytoplasme des cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> non traitées (figure 36A). Nous n'avons pas détecté de variation de la quantité de p53 cytoplasmique lors du traitement à l'ABT-737. Pour évaluer si une fraction de p53 est associée à la mitochondrie, nous avons analysé par western blot des extraits protéiques issus d'isollements de mitochondries des cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> traitées ou non 24h à l'ABT-737 et des cellules déficientes pour p53. Une fraction de p53 est retrouvée dans les enrichissements mitochondriaux des HCT116 p21<sup>-/-</sup>, à un niveau similaire avant et après traitement au BH3 mimétique. L'analyse du niveau de F1ATPase permet de vérifier l'enrichissement en mitochondrie et l'absence de pRb permet le contrôle de non-contamination par la fraction nucléaire.



**Figure 36 : localisation de p53 dans les HCT116 p21<sup>-/-</sup>.** Les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> sont traitées 6h à 2µM d'ABT-737, et marquées avec un anticorps dirigé contre p53 par immunocytochimie (A). Les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> et p53<sup>-/-</sup> sont traitées 24h à l'ABT-737 et les mitochondries sont isolées avant western blot (B). La protéine F1ATPase sert de contrôle mitochondrial, alors que pRB est un marqueur de la contamination nucléaire.

---

Ces résultats indiquent que p53, bien que majoritairement nucléaire, est présent dans d'autres compartiments cellulaires des cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup>, notamment le cytoplasme et les mitochondries. Nos résultats indiquent que l'activité transcriptionnelle n'est pas requise pour la fonction apoptotique de p53. Les fractions non-nucléaires de p53 pourraient alors jouer un rôle dans la sensibilité des cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> à l'ABT-737.

### **3) Implication des fonctions cytoplasmiques de p53 indépendantes de la famille Bcl-2?**

Bien que décrit majoritairement comme un facteur de transcription, des études plus récentes explorent les nombreux rôles de p53 en dehors du noyau (Comel *et al.*, 2014). Parmi ces fonctions, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'implication de p53 dans les processus d'autophagie (Tasdemir *et al.*, 2008), les processus de mitophagie via la Parkin (Hoshino *et al.*, 2013b), ou la dynamique mitochondriale, via Drp1 (Guo *et al.*, 2014).

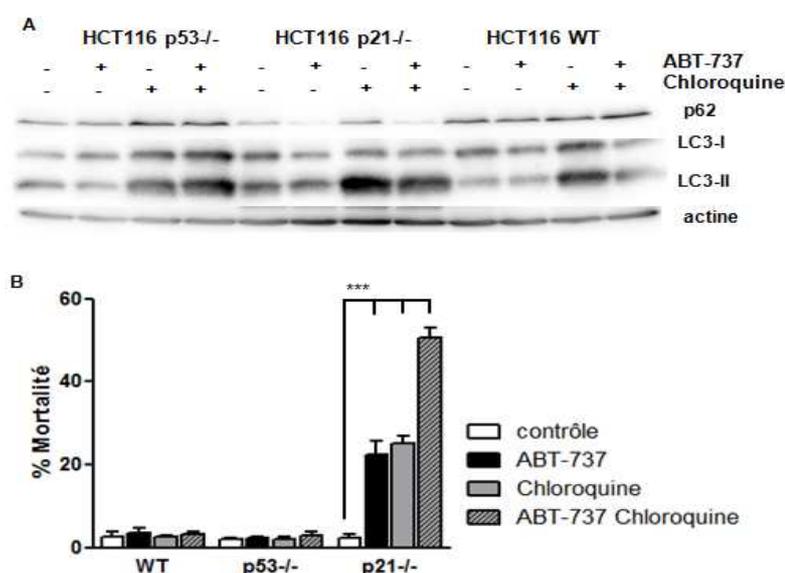
#### *a. Régulation de l'autophagie par p53*

Les études publiées mettent en avant une dualité quant au rôle de p53 dans l'autophagie. En effet, alors que le suppresseur de tumeur active la transcription de gènes de l'autophagie, p53 peut agir comme un inhibiteur de l'autophagie par des activités non-transcriptionnelles (Tasdemir *et al.*, 2008). Nos résultats suggérant un rôle non transcriptionnel de p53, nous nous sommes demandés si son rôle dans la mort induite par l'ABT-737 pourrait être due à sa capacité à inhiber l'autophagie. Pour rappel, l'ABT-737 peut induire une réponse autophagique dans les cellules suite à la libération de Beclin-1, médiateur essentiel de ce processus, des protéines Bcl-xL et Bcl-2 (Maiuri *et al.*, 2007a). Comme l'autophagie peut agir comme processus de survie (confère section A2b de l'introduction), nous nous demandons si p53 permettrait de déplacer l'équilibre vers l'apoptose en inhibant l'autophagie.

Afin d'évaluer l'activité autophagique, nous avons analysé l'expression de deux marqueurs de l'autophagie par western blot, dans nos lignées traitées à l'ABT-737, et/ou à la chloroquine, inhibiteur de la fusion des lysosomes aux autophagosomes (figure 37A). Un des marqueurs est la protéine p62 qui est dégradée dans les

autophagolysosomes formés. L'autre marqueur est la protéine LC3-I qui est convertie en LC3II permettant la formation des autophagosomes, puis qui est dégradée dans les autophagolysosomes. Une baisse du flux autophagique se traduit alors par une augmentation de LC3-II et une augmentation de p62.

Les cellules HCT116 WT et p53<sup>-/-</sup> présentent un profil d'expression de p62 et de ratio LC3-I/LC3-II similaire suggérant que ces cellules ont un niveau d'autophagie proche (figure 37A). Le niveau de p62 est plus faible dans les HCT116 p21<sup>-/-</sup> suggérant que ces cellules présentent une plus forte autophagie basale ce qui pourrait être liée à l'activité transcriptionnelle de p53. Le traitement à l'ABT-737 n'induit pas d'augmentation visible de l'activité autophagique dans les cellules qui n'expriment que peu ou pas p53, alors que le BH3-mimétique entraîne une baisse de p62 traduisant une induction de l'autophagie dans les cellules p21<sup>-/-</sup> qui expriment fortement p53. A noter que, les niveaux de LC3-I et LC3-II ne varient pas sous ABT-737 en contradiction avec le faible niveau de p62 observé. Ainsi, la protéine p53 dans les HCT116 p21<sup>-/-</sup> pourrait permettre l'induction de l'autophagie par l'ABT-737. La chloroquine agit bien en tant qu'inhibiteur dans les trois lignées, conduisant comme attendu à une accumulation de la forme LC3-II, en revanche l'effet sur p62 est moins net. A noter que le niveau de p62 est maintenu bas sous combinaison de la chloroquine avec l'ABT-737 dans les cellules déficientes en p21, suggérant qu'une activité autophagique persiste dans ces conditions.



**Figure 37 : implication de l'autophagie lors du traitement à l'ABT-737.** Les lignées HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup> et p21<sup>-/-</sup> sont traitées 24h à 2µM d'ABT-737 et/ou 50µM de Chloroquine, avant western-blot des principaux marqueurs de l'autophagie (A), et mesure de la mortalité cellulaire par bleu trypan (B).

Ces premières données ne supportent pas l'hypothèse que la fonction apoptotique de p53 dans les cellules p21<sup>-/-</sup> pourrait être liée à sa capacité à inhiber la réponse autophagique et rendre compte de la mort cellulaire de ces cellules traitées par l'ABT-737. L'effet de l'inhibition de l'autophagie par la chloroquine sur la mort induite par l'ABT-737 a été évalué et si le rôle de p53 était d'inhiber l'autophagie, un cotraitement ABT-737 avec la chloroquine devrait permettre d'augmenter la mortalité des cellules WT et p53<sup>-/-</sup>, alors que celle des p21<sup>-/-</sup> resterait inchangée. Lors du traitement des cellules 24h à 50 $\mu$ M de Chloroquine en agent simple, nous observons ~20% de mortalité des cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> et le co-traitement avec l'ABT-737 entraîne un effet additif dans les cellules p21<sup>-/-</sup> (~50% de mortalité). Ces données indiquent que les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> présentent un fort taux d'autophagie basal qui est nécessaire à sa survie. Cette activité pourrait reposer sur l'activité transcriptionnelle de p53. Aucune modification de la viabilité des lignées parentale et p53<sup>-/-</sup> n'est observée suite au traitement avec la chloroquine en agent simple ou combiné avec l'ABT-737 (figure 37B). Comme précédemment, ces données ne sont pas en accord avec l'hypothèse que la fonction apoptotique non transcriptionnelle de p53 lors d'un traitement au BH3-mimétique serait liée à sa capacité à inhiber l'autophagie. Ces résultats suggèrent que la fonction apoptotique non transcriptionnelle de p53 lors d'un traitement au BH3-mimétique ne serait pas liée à sa capacité à inhiber l'autophagie.

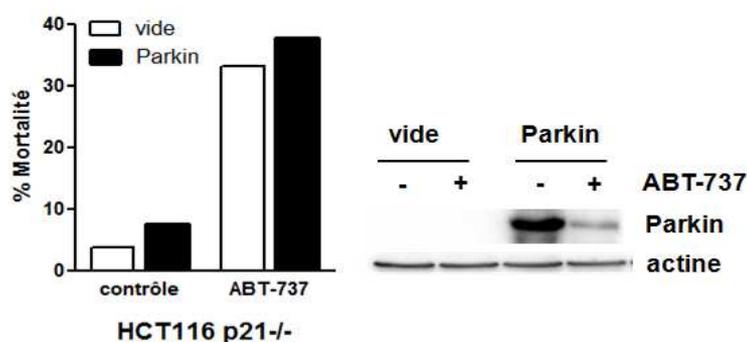
#### *b. Implication de l'ubiquitine-ligase Parkin*

Dans des conditions de sénescence, p53 cytoplasmique a été décrit récemment comme médiateur de l'activité de la protéine Parkin (Hoshino et al., 2013b ; Hoshino et al., 2014b). L'Ubiquitine-ligase Parkin régule par ailleurs la fonction pro-apoptotique de Bax dans les neurones primaires murins, en inhibant sa localisation mitochondriale par l'ubiquitination de deux résidus K21 et K64 (Johnson *et al.*, 2012 ; Charan *et al.*, 2014). Parkin est aussi un acteur majeur de la mitophagie (Winklhofer, 2014). La mitophagie est une forme particulière d'autophagie, au cours de laquelle des mitochondries lésées peuvent être éliminées. En séquestrant directement la Parkin au cytoplasme, p53 empêche son recrutement à la mitochondrie nécessaire au marquage des mitochondries lésées pour permettre leur ciblage par les autophagosomes. Nous nous sommes demandés si le rôle de p53 dans la sensibilité à l'ABT-737 serait d'inhiber la Parkin et de

favoriser la localisation mitochondriale de Bax après sa libération de Bcl-xL par le BH3-mimétique.

Pour tester cette hypothèse, l'expression de la protéine Parkin a été mise sous silence dans les différentes lignées par siRNA. Si le rôle de p53 passe par l'inhibition de la protéine Parkin, son extinction pourrait favoriser la localisation mitochondriale de Bax et ainsi sensibiliser les cellules n'exprimant pas p53 à l'ABT-737. Nous n'avons pas détecté de modification de la sensibilité à l'ABT-737 par l'extinction de l'ubiquitine-ligase par siRNA dans les cellules HCT116 p53<sup>-/-</sup>, ou p21<sup>-/-</sup> préalablement infectées par un shRNA contrôle ou dirigé contre p53 (données non présentés).

Le niveau de Parkin endogène dans les HCT116 étant faible (Ding *et al.*, 2010), nous avons transfecté les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> avec un plasmide permettant la surexpression de Parkin et analysé les effets sur la réponse à l'ABT-737. La surexpression de Parkin pourrait inhiber la localisation de Bax et rendre alors les cellules p21<sup>-/-</sup> résistantes à l'ABT-737. Nous n'avons cependant pas observé de modification de la mortalité des cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> en réponse à l'ABT-737 (figure 38). Ainsi, nos résultats ne supportent pas l'hypothèse d'une implication de la protéine Parkin dans la sensibilisation à l'ABT-737 par p53.

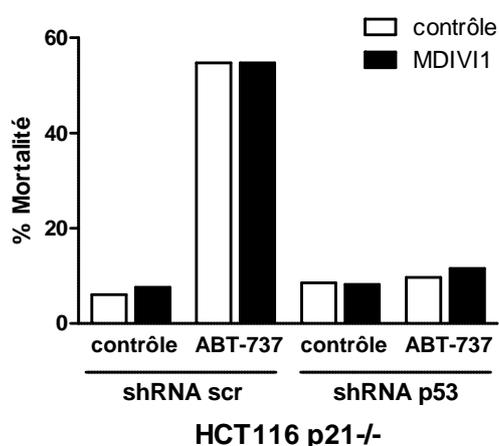


**Figure 38 : La Parkin ne semble pas impliquée dans la sensibilité à l'ABT-737 des HCT116 p21<sup>-/-</sup>.** Les HCT116 p21<sup>-/-</sup> sont transfecté avec un plasmide LZRS vide, ou permettant l'expression de la Parkin, puis traitées 24h à 2 $\mu$ M d'ABT-737, avant évaluation de la mortalité par Bleu trypan, et western-blot (n=1).

### c. Contrôle de la dynamique mitochondriale

Plusieurs études décrivent les liens complexes entre la dynamique mitochondriale et l'apoptose (section B2f de l'introduction). En particulier, la protéine Drp1, acteur principal de la fission de la mitochondrie, favorise l'activation et l'oligomérisation de Bax en liposome ou encore dans des cellules HeLa (Montessuit *et al.*, 2010 ; Brooks *et al.*, 2011). Drp1 est également capable d'interagir directement avec p53, entraînant sa stabilisation à la mitochondrie lors de stress oxydatifs (Guo *et al.*, 2014). Nous avons recherché si cette interaction de p53 avec Drp1 pouvait moduler l'activation de Bax. Dans cette hypothèse, p53 stimulerait l'activation de Bax par Drp1, directement ou via une modulation de la dynamique mitochondriale. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de l'assemblage de Drp1, le MDIVI-1 qui bloque son activité dans la fission mitochondriale et dans l'apoptose (Tanaka & Youle, 2008). Une expérience préliminaire montre que l'inhibition de Drp1 par 48h de traitement à 50 $\mu$ M de MDIVI-1 ne modifie pas la sensibilité des HCT116 p21<sup>-/-</sup> infectées par un shRNA contrôle, ou dirigé contre p53, à 24h de traitement à 2 $\mu$ M d'ABT-737 (figure 39). Ainsi dans ces cellules, l'activité de Drp1 ne semblerait pas requise dans la sensibilité au BH3-mimétique. Le rôle pro-apoptotique de p53 lors du traitement à l'ABT-737 ne serait pas lié à son interaction avec Drp-1.

Nous nous sommes alors plus particulièrement intéressés aux interactions directes que p53 engage avec les différents membres de la famille Bcl-2 et à leurs conséquences sur la sensibilité à l'ABT-737.



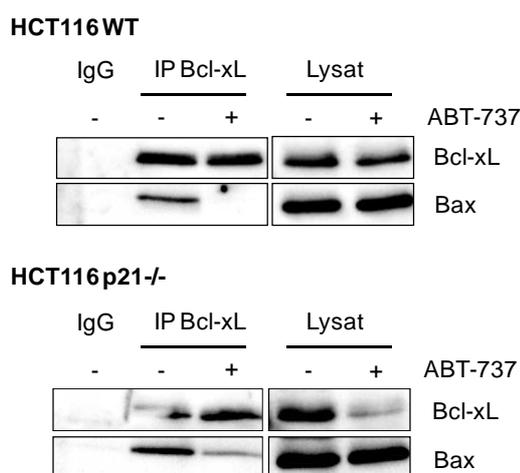
**Figure 39 : L'inhibition de Drp-1 ne modifie pas la sensibilité à l'ABT-737.** Les HCT116 p21<sup>-/-</sup> sont infectées par un shRNA scr ou dirigé contre p53, puis traitées 48h à 50 $\mu$ M de MDIVI1, et 24h à 2 $\mu$ M d'ABT-737, avant évaluation de la mortalité par Bleu trypan (n=1).

#### 4) Effets de p53 sur le réseau d'interactions des protéines de la famille Bcl-2

Le suppresseur de tumeur p53 a été montré comme capable de moduler l'apoptose par des interactions directes avec les membres de la famille Bcl-2 (détaillées en section D de l'introduction). Il se lie notamment aux membres anti-apoptotiques facilitant la libération de leurs partenaires pro-apoptotiques (Mihara *et al.*, 2003 ; Hagn *et al.*, 2010 ; Han *et al.*, 2010). Il peut par ailleurs interagir avec les membres pro-apoptotiques effecteurs, conduisant à leur activation (Chipuk *et al.*, 2004 ; Leu *et al.*, 2004). Il est envisageable que l'implication de p53 dans la sensibilité à l'ABT-737 soit liée à sa capacité à moduler le réseau des protéines de la famille Bcl-2.

##### a. Influence de p53 sur les complexes Bax/Bcl-xL

L'interaction entre le domaine de liaison à l'ADN (DBD) de p53 et les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est bien décrite dans la littérature (Lee *et al.*, 2014). Entraînant un changement de conformation des anti-apoptotiques, p53 induit la libération de leurs partenaires pro-apoptotiques de la poche hydrophobe favorisant la mort cellulaire (Hagn *et al.*, 2010 ; Han *et al.*, 2010). Nous avons voulu déterminer si, en modifiant le réseau d'interactions des protéines de la famille Bcl-2, p53 pouvait faciliter l'action des BH3-mimétiques et favoriser la libération des facteurs pro-apoptotiques,

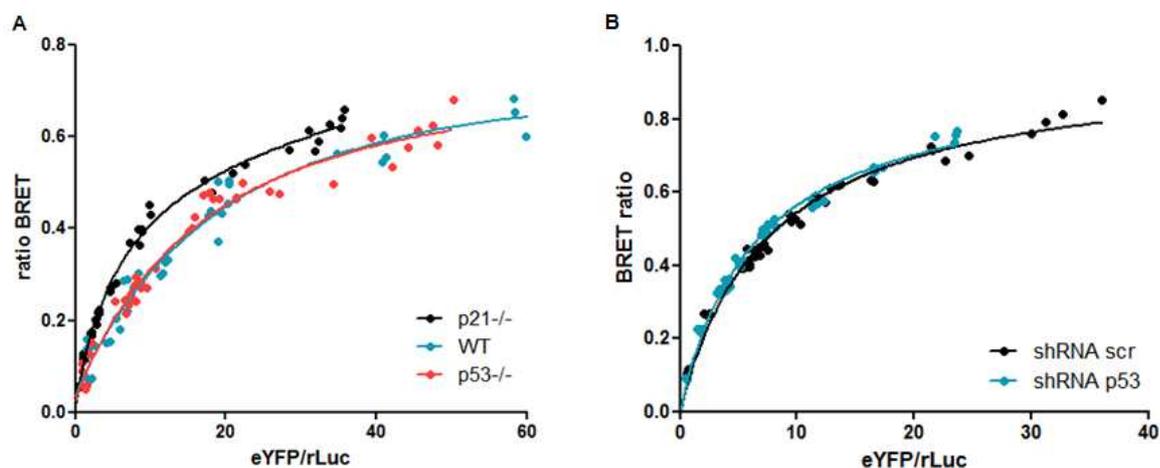


**Figure 40 : p53 n'est pas requis pour la libération de Bax de Bcl-xL après traitement à l'ABT-737.** Le lysat protéique des HCT116 WT, ou p21<sup>-/-</sup>, sont immunoprécipités par un anticorps dirigé contre Bcl-xL, après 16h de traitement à 2 $\mu$ M d'ABT-737.

entraînant la mort. Nous nous sommes concentrés dans un premier temps sur ces interactions entre Bcl-xL et Bax car il avait été montré dans l'équipe que l'apoptose induite par l'ABT-737 des cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> résultait de la libération de l'effecteur Bax de Bcl-xL (Gallenne *et al.*, 2009). Nous avons tout d'abord analysé si le niveau de Bax co-immunoprécipité avec Bcl-xL différait entre les cellules HCT116 parentales ou p21<sup>-/-</sup>, traitées ou non 16h à 2 $\mu$ M d'ABT-737 (figure 40). Nous avons réalisé pour cela une lyse protéique en tampon CHAPS pour empêcher le phénomène d'activation de Bax par les tampons de lyse puissants contenant du Triton ou Tween (Ivashyna *et al.*, 2009). Dans la lignée sensible HCT116 p21<sup>-/-</sup>, nous observons une libération de Bax de Bcl-xL sous ABT-737 comme décrit précédemment (Gallenne *et al.*, 2009). Cette libération de Bax est également retrouvée dans les cellules de la lignée HCT116 parentale qui est pourtant résistante à l'ABT-737. Ainsi, la résistance des cellules n'est pas due à un défaut de libération de Bax de Bcl-xL par l'ABT-737 quand p53 est peu exprimé.

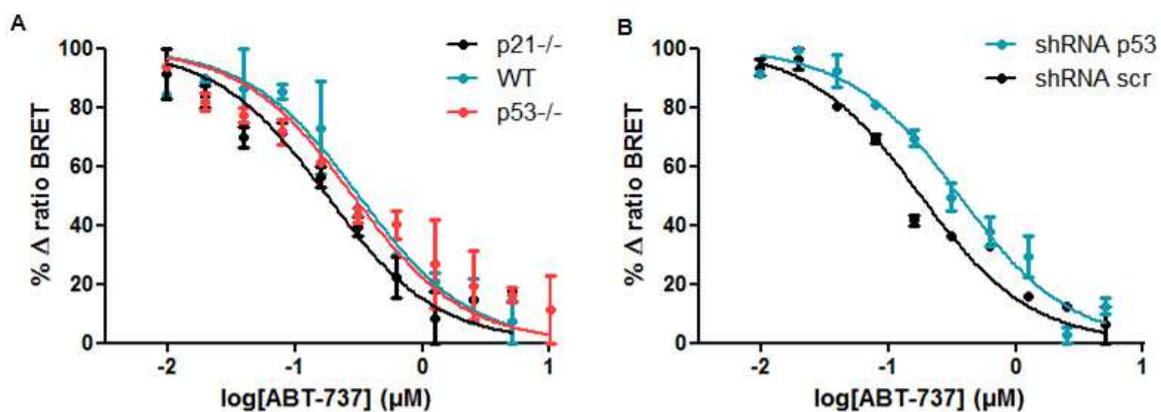
Pour étudier cette interaction dans des cellules vivantes et de manière dynamique et déterminer si p53 pouvait affecter la formation ou la dissociation des complexes Bcl-xL/Bax, nous avons utilisé la technique de transfert par résonance d'énergie bioluminescente (BRET). Cette technique est basée sur le transfert d'énergie entre une protéine donneuse fusionnée à la luciférase, et une protéine acceptrice fusionnée à la eYFP. En prenant en charge son substrat, la luciférase émet une lumière bleue à 475nm. Si les protéines donneuses et acceptrices interagissent, la protéine eYFP se trouve à proximité de la luciférase (<10nm). Elle est ainsi excitée par la lumière émise et réémet une lumière à 530nm. Pour étudier l'affinité des complexes Bax/Bcl-xL dans les différentes lignées, nous avons transfecté des concentrations constantes de donneur (Bax fusionné à la luciférase) et des concentrations croissantes d'accepteur (Bcl-xL fusionné à la eYFP). Nous avons déterminé le BRET50 du couple qui correspond au ratio eYFP totale/rLuc à la moitié du BRET maximal. Il reflète la quantité de protéine acceptrice qui interagit avec la moitié des protéines donneuses. Ce BRET50 est donc inversement proportionnel à l'affinité relative entre les partenaires. Une différence de BRET50 entre différentes conditions indique une variation de l'affinité entre les deux protéines étudiées (pour exemple voir Bah *et al.*, 2014).

Les courbes de saturation BRET entre eYFP-Bcl-xL et rLuc-Bax, obtenues dans les lignées HCT116 WT et p53<sup>-/-</sup>, sont similaires avec un BRET<sub>50</sub> de 14,6±2,2 et 15,7±0,3 respectivement (figure 41A). Dans la lignée p21<sup>-/-</sup>, le BRET<sub>50</sub> est très inférieur avec une valeur de 7,8±0,4, indiquant une affinité relative plus forte entre les protéines Bax et Bcl-xL. Ceci peut se traduire par plus de complexes Bax/Bcl-xL dans les cellules à l'état basal. Cette caractéristique des cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> pourrait rendre compte de leur plus forte sensibilité envers l'ABT-737, le BH3-mimétique permettant alors la libération d'une quantité plus importante de Bax. Afin de savoir si p53 est impliqué dans cette plus forte affinité relative entre Bcl-xL et Bax, la même expérience a été réalisée dans la lignée p21<sup>-/-</sup> préalablement infectée par un shRNA contrôle ou dirigé contre p53. Les courbes de saturation obtenues dans les p21<sup>-/-</sup> shRNA contrôle ou p53 sont superposables, avec des BRET<sub>50</sub> similaires de respectivement 8,0±0,4 et 6,2±0,3 (figure 41B). Les cellules p21<sup>-/-</sup> infectées par le shRNA dirigé contre p53 ne sont plus sensibles à l'ABT-737, alors que l'affinité relative de Bcl-xL et Bax est similaire à celle mesurée dans les cellules infectées par un shRNA contrôle qui demeurent sensibles à l'ABT-737. La différence des complexes entre Bax et Bcl-xL en condition basale n'est pas liée à p53 et n'est pas une condition suffisante pour rendre compte de la différence de sensibilité à l'ABT-737.



**Figure 41 : p53 ne modifie pas les propriétés du complexe entre rLuc-Bax et eYFP-Bcl-xL.** Les lignées HCT116 WT, p21<sup>-/-</sup>, p53<sup>-/-</sup> (A) et p21<sup>-/-</sup> infectées par un shRNA contrôle ou dirigé contre p53 (B) sont transfectées par 50ng de rLuc-Bax et des concentrations croissantes de eYFP-Bcl-xL, avant mesure du BRET.

Nous nous sommes alors demandés si ces complexes présentaient des différences de dissociation dans les différentes lignées lors d'un traitement à l'ABT-737. Nous avons réalisé des mesures de BRET dans nos différentes lignées en conditions de donneur et d'accepteur fixes dans un ratio proche du BRET50 afin d'observer le maximum de variation du BRET, en traitant 6h à des concentrations croissantes d'ABT-737. Le BRET50 représentant le ratio donneur/accepteur pour lequel la moitié des molécules donneur sont occupées par un accepteur, travailler dans ce ratio permet d'observer une diminution ou augmentation du nombre de ces complexes avec une amplitude maximale lors d'un traitement. Nous pouvons ainsi mesurer les EC50 (concentration efficace 50), représentant la concentration d'ABT-737 permettant 50% de l'effet maximal observé sur les complexes entre eYFP-Bcl-xL et rLuc-Bax (figure 42). Les EC50 obtenus dans les lignées HCT116 WT et p53<sup>-/-</sup> sont supérieurs à ceux obtenus dans la lignée p21<sup>-/-</sup> (respectivement  $0,31 \pm 0,001 \mu\text{M}$ ,  $0,28 \pm 0,001 \mu\text{M}$  et  $0,16 \pm 0,075 \mu\text{M}$ ). L'extinction de p53 dans les cellules p21<sup>-/-</sup> entraîne une augmentation de l'EC50 avec une tendance à la différence (shRNA contrôle :  $0,20 \pm 0,16 \mu\text{M}$  et shRNA p53 :  $0,35 \pm 0,20 \mu\text{M}$ ,  $P\text{value}=0,0451$ ). Ces résultats indiquent que p53 pourrait favoriser la dissociation des complexes Bax/Bcl-xL par l'ABT-737, bien que les EC50 obtenus restent d'un même ordre. A noter que ces EC50 sont très inférieurs à la dose de  $2 \mu\text{M}$  utilisée dans le reste de l'étude, qui est donc bien saturante pour la dissociation des complexes entre Bax et Bcl-xL dans l'ensemble de nos lignées. L'ensemble de ces résultats indiquent que p53 ne modifierait par la formation de complexes Bax/Bcl-xL en absence de traitement, mais favoriserait



**Figure 42 : p53 favorise sensiblement la dissociation des complexes rLuc-Bax/eYFP-Bcl-xL par l'ABT-737.** Les lignées HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup> et p21<sup>-/-</sup> (A), et p21<sup>-/-</sup> infectées par un shRNA contrôle ou dirigé contre p53 (B) sont transfecté avec un ratio eYFP-Bcl-xL/rLuc-Bax proche du BRET50, puis traitées 6h à des concentrations croissantes d'ABT-737 avant mesure du BRET.

---

la dissociation de ces complexes par l'ABT-737. Ainsi, nous avons voulu déterminer si la fonction de p53 dans la réponse à l'ABT-737 serait liée à sa capacité à favoriser la dissociation des complexes par le BH3-mimétique.

*b. p53 est nécessaire à la mort des cellules en absence des principaux anti-apoptotiques*

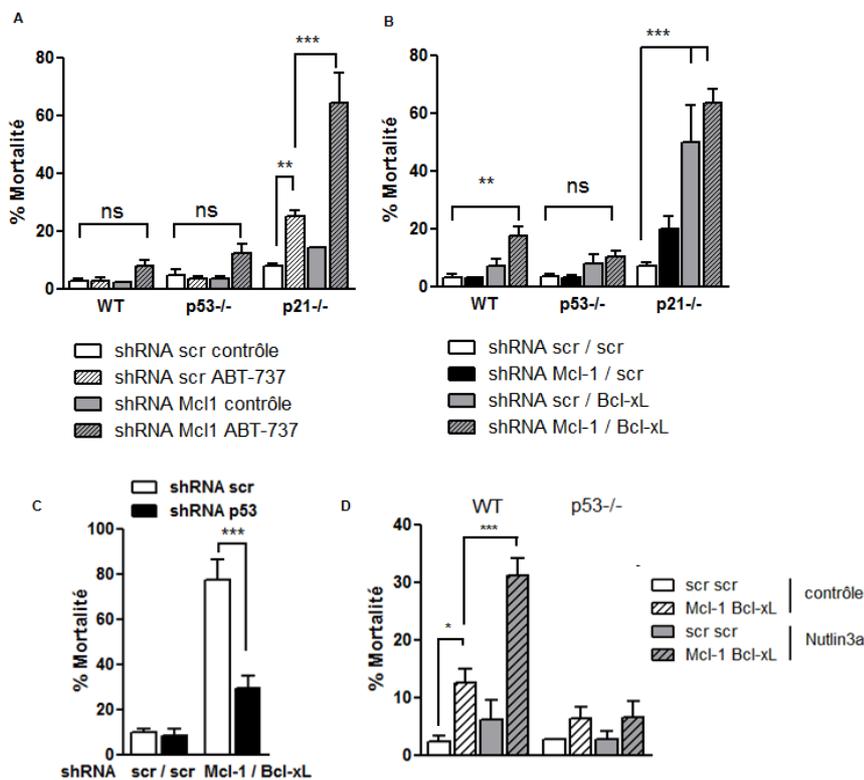
Les résultats de BRET suggèrent que le rôle de p53 favoriserait la libération des pro-apoptotiques lors du traitement à l'ABT-737. Une autre approche pour tester cette hypothèse est d'étudier si p53 serait toujours requis dans la mort induite par la mise sous silence des deux principaux anti-apoptotiques des différentes lignées, Mcl-1 et/ou Bcl-xL. Pour note, la mise sous silence de Bcl-2 dans ces lignées n'a pas de conséquence notable sur la viabilité (Gallenne *et al*, 2009). L'efficacité des shRNAs à diminuer l'expression des cibles a été validée par western blot (données non présentées).

Dans les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup>, l'extinction de Mcl-1 seule n'entraîne pas d'augmentation significative de la mortalité. En revanche, elle augmente la mortalité sous ABT-737 : les cellules infectées par le shRNA contrôle ont une mortalité de 25% sous ABT-737, alors que les cellules infectées par le shRNA dirigé contre Mcl-1 présentent jusqu'à 65% de mort sous traitement au BH3-mimétique en accord avec les données publiées (figure 43A ; Gallenne *et al*, 2009). Ces résultats rendent compte du rôle de frein majeur joué par Mcl-1 lors du traitement à l'ABT-737. Cependant, l'extinction de Mcl-1 ne permet pas de sensibiliser à l'ABT-737 les cellules HCT116 WT et p53<sup>-/-</sup>. L'extinction successive de Mcl-1 puis Bcl-xL induit une forte mortalité sous shRNA dans les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> de 63% (figure 43B). Contre toute attente, cette double extinction n'entraîne qu'une mortalité limitée dans la lignée HCT116 WT (18%) et pas de mortalité significative dans la lignée HCT116 p53<sup>-/-</sup>. Dans ces cellules, les pro-apoptotiques sont ainsi majoritairement libres sans que ceux-ci puissent être activés et conduire à la mort cellulaire. L'extinction de p53, réalisée préalablement aux extinctions de Mcl-1 et Bcl-xL, entraîne une baisse significative de la mortalité des cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup>, de 78% en triple infection contrôle, Mcl-1 et Bcl-xL contre 29% sous shRNA p53, Mcl-1 et Bcl-xL (figure 43C). Ce résultat majeur indique que p53 est requis également pour la mort induite en réponse à la mise sous silence de Mcl-1 et Bcl-xL suggérant que le rôle de p53 serait lié à l'activation de l'effecteur apoptotique. Ainsi la surexpression de p53 devrait sensibiliser les cellules HCT116 WT à la double extinction Mcl-1/Bcl-xL. Le

traitement par la Nutlin3a permet d'augmenter significativement la mortalité des cellules HCT116 WT jusqu'à 31%, mais pas celle des cellules p53<sup>-/-</sup> dans lesquelles Mcl-1 et Bcl-xL ont été éteints par RNA interférence (figure 43D). Ainsi, la stabilisation de p53 est suffisante pour augmenter la mortalité induite en réponse à la mise sous silence des principaux anti-apoptotiques.

*c. Rôle de p53 dans l'activation de Bax*

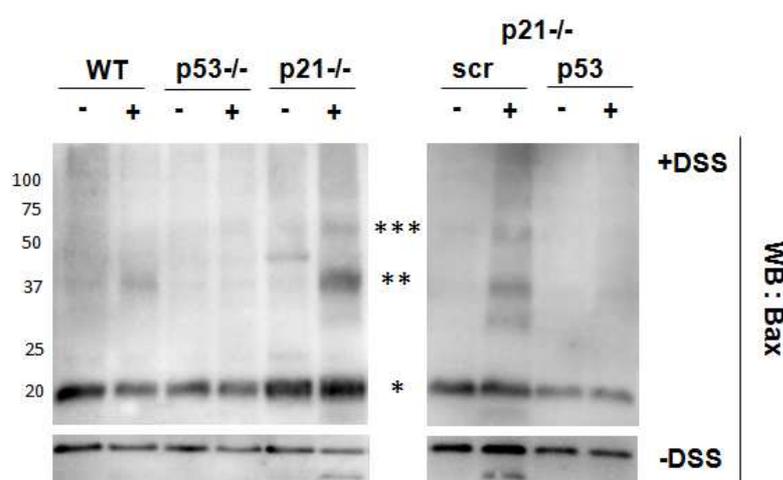
Nos résultats indiquent que p53 est requis pour l'apoptose induite par les BH3-mimétiques, mais également pour la mort induite par la mise sous silence de Bcl-xL



**Figure 43 : p53 est nécessaire à la mort des cellules en absence des principaux anti-apoptotiques.** Les lignées HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup> et 21<sup>-/-</sup> ont été infectées par un shRNA dirigé contre Mcl-1, et traitées 24h après infection pendant 16h à 2µM d'ABT-737, avant évaluation de la mortalité (A). Les cellules HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup>, p21<sup>-/-</sup> (B), ou p21<sup>-/-</sup> préalablement infectées par un shRNA contrôle ou dirigé contre p53 (C), sont infectées par un shRNA dirigé contre Mcl-1, puis 6h plus tard par un shRNA dirigé contre Bcl-xL. 16h après infections, les cellules sont rincées, incubées 48h avant évaluation de la mortalité. Les cellules HCT116 WT et p53<sup>-/-</sup> sont infectées par un shRNA dirigé contre Mcl-1, puis 6h plus tard par un shRNA dirigé contre Bcl-xL. 16h après infections, les cellules sont rincées, incubées 48h avec 10µM de Nutlin3a avant évaluation de la mortalité (D). La mortalité cellulaire est évaluée en triplicata par bleu trypan.

et/ou Mcl-1. Leurs partenaires pro-apoptotiques sont dans ce cas majoritairement libres dans les cellules, toutefois il n’y a pas de déclenchement de l’apoptose si p53 est absent ou mis sous silence. Ces données majeures suggèrent que p53 joue un rôle dans la voie mitochondriale de l’apoptose, en aval de la libération des pro-apoptotiques par leurs partenaires anti-apoptotiques. Nous nous sommes alors demandés si p53 était requis dans l’une ou plusieurs des différentes étapes de l’activation de Bax (détails en section B2b de l’introduction).

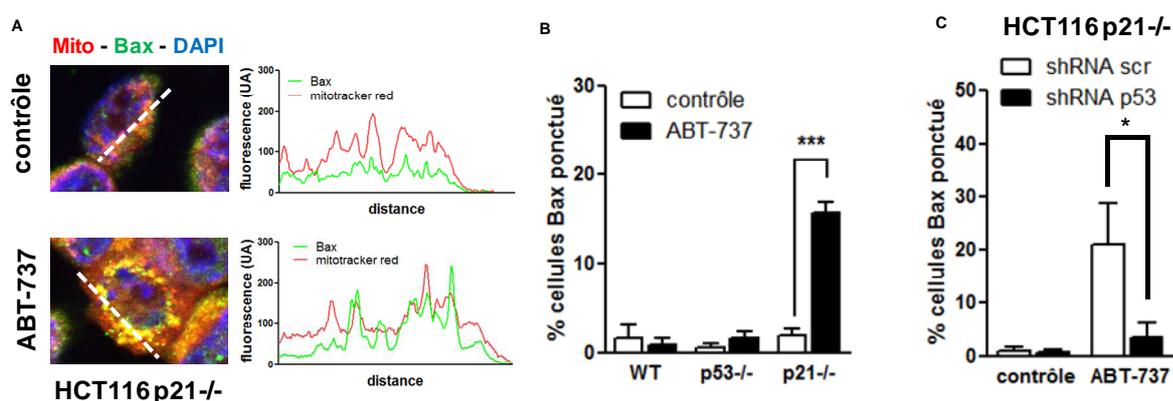
Nous avons analysé si p53 était requis pour la formation d’oligomères de Bax, étape ultime de son activation permettant la libération de facteurs pro-apoptotiques de l’espace inter-membranaire de la mitochondrie dans le cytoplasme. Le disuccinimidyl suberate (DSS) a été utilisé pour réaliser un pontage covalent des protéines, avant western-blot, permettant de visualiser les formes oligomérisées de Bax. Dans les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup>, après 16h de traitement à 2 $\mu$ M d’ABT-737, nous observons l’apparition d’une forme complexée de Bax, d’une taille en accord avec un homo-dimère (figure 44). Des formes complexées de poids supérieurs sont également détectables. En revanche, ces formes complexées de Bax ne sont pas retrouvées dans les lignées parentales et déficientes pour p53. L’extinction de p53 dans les p21<sup>-/-</sup> bloque l’apparition des formes complexées de Bax sous BH3-mimétique. Ainsi, p53 apparaît requis pour l’oligomérisation de Bax sous ABT-737.



**Figure 44 : p53 est nécessaire à l’oligomérisation de Bax lors d’un traitement à l’ABT-737.** Les lignées HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup>, p21<sup>-/-</sup>, et p21<sup>-/-</sup> infectées par un shRNA contrôle ou dirigé contre p53, sont traitées 16h à l’ABT-737. Des pontages covalents sont réalisés par incubation des lysats protéiques au DSS, avant analyse western-blot. Les bandes correspondent aux tailles de Bax en monomère indiquée par (\*) dimère (\*\*) ou tétramère (\*\*\*).

Afin de rechercher si p53 pouvait influencer sur la localisation de Bax, nous avons réalisé des marquages immunocytochimiques en utilisant un anticorps dirigé contre Bax dans les différentes lignées traitées 20h à l'ABT-737. Dans les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup>, Bax apparaît comme majoritairement cytoplasmique avec un marquage diffus en condition non traitée et formant des foci au niveau des mitochondries marquées au mitotracker rouge après traitement (figure 45A). En revanche, nous observons peu de marquage en foci dans les cellules HCT116 WT et p53<sup>-/-</sup> même après traitement. Nous dénombrons 15% de cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> présentant un marquage Bax en foci sous ABT-737 et moins de 2,5% avec les lignées WT et p53<sup>-/-</sup> (figure 45B). L'extinction de p53 par shRNA dans les p21<sup>-/-</sup> diminue significativement le nombre de cellules présentant un marquage en foci suite au traitement à l'ABT-737, de 20% à 3% (figure 45C). Ces données indiquent que la protéine p53 joue un rôle dans la localisation mitochondriale de Bax sous ABT-737.

Enfin, nous avons réalisé, dans les différentes lignées traitées ou non à l'ABT-737, des immuno-précipitations dirigées contre Bax utilisant un anticorps polyclonal classique reconnaissant l'ensemble de ses conformations et un anticorps 6A7 spécifique de la conformation ouverte de Bax, considérée comme une des premières étapes de son activation. Après 16h de traitement à 2 $\mu$ M d'ABT-737, nous détectons une fraction 6A7- positive de Bax dans les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup>, très faiblement observée dans les

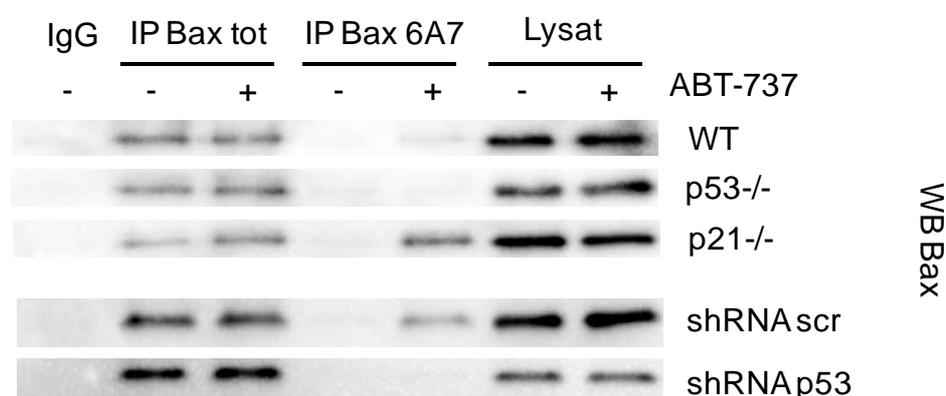


**Figure 45 : p53 est requis pour la relocalisation mitochondriale de Bax lors d'un traitement à l'ABT-737.** Les cellules HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup>, p21<sup>-/-</sup> (A,B) et p21<sup>-/-</sup> infectées par un shRNA contrôle ou dirigé contre p53 (C) sont traitées 20h à 2 $\mu$ M d'ABT-737, marquées au mitotracker® red, avant fixation et marquage immunocytochimique de Bax. Les photos ont été prises avec un objectif x63 (ouverture numérique 1,4) monté sur un Zeiss Axiovert 200M.

cellules HCT116 WT et pas du tout dans les cellules HCT116 p53<sup>-/-</sup> (figure 46). La conformation 6A7-positive n'est plus retrouvée suite au traitement au BH3-mimétique lorsque p53 est mis sous silence dans les HCT116 p21<sup>-/-</sup>. Ainsi, la présence de p53 est nécessaire pour observer une conformation active de Bax dans les cellules traitées à l'ABT-737. L'ensemble de ces données indique que, si p53 n'a pas de rôle dans la libération des facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, il est nécessaire pour les différentes étapes de l'activation de l'effecteur Bax après traitement à l'ABT-737.

*d. p53 participe à l'activation de Bax indépendamment de Puma*

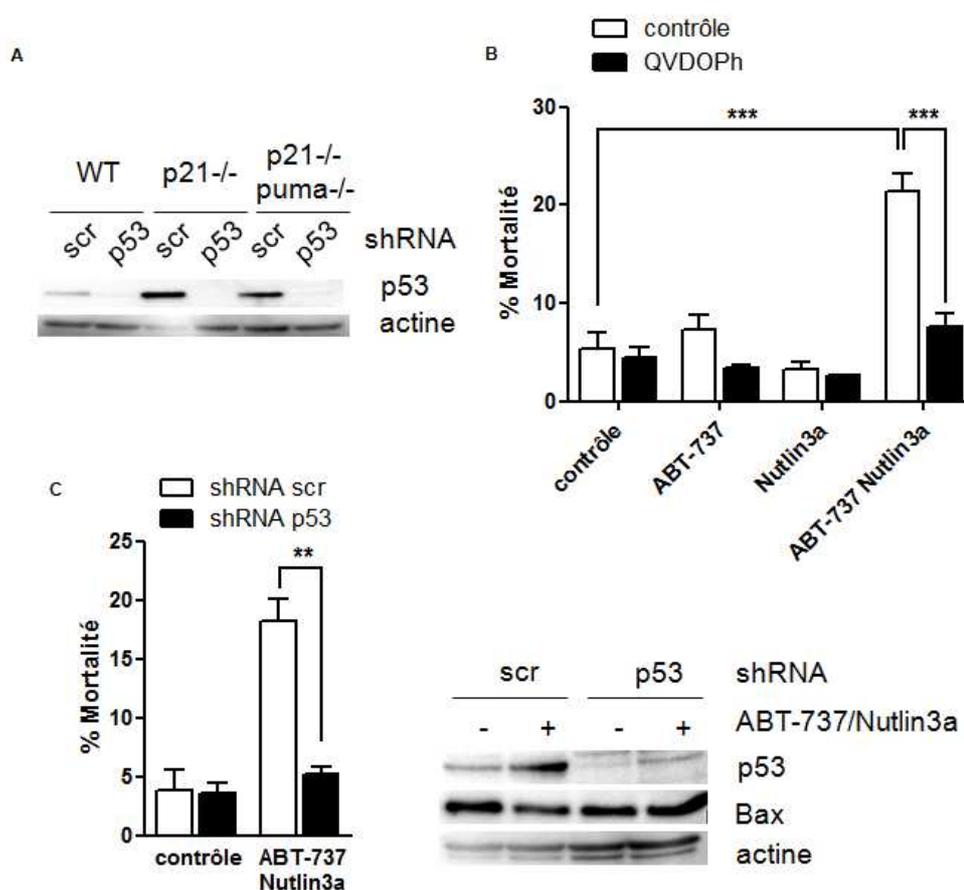
Nos résultats indiquent que p53 favorise l'activation de Bax sous ABT-737, or les précédents travaux de l'équipe montrent que le BH3-seul Puma est l'activateur privilégié de Bax dans ce modèle cellulaire (Gallenne *et al.*, 2009). Nous nous sommes demandés si p53 était capable de favoriser l'activation de Bax, en absence de Puma. Nous avons utilisé la lignée HCT116 p21<sup>-/-</sup> Puma<sup>-/-</sup>, générée à partir des HCT116 WT par Dr. Volgenstein, par délétion du gène Puma suivi de l'inactivation du gène p21 (Yu *et al.*, 2003). Les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> Puma<sup>-/-</sup> ont un taux de p53 similaire à celui des cellules de la lignée HCT116 p21<sup>-/-</sup> (figure 47A) mais ne sont pas sensibles à un traitement à l'ABT-737, en accord avec les résultats précédemment publiés dans l'équipe (Gallenne *et al.*, 2009; Gautier *et al.*, 2011). Nous avons déterminé si la stabilisation de p53 par la Nutlin3a pouvait restaurer une réponse apoptotique à l'ABT-737 de ces



**Figure 46 : p53 est requis pour l'activation conformationnelle de Bax lors du traitement ABT-737 des HCT116.** Les lysats protéiques de HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup>, p21<sup>-/-</sup>, ou p21<sup>-/-</sup> préalablement infectés par un shRNA scr ou dirigé contre p53, et traitées 16h à 2µM d'ABT-737, sont immunoprécipités utilisant un anticorps dirigé contre Bax total, ou contre la conformation dépliée de Bax (clone 6A7).

cellules. Le co-traitement de l'ABT-737 avec la Nutlin3a induit la mortalité de 21% des HCT116 p21<sup>-/-</sup> Puma<sup>-/-</sup> (figure 47B). L'inhibiteur des caspases, QVD-OPH, bloque la mort des cellules co-traitées à l'ABT-737 et Nutlin3a, indiquant que cette mort est dépendante de l'activité des caspases. La mise sous silence de p53 réduit également la sensibilité des cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> Puma<sup>-/-</sup> indiquant que p53 est requis pour la sensibilité au cotraitement Nutlin3a/ABT-737 (figure 47C).

Nous avons alors recherché si la stabilisation de p53 entraînait la sensibilisation à l'ABT-737 en favorisant l'activation de Bax même en absence de son activateur privilégié Puma. Nous avons étudié l'activation conformationnelle de Bax lors du traitement des HCT116 p21<sup>-/-</sup> Puma<sup>-/-</sup> après traitement à l'ABT-737 et à la Nutlin3a par



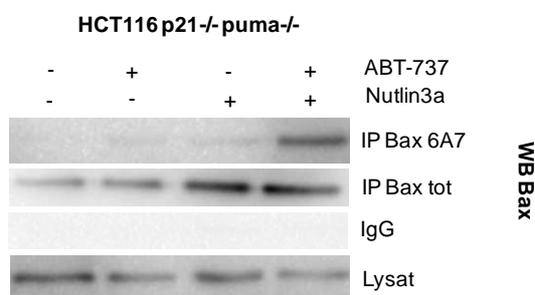
**Figure 47 : La stabilisation de p53 sensibilise les cellules à l'ABT-737 en absence de Puma. (A)** Les cellules HCT116 parentales, p21<sup>-/-</sup> et p21<sup>-/-</sup>puma<sup>-/-</sup> sont transfectées par un shRNA contrôle ou dirigé contre p53, avant analyse du niveau de p53 par western-blot. **(B)** Les HCT116 p21<sup>-/-</sup> puma<sup>-/-</sup> sont traitées 24h avec 2µM d'ABT-737 et/ou 10µM de Nulin3a, avant évaluation de la mortalité par Bleu trypan. **(C)** Les HCT116 p21<sup>-/-</sup> puma<sup>-/-</sup> sont infectées avec un shRNA contrôle ou dirigé contre p53, puis traitées 24h à 2µM d'ABT-737 et 10µM de Nutlin3a, avant évaluation de la mortalité et western-blot.

immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre la fraction totale de Bax et un anticorps 6A7 dirigé contre la conformation dépliée de Bax (figure 48). Alors que le traitement à l'ABT-737 ou à la Nutlin3a seule ne permet pas d'observer de fraction de Bax actif, nous détectons l'apparition d'une fraction de Bax déplié lorsque les cellules p21<sup>-/-</sup> Puma<sup>-/-</sup> sont traitées avec la combinaison ABT-737 et Nutlin3a. Ainsi la stabilisation de p53 permet l'activation de Bax même en l'absence de l'activateur privilégié Puma. On note par ailleurs que cette activation n'est pas liée à une augmentation de Bax qui pourrait favoriser l'auto-activation de l'effecteur. Le western blot du lysat total ne présente en effet pas de modification de la quantité de Bax avec les combinaisons de traitements (figure 48).

Ainsi, l'ensemble de nos données indique que p53 est capable de favoriser l'activation de Bax et ceci indépendamment de Puma, l'activateur principal de Bax dans les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup>.

*a. p53 interagit-il directement avec Bax ?*

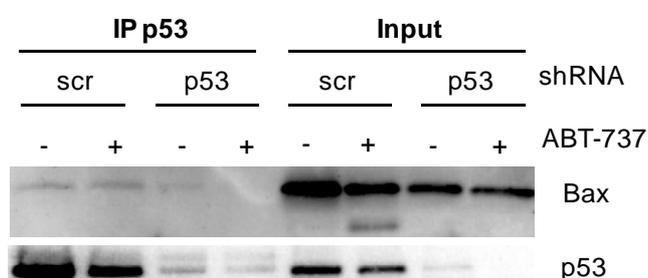
En 2004, Chipuck *et al* ont décrit l'activation directe de Bax par p53 en système acellulaire (détaillé en section D3 de l'introduction). Nos données indiquent que p53 participe à l'activation de Bax. Une hypothèse est que cette activation pourrait résulter d'une interaction entre p53 et Bax.



**Figure 48 : La stabilisation de p53 permet l'activation conformationnelle de Bax sous ABT-737, en absence de Puma.** Les HCT116 p21<sup>-/-</sup> Puma<sup>-/-</sup> sont traitées 20h à 2µM d'ABT-737 et/ou 10µM de Nutlin3a, avant immunoprécipitation par un anticorps dirigé contre le Bax total, ou contre la conformation dépliée de Bax (clone 6A7).

Afin de détecter une interaction entre p53 et Bax dans le modèle cellulaire HCT116, nous avons réalisé des immunoprécipitations après fixation des cellules au paraformaldéhyde. Cette technique, développée pour l'immunoprécipitation de chromatine, a été récemment publiée pour l'étude de complexes entre protéines interagissant de façon transitoire, en particulier de protéines de la famille Bcl-2 (Rooswinkel *et al.*, 2014). La fixation évite la rupture d'interactions faibles et/ou peu représentées car furtives, lors de la lyse protéique. Il est à noter que les complexes Bax/p53 n'ont jamais pu être mis en évidence à ce jour et que seulement des preuves indirectes de l'existence de ce complexe ont été publiées. Une hypothèse avancée est que cette interaction serait particulièrement labile.

Nous avons utilisé les HCT116 p21<sup>-/-</sup> traitées 16h à 2 $\mu$ M d'ABT-737, après infection par un shRNA contrôle, ou dirigé contre p53, comme contrôle négatif. Après fixation et lyse en tampon CHAPS, nous avons réalisé une immunoprécipitation par un anticorps dirigé contre p53, puis nous avons examiné la co-immunoprécipitation de Bax. Nous observons un signal faible correspondant à la protéine Bax co-immunoprécipité avec p53 dans les cellules infectées par un shRNA contrôle. Cependant, on observe également une bande plus faible au niveau de Bax dans les cellules infectées par le shRNA p53. Celle-ci pourrait être due à l'immunoprécipitation d'une faible quantité résiduelle de p53. Le traitement à l'ABT-737, qui libère Bax de Bcl-xL, n'entraîne pas de variation de la quantité de Bax co-immunoprécipité avec p53.



**Figure 49 : Co-immunoprécipitation de Bax avec p53.** Les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> ont été infectées par un shRNA contrôle, ou dirigé contre p53, et traitées 16h à 2 $\mu$ M d'ABT-737. Après fixation au paraformaldéhyde, le lysat est immunoprécipité avec un anticorps contre p53. La présence de la protéine Bax co-immunoprécipitée est évaluée par western-blot (n=1).

Des expériences complémentaires sont nécessaires pour valider l'interaction entre p53 et Bax. Toutefois, ces premières données suggèrent que p53 serait capable d'interagir avec Bax et que cette interaction pourrait rendre compte du rôle apoptotique de p53 dans des cellules traitées à l'ABT-737 à travers l'activation de Bax.

2- Article : "The tumor suppressor p53 contributes to cell death induction in response to BCL-2/BCL-xL inhibition by transcription independent mechanisms"

(en preparation)

Le Pen J, Maillet L, Vuillier C, Gautier F, Juin P, Braun F

**The tumor suppressor p53 contributes to cell death induction in response to BCL-2/BCL-xL inhibition by transcription independent mechanisms**

Janic Le Pen<sup>1</sup>, Maillet Laurent<sup>1</sup>, Céline Vuillier<sup>1</sup>, Fabien Gautier<sup>1,2</sup>, Philippe P. Juin<sup>1, 2\*</sup> and Frédérique Braun<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> UMR 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

<sup>2</sup> Institut de Cancérologie de l'Ouest, Centre de Lutte contre le Cancer René Gauducheau, Saint Herblain, France

<sup>3</sup> 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

---

**1 Abstract**

2 Pro-apoptotic molecules directly targeting the Bcl-2 family network that controls mitochondrial outer  
3 membrane permeabilisation (MOMP) are promising anticancer therapeutics. It is still unclear,  
4 however, whether these molecules bypass major tumor suppressor pathways to induce cell death  
5 or whether the latter play a role in the full efficiency of the former. We show here that the tumor  
6 suppressor p53 contributes to efficient cell death in response to BH3 mimetic inhibitors of Bcl-xL  
7 (ABT-737 and WEHI-59) in colorectal cancer HCTT116 cell lines. This effect of p53 is manifest  
8 even in cells that are depleted in Bcl-xL and Mcl-1 expression. The apoptotic function of p53 is  
9 transcription independent and is required for the full pro-apoptotic activation of BAX in response to  
10 BH3 mimetic inhibitors. Our data strongly argue that p53 promotes a cytoplasmic death signal that  
11 functions downstream of anti-apoptotic proteins inhibition and upstream of MOMP during the  
12 course of BH3-mimetic treatment.

13

**Introduction**

The BCL-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) family consists of more than 20 members that are key regulators of mitochondrial outer membrane permeabilisation (MOMP) and subsequent apoptosis (Chipuk et al., 2008; Martinou and Youle, 2011; Tait and Green, 2010). Cell fate decisions triggered by apoptotic stimuli are dependent on the relative amount of each BCL-2 protein as well as on the interplay between members of this family (Chipuk et al., 2010; Gautier et al., 2011; Leber et al., 2010). The BCL-2 proteins contain up to four conserved stretches of amino acids, known as BCL-2 homology (BH) domains. They are subdivided into three groups depending on their BH-domain composition and their function: the multidomain anti-apoptotic proteins (BCL-xL, BCL-2, MCL-1...), the multidomain pro-apoptotic proteins (BAX, BAK...) and the BH3-only pro-apoptotic members (BAD, BIM, BID, NOXA, PUMA...) (Chipuk et al., 2010; Lalier et al., 2007; Shamas-Din et al., 2011).

One critical step in MOMP is the activation of inert monomeric molecules of BAX/BAK into dimers that nucleate higher order oligomerization and lead to mitochondrial damage (Czabotar et al., 2013b; Moldoveanu et al., 2013; Peng et al., 2013). Anti-apoptotic proteins

prevent this directly by interacting with BAX/BAK and indirectly by interacting with a subclass of BH3-only proteins (the so-called activators, BIM, BID and PUMA) that, when free from anti-apoptotic proteins, bind to BAX/BAK and initiate their activation (Gallenne et al., 2009; Ren et al., 2010). In either case, the interactions involved rely on the binding of the BH3 domain of the pro-apoptotic proteins to a hydrophobic cleft formed by the BH1-2 and 3 domains of BCL-2 homologues (Ding et al., 2014).

Anti-apoptotic BCL-2 proteins are often found in excess in cancer cells, where they contribute to aberrant survival and resistance to current treatments. This underscores the therapeutic interest of developing molecules that inhibit their anti-apoptotic function. A class of « BH3-mimetics » that target more or less selectively the BH3 binding pockets of BCL-2, BCL-xL or MCL-1 has therefore been designed (Ni Chonghaile and Letai, 2008). Among these, ABT-737 and its orally available equivalent ABT-263 targets both BCL-2 and BCL-xL (arguably the most potently anti-apoptotic protein of the family and a major contributor to drug resistance) (Wang et al., 2003) but not MCL-1 (Aranovich et al., 2012; Oltersdorf et al., 2005). They have entered clinical trials but their use may be limited by their secondary effects on BCL-xL dependent platelets. It is thus of particular importance to identify parameters that will contribute to the response of a given tumor sample to BH3 mimetics. Expression of activator BH3-only proteins such as PUMA (Gallenne et al., 2009) and expression of endogenous inhibitors of MCL-1 (such as NOXA, Adams and Cory, 2007) have been shown to favor sensitivity, either by pre-disposing cells to an apoptotic response or by amplifying the effects of the compounds overtime. As an example of the latter case, we showed that the pRB–E2F pathway, which is defective in various human tumors, was recruited by ABT-737 treatment to transcriptionally activate NOXA and promote a feed forward loop leading to cell demise (Bertin-Ciftci et al., 2013).

The tumor suppressor p53, as E2F-1, was described to exert an apoptotic activity. As a transcription factor, it induces various apoptotic genes such as PUMA, NOXA and BAX in response to genotoxic and non-genotoxic stresses (Levine and Oren, 2009; Ryan et al., 2001). Moreover, numerous studies have suggested that p53 might also play an apoptotic

role independently of its transcriptional activity by interacting with anti-apoptotic proteins of the BCL-2 family (Comel et al., 2014; Deng et al., 2006; Green and Kroemer, 2009; Hagn et al., 2010; Han et al., 2010; Vaseva and Moll, 2009) or even by activating pro-apoptotic effectors such as BAX (Chipuk et al., 2004) or BAK (Leu et al., 2004; Sot et al., 2007). It has remained unclear, so far, whether, by any of these properties, p53 might prime cells to respond to BH3 mimetics and/or modulate their adaptive response to these molecules.

We herein describe our finding that constitutive p53 contributes to apoptosis induction by BH3 mimetics by a transcription-independent and anti-apoptotic protein-independent mechanism. Our investigation indicates that under these conditions p53 favors the activation of BAX molecules, thereby killing cells when these are derepressed from anti-apoptotic proteins by BH3 mimetics. The tumor suppressor p53 therefore provides a self sufficient BAX activating signal that is unleashed upon BH3 mimetic treatment.

---

**Results.****p53 promotes cell death in response to ABT-737 treatment.**

We have previously established that the colorectal cancer HCTT116 p21<sup>-/-</sup> cell line is a model cell line where treatment with the dual BCL-2/BCL-xL inhibitor is sufficient to derepress BAX activity, and trigger BAX dependent cell death (Gallenne et al., 2009). In an initial attempt to investigate how p21 would contribute to this phenotype, we compared cell death rates induced by ABT-737 of HCT116 p21<sup>-/-</sup> to that of the parental HCT116 cells. As shown on Figure 1A, cells lacking p21 proved to be more sensitive to this compound. However, since cell death rates in wild-type cells were not affected by silencing of p21 by RNA interference, we inferred that the enhanced sensitivity of HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells might ensue from an additional cryptic alteration this cell line harbors (Figure 1B). Independently from p21 deletion, HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells were described to express high levels of p53 (Ferrandiz et al., 2009) and in agreement, we found that the p21-null cell line exhibited higher level of p53 than the parental cells (Figure 1C).

We thus investigated the role played by endogenous p53 in the apoptotic response to BH3 mimetics by RNA interference and established that silencing of p53 significantly decreased cell death rates induced by treatment in p21-null cells (Figure 1D). Conversely, treatment with the Mdm2 inhibitor Nutlin-3a of wild-type HCT116 (where p21 was left intact) enhanced p53 expression and sensitivity to ABT-737 (Figures 1E). Comforting the involvement of p53 in the efficiency of the Nutlin-3a/ABT-737 combination, HCT116 p53<sup>-/-</sup> were refractory to ABT-737 treatment alone (Figure 1A) or combined with Nutlin-3a (data not shown). Moreover, silencing of p53 by RNA interference abolished the induction of wild-type HCT116 cell death with the combination of Nutlin-3a and ABT-737 (Figure 1F). Similar results were observed in the breast cancer Cal51 cell lines: neither ABT-737 nor Nutlin-3 treatment affected cell viability of these cells whereas the combination promoted cell death unless p53 was previously silenced by RNA interference (Figure S1).

Altogether, these results show that p53, when expressed above a certain threshold, contributes to the apoptotic response induced by ABT-737.

### **p53 does not contribute to ABT-737 efficiency by up regulating NOXA.**

We, and others, have shown that ABT-737 treatment induces the expression of NOXA, a BH3-only protein that essentially functions as an inhibitor of MCL-1, under certain conditions. This provides a feed forward mechanism that accelerates cell death (Bertin-Ciftci et al., 2013; Song et al., 2011). We thus analyzed whether the apoptotic role of p53 described above relied on its ability to transcriptionally regulate the expression of NOXA. As observed in p53 mutant glioma U215 cell lines (Bertin-Ciftci et al., 2013), NOXA was increased in HCT116 p21<sup>-/-</sup> upon ABT-737 treatment (Figure 2A) and silencing of NOXA inhibited cell death induction (Figure 2B). However, silencing of p53, which reduced cell death induced by ABT-737 as shown above, had no detectable effect on NOXA induction by ABT-737 treatment (Figure 2C). This suggests that p53 does not favor NOXA induction upon treatment and that NOXA induction is insufficient *per se* to promote efficient cell death of ABT-737 treated cells when p53 is absent. Consistent with these results, over-expression of NOXA did not succeed to trigger cell death in HCT116 p53-null cells (Figure 2D).

### **p53 transcriptional activity is not readily induced by ABT-737 and it is dispensable to promote cell death in response to the compound.**

Our previous data indicated that PUMA and BAX both intervene in the apoptotic response to ABT-737 treatment in HCT116 p21<sup>-/-</sup> (Gallenne et al., 2009). The two corresponding genes are transcriptional targets of p53. We thus analyzed if the role of p53 in the apoptotic response induced by ABT-737 might be related to its ability to induce the expression of BAX and/or PUMA, either constitutively (thereby predisposing cells to respond) or during the course of the pro-apoptotic treatment (thereby contributing to their adaptive response).

---

PUMA and BAX levels were not detectably decreased by silencing of p53 by RNA interference in sensitive HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells, whether they were treated or not with ABT-737 (Figure 1D). Likewise, expression levels of BAX and PUMA after silencing of p53 in wild-type cells (treated with ABT-737/Nutlin3a treatment or both) were apparently unmodified (Figure 1F). Thorough investigation of putative kinetic changes in BAX and PUMA mRNA and protein expression levels during ABT-737 treatment brought no support to the hypothesis that transcriptional activation by p53 of these two pro-apoptotic genes is induced by the treatment and contributes to the response (Figure 3A). To further substantiate this, we measured the transcriptional activity of p53 upon ABT-737 treatment, using a construct encoding the firefly luciferase reporter gene under the control of a promoter that contains tandem repeats of p53 transcriptional response elements. This activity was not modified in p21-null cells upon ABT-737 treatment (Figure 3B) whereas control experiments showed no detectable luciferase activity in p53-null HCT116 cells and an up regulation of p53-driven luciferase activity in etoposide treated p21-null cells as expected (Figure 3B). We also investigated p53 protein levels upon ABT-737 treatment. Intriguingly, these were slightly diminished after 9H of ABT-737 treatment (Figure 3C) and the phosphorylation at the Ser15 residue (known to promote the stabilization of p53 by abrogating its interaction with MDM2) decreased consistently. Contrasting with the effects of ABT-737, short term treatment with a genotoxic drug (etoposide, 50  $\mu$ M), enhanced p53 expression level as well as the phosphorylation of the Ser15 (Figure 3C).

Finally, in order to address whether any transcriptional activity of p53 contributes to cell death induction by ABT-737, we analyzed the effects of the two following compounds: pifitrin- $\alpha$ , which inhibits p53-dependent transcriptional activation, and  $\alpha$ -amanitin, which potently inhibits RNA polymerase inhibiting transcription (Figure 3D). Neither pre-treatment with pifitrin- $\alpha$  nor that with  $\alpha$ -amanitin, affected cell death rates induced by ABT-737 in HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells, indicating that the transcriptional activity of p53 is dispensable for BH3-mimetic treatment efficiency.

---

**p53 is not absolutely required for ABT-737 to target Bcl-xL.**

We have shown that the sensitivity of HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells to ABT-737 relied in great part on the ability of this compound to target BCL-xL, as its down regulation is sufficient to trigger BAX dependent cell death in these cells (Gallenne et al., 2009). Therefore, the BH3-binding activity of BCL-xL plays a key role in maintaining the viability of HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells. Consistent with these data, we found that HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells were highly sensitive to WEHI-539, designed as a high affinity, selective BCL-XL BH3 mimetic inhibitor, and that p53 is required to efficient cell death promoted by this compound (Figure S2). We thus analyzed whether p53 might contribute to BH3-mimetic induced cell death by finely tuning the BH3 binding activity of BCL-xL (Follis et al., 2014; Hagn et al., 2010) by analyzing its impact on interactions engaged with BAX.

To study the consequences of p53 expression on the propensity of BCL-xL to bind to BAX, we performed quantitative assays of protein interactions in live cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET) experiments. We used Luciferase-fused BAX as a donor and YFP-fused BCL-xL as an acceptor. As previously reported (Bah et al., 2014), transfecting a fixed quantity of BAX donor and an increasing concentration of BCL-xL acceptor lead to saturable BRET signals, indicating that they are due to specific molecular interactions. From titration curves measured in different cellular backgrounds, we measured BRET<sub>max</sub> and BRET<sub>50</sub> (the acceptor to donor ratio yielding 50% of the BRET<sub>max</sub>) values. The latter parameter reflects the relative affinity of donor and acceptor fusion proteins. The BRET<sub>50</sub> value obtained for the BAX/BCL-xL BRET signals was lower in the p21-null cells (7,9 +/- 0,4 nM) than in the wild-type cells (14,6 +/- 2,2nM), indicating that BAX/BCL-xL complexes are favored in this background (Figure 4A and Table 1). However, p53 does not contribute to this tendency, as the BRET50 values, measured in p21-null cells infected either with control shRNA or shRNA against p53, were similar (8 +/- 0,4 nM and 6,2 +/- 0,3 nM, respectively) (Figure 4B and Table 1).

We further used BRET experiments to thoroughly investigate whether p53 may impact on the efficiency of ABT-737 to trigger the dissociation of BAX/BCL-xL in whole live cells. For

---

this purpose we evaluated the EC<sub>50</sub> of ABT-737 for the BAX/BCL-xL BRET signals in p53 depleted and control p21<sup>-/-</sup> cells transfected with a concentration of donor and acceptor in the dynamic range of BRET signals (that is, close to BRET<sub>50</sub> conditions) under a range of ABT-737 concentration. We could detect some effects of p53 depletion in p21<sup>null</sup> on the EC<sub>50</sub> value for ABT-737 (Figure 4C and Table 1). This indicates that p53, in these cells, increases the sensitivity of BAX/BCL-xL interactions to ABT-737. It should be noted, however, that the calculated EC<sub>50</sub> remained in all cases much lower than the concentration of 2 μM used in cell death assays. Thus, if our assays are somehow consistent with a modulation of the sensitivity of BAX/BCL-xL interactions to ABT-737, there nevertheless suggest that this modulation is unlikely to account in itself for the differing sensitivities of p53 proficient and p53 deficient cells to BH3 mimetics. In fact, when we analyzed the influence of p53 on the interactions BCL-xL engages with BAX in the presence or in the absence of ABT-737 by co-immunoprecipitations experiments (Figure 4D and 4E), we detected no obvious difference in the amount of BAX that co-immunoprecipitated with BCL-xL regardless of the level of p53 expression in cells and no obvious difference in the effects of ABT-737 treatment on these interactions.

### **p53 promotes efficient cell death induced by silencing of MCL-1 and BCL-xL.**

Data above led us to determine if p53 would still exert cell death activity in HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells depleted in BCL-xL (the main survival protein in these cells), and/or not in MCL-1 (which modulates BCL-xL dependent survival in these cells, as previously shown in Gallenne et al.2009). We did not investigate BCL-2 because it was previously found that silencing of BCL-2 did not affect p21-null cell viability (Gallenne et al., 2009). Silencing of BCL-xL in p21-null cells promoted efficient cell death rates and concomitant silencing of MCL-1 (which in itself slightly affected cell survival) further enhanced these rates (Figure 5A). These results are consistent with the notion that BCL-xL plays a major role, and MCL-1 a comparatively weaker, and additive one, in maintaining the survival of the HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells in agreement with previous results (Gallenne et al., 2009). Cell death rates induced by silencing

of MCL-1 combined to ABT-737 treatment were similar to those detected by silencing of both MCL-1 and BCL-xL in p21-null (Figure 5B). In contrast, silencing of both MCL-1 and BCL-xL (and, a fortiori, of either one alone) or silencing of MCL-1 combined with ABT-737 treatment triggered very low cell death rates in wild-type and p53-null cells (Figure 5A and 5B). Silencing of p53 strongly diminished cell death rates induced by concomitant silencing of BCL-xL and MCL-1 in p21-null cells whereas increased of p53 expression by Nutlin3a triggered cell death in wild-type in which BCL-xL and MCL-1 had been silenced (Figure 5C and 5D). Nutlin3a had no effect on the viability of p53 null cells in which both MCL-1 and BCL-xL had been silenced (Figure 5D)

These data strongly favor a model wherein p53 promotes cell death by a death signal independently from BCL-xL and MCL-1.

#### **p53 favors BAX activation in ABT-737 treated cells independently from PUMA.**

The data above suggest that in ABT-737 treated cells, p53 might exert a BCL-2-homologues independent effect on BAX activation, similar to that reported in other instances such as UV exposure (Chipuk et al., 2004). We thus investigated whether p53 favors the appearance of biochemical markers of BAX activation in ABT-737 treated cells.

We first evaluated conformational changes in the amino-terminus domain of BAX by immunoprecipitation assays with the BAX 6A7 antibody (that recognizes a N-terminally exposed form of BAX) of lysates from parental, p53-null and p21-null cells treated with 2  $\mu$ M ABT737 during 16H or not. 6A7 immunoreactive forms of BAX were only detected in treated p21-null cells indicating that the insensitivity of the wild-type and p53-null cells to ABT-737 coincides with an absence of BAX activation (Figure 6A). Moreover, the induction of the modified form by ABT-737 treatment was severely impaired in p21-null cells infected with the p53 shRNA compared to those infected with a control shRNA indicating that p53 favors the formation of conformationally modified BAX molecules upon ABT-737 treatment (Figure 6A).

Other features of BAX activation imply translocation to mitochondrial membranes and oligomerization. To evaluate BAX translocation to the mitochondrial membrane, percentages

---

of cells with punctuate BAX distribution (consistent with a mitochondrial localization) were determined after 20h of 2 $\mu$ M ABT-737 treatment in wild-type, p53-null and p21-null cells (Figure 6B). No translocation of BAX was observed in the wild-type cells and in p53-null, in agreement with the absence of activated conformation form of BAX detected in these cells (Figure 6B). In contrast, BAX showed punctuate staining pattern that colocalized with the mitochondria-marker (MitoTracker® Red CMXRos) upon ABT-737 treatment in p21-null cells. Punctuated BAX was also observed in p21-null cells infected with a control shRNA and treated with ABT-737 but not in cells infected with a p53 shRNA lentivector (Figure 6B). Oligomerization of BAX was assessed by crosslinking with DSS followed by immunoblot analysis in parental, p53-null and p21-null cells treated with 2  $\mu$ M ABT-737 during 16H or not (Figure 6C). Consistent with data above, we could evidence that ABT-737 induced BAX oligomerization in p21-null cells and not in wild-type and p53-null cells (Figure 6C). Silencing of p53 in the p21-null cells abolished this effect (Figure 6C).

Altogether these data indicate that p53 favors the formation of active BAX molecules in response to ABT-737. PUMA plays a key role in BAX activation in HCT116 p21<sup>-/-</sup> treated with ABT-737 (Gallenne et al., 2009) ascribed to PUMA's ability to activate BAX. The latter activation can be observed in cell free assays devoid of p53 (Cartron et al., 2004; Gallenne et al., 2009). Thus, p53 may modulate ABT-737 induced BAX activation by acting upstream of PUMA in BAX activation. Alternatively, p53 may provide a BAX activation signal that is independent of PUMA but that adds its effect to these of PUMA to lead to full blown cell death. To discriminate between these possibilities, we investigated whether enhancement of p53 expression might suffice to sensitize PUMA null cells to ABT-737 treatment. To investigate this, p21<sup>-/-</sup> PUMA<sup>-/-</sup> cells were pre-treated by Nutlin3 treatment to induce p53 expression and then with ABT-737. While ABT-737 or Nutlin3a alone had no effect on cell viability, combination of Nutlin3a to ABT-737 promoted p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup> cell death (Figure 7A-B). Cell death induced by ABT-737 combined with Nutlin3a was inhibited by silencing of p53 by RNA interference as well as by pre-treatment with a broad spectrum caspase inhibitor (Q-VD-OPh) (Figure 7B and 7C) indicating that cell death requires p53 and caspase activities.

Moreover, conformational changes of BAX assessed by immunoprecipitation with the 6A7 antibody, showed that the active form of BAX was detected in p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup> cells treated by the combination ABT-737/Nutlin3a (Figure 7D).

Altogether these data indicate that p53 favors the formation and/or accumulation of active BAX molecules in response to ABT-737, and that it can do so, provided its expression is increased, even in the absence of PUMA.

## **Discussion.**

BH3 mimetics are a novel class of anticancer therapeutics that directly targets the core apoptotic machinery. Their use can therefore restore apoptotic competence in otherwise resistant cancer cells and in some instances trigger cell death as single agents. Since such compounds target essentially mitochondrial complexes between anti- and pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family, downstream of numerous signaling pathways, they might, theoretically, overcome many defects related to loss of tumor suppressive pathways. We recently unraveled a link between BH3 mimetic treatment and the pRb/E2F-1 pathway (Bertin-Ciftci et al., 2013), indicating that this view needs to be refined. Indeed, the tumor suppressor pRb contributes to BH3 mimetic efficiency by providing a feed forward amplificatory loop. We show here that, similarly (yet in a mechanistically distinct manner) the tumor suppressor p53 provides an additional signal that favors BH3 mimetic induction of cell death. As a whole, these data indicate that tumor suppressor pathways significantly modulate the cancer cell's response to BH3 mimetic inhibitors of the Bcl-2 family, providing a rationale for combining approaches that restore the former and use the latter.

We serendipitously found that p53 contributes to cell death induction by BH3 mimetics using HCT1116 p21<sup>-/-</sup> cells. Whereas lack of p21 clearly contributes to the sensitivity of these cells to nutrient starvation induced cell death, (Braun et al., 2011), we found that the sensitivity of HCT1116 p21<sup>-/-</sup> cells to ABT-737 results from their high content in p53 and not from p21 deficiency. This evokes a work from Ferrandiz *et al* which showed that

p21 over-expression in p21<sup>-/-</sup> cells did not protect cells against genotoxic stress (Adriamycin) or tyrosine kinase inhibitor (Imatinib) while silencing of p53 resulted in a reduction of cell death rate in p21<sup>-/-</sup> cells (Ferrandiz et al., 2009). Since p53 upregulation by Nutlin3a treatment of HCT116 WT and Cal51 cells is sufficient to sensitize to ABT-737 treatment, we infer that it is the increased expression of p53 per se that favors cell death induction by ABT-737, rather than the putative existence of idiosyncratic conformations of p53 in HCT116 p21<sup>-/-</sup> (Roger et al., 2010).

We found no evidence of p53 transcriptional activation upon short exposure to deadly concentrations of ABT-737, and no evidence of a role of p53 transcriptional activity in the cell death process. No modification in the expression of PUMA and BAX (two transcriptional targets of p53 that play a key role in ABT-737 induction of cell death) was observed and the overall transcriptional activity of p53 was not stimulated in p21-null cells treated with ABT-737. This indicates that the apoptotic function of p53 may not be related to its ability to transcribe these pro-apoptotic genes. Likewise, NOXA was increased in ABT-737 treated HCT116 p21-null cells but this was p53-independent indicating that the effect of p53 is not at the level of NOXA/MCL-1. Moreover, the lack of effect of pre-treatments with either a p53 transcription inhibitor (Pifithrin- $\alpha$ ) or a RNA polymerase II inhibitor ( $\alpha$ -Amanitin) on cell death supports the hypothesis that the apoptotic function of p53 does not require its transcriptional activity. Of note,  $\alpha$ -Amanitin or Pifithrin  $\alpha$  were described to greatly potentiate Nutlin-induced apoptosis in ML-1, and  $\alpha$ -Amanitin treatment of HCT116 cells was found to promote p53 dependent apoptosis probably by acting at mitochondria (Arima et al., 2005b; Vaseva et al., 2009b). Our observation contrasts with the report that ABT-737 induces senescence and activates p53 transcriptional activity upon long term addition to apoptosis resistant cancer cells (Song et al., 2011). One possible explanation for this apparent discrepancy is that our assays are shorter, use lower concentrations of ABT-737 and are performed in sensitive cells. It should be noted, also, that p53 protein levels are downregulated during the course of our treatment, by a process that needs to be elucidated as it may reflect a negative feedback loop, or modifications of p53 that result from its pro-apoptotic role during the treatment.

Our results point to a transcription-independent role for p53 in cell death induced by ABT-737. Consistently we observed that p53 localized in the cytoplasm compartment in the p21-null cells treated, or not, with the BH3-mimetic (Figure S3). They also support the notion that p53 modulate the BCL-2 family network, as reported in numerous studies (Green and Kroemer, 2009; Moll et al., 2005) and they imply that it does so in such a manner that the deleterious effects of BH3 mimetics are amplified. One possibility is that p53 modulates the BH3 binding activity of BCL-xL, and thereby its response to ABT-737. p53 interacts with BCL-xL on a different interface than the actual BH3 binding site, but this interaction (which leads to p53 inhibition, Follis et al., 2013, 2014) modulates binding to pro-apoptotic members in such a way that it can promote release of pro-apoptotic proteins from BCL-xL (Deng et al., 2006; Han et al., 2010; Hagn et al., 2010). Our data do not dispute the fact that these processes may occur, but suggest that they are not critical for p53 contribution to ABT-737 induction of cell death. We could not detect an impact of p53 on the association of BAX/BCL-xL complexes and found that it only slightly affects the ability of ABT-737 to promote the release of BAX from BCL-xL. Even more importantly, silencing of MCL-1 combined to ABT-737 treatment or silencing of BCL-xL triggered p53 dependent cell death.. This implies that p53 initiates a death signal that is independent from BCL-xL and MCL-1, and that kills cells when these proteins are absent or inhibited.

Data above are consistent with the idea that the apoptotic function that p53 plays during ABT-737 induction of cell death relies on its ability to favor BAX activation (Chipuk et al., 2004; Follis et al., 2013; Sot et al., 2007). In support to this, we found that p53 triggered the active conformation of BAX, its oligomerization and its insertion to outer mitochondrial membrane upon ABT-737 treatment. As BAX activation involves self amplificatory processes (Czabotar et al., 2013b), these assays do not help unraveling whether p53 initiates activation and/or favors the generation of more active Bax molecules. It has to be noted, however, that p53 (provided its expression levels were increased) can initiate the formation of active BAX molecules upon ABT-737 treatment even in cells that lack expression of PUMA, which can

---

function itself as an activator. This experiment implies that PUMA and p53 can lead to BAX activation by independent, yet cooperating, mechanisms.

The nature of the BAX activating process that p53 triggers remains elusive so far. One possibility is that p53 functions as a direct ligand activator of BAX. While this cannot be ruled out, we did not succeed to convincingly detect an interaction between p53 and BAX by coimmunoprecipitation or BRET assays (data not shown). Alternatively, BAX activation may be favored indirectly, as a result of the ability of cytoplasmic/mitochondrial p53 to regulate autophagy, mitophagy or metabolism (Comel et al., 2014; Galluzzi et al., 2011; Green and Kroemer, 2009; Hoshino et al., 2013a; Tasdemir et al., 2008). These possibilities are currently under investigation in our laboratory. Overall, and since we detected no modification of the localization of p53 upon ABT-737 treatment (figure S3), in contrast to genotoxic stimuli that cause efficient mitochondrial translocation of p53 (Mihara et al., 2003; Vaseva and Moll, 2009), our data argue that p53 predisposes cells to respond to BH3 mimetics by exerting a latent signal that can (directly or not) favor BAX activation together with PUMA when Bcl-2 homologues are inhibited. BH3 profiling assays are currently underway to provide further evidence that p53 exerts a BAX dependent effect on MOMP regardless of PUMA expression and downstream of anti-apoptotic proteins inhibition.

## **Material and methods.**

### **Cell lines and cell culture.**

The Cal51 cell line obtained from ATCC, was grown in RPMI medium. The human colorectal cancer HCT116 cell lines (parental, p21<sup>-/-</sup>, p53<sup>-/-</sup> and p21<sup>-/-</sup>-PUMA<sup>-/-</sup>), grown in McCoy's 5A, were kindly provided by Dr B. Vogelstein (The John Hopkins Kimmel Cancer Center, Baltimore, MD). When specified, ABT-737 was used at 2 $\mu$ M, WEHI-539 at 2 $\mu$ M, Nutlin-3a at 10 $\mu$ M (Sigma, St Louis, MO, USA), 50 $\mu$ M etoposide (Sigma), 40 $\mu$ M pifithrin- $\alpha$  (Sigma), 10 $\mu$ M  $\alpha$ -Amanitin (Sigma), QVD-OPh at 10 $\mu$ M (R&D System, Minneapolis, MN, USA).

#### - Plasmids and RNA interferences

Cells were transfected with pcDNA-flag or pcDNA3-Noxa vector using Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according manufacturer instructions. Control siRNA (siScr) or p21 siRNA (Santa-cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA, respectively #44230 and #29427) were transfected using HiPerfect transfection reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA) following manufacturer instructions. Recombinant lentivirus (PFG12: shRNA control targeting bacterial  $\beta$ -galactosidase (GTGACCAGCGAATACCTGT) , targeting human BCL-xL (AGGATACAGCTGGAGTCAG) , or targeting human MCL-1 (GAATGCCAGTGACCTGTGT) ; PLKO1: shScr-puro Addgene, Cambridge, MA, USA # 8453, and shp53-puro Addgene, Cambridge, MA, USA# 25636) were engineered, produced, and titrated as previously described (Gallenne et al., 2009). A multiplicity of infection of 3 was used, and further experiments were performed 2 days after infection. Selection of cells infected by shScr-puro and shp53-puro was done by adding 1 $\mu$ g/mL of puromycine to the medium, and cells were used during a maximum of 4 weeks.

#### **Cellular assays**

Luciferase assays were performed by co-transfecting cells with TA-luciferase control vector or p53-reporter luciferase vector (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA, #LR0000 and #LR0057 respectively) and with pCMV- $\beta$ galactosidase vector. After indicated treatment, cells were lysed under agitation in PLB (Promega, Madison, WI, USA) and luciferase activity was measured using Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega).  $\beta$ -galactosidase activity was measured using the specific assay reporter system (Promega) following the manufacturer instructions. The luciferase activity was reported to the  $\beta$ -galactosidase activity.

Bioluminescence Resonance Energy Transfert assays was performed as previously described (Bah et al., 2014). Briefly, cells were seeded on 12 plates and transfected with 50ng/well of pRLuc-BAX vector (BRET donor, BAX fused to luciferase), and increasing amount for saturation curves, or 200ng/well for dose-response curves, of peYFP-BCL-xL vector (BRET acceptor, BCL-xL fused to eYFP). Twenty-four hours after transfection, cells

were re-seeded into white 96-well plate and treated if indicated. Light emission at 485 nm and 530 nm was measured consecutively by using the Mithras fluorescence-luminescence detector LB-940 (Berthold, Thoiry, France) after the addition of the luciferase substrate (coelenterazine H from Uptima, MontLucon, France) at a final concentration of 5  $\mu$ M. The BRET signal was determined by calculating the ratio of the light emitted by the acceptor fusion protein eYFP-BCL-xL (530 nm) over the light emitted by the donor fusion protein Rluc-BAX (475 nm). The values are corrected by subtracting the background signal detected when the donor constructs is expressed with the non-tagged acceptor BCL-xL.

Mitochondrial extractions were performed using Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells Pierce (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL USA) following the manufacturer instructions.

Coimmunoprecipitation assays, using 1  $\mu$ g of the indicated antibody and 500 $\mu$ g of protein lysates in CHAPS buffer, were performed with protein A/G-agarose PureProteome™ system (Millipore) according to manufacturer's recommendations. After western-blot, the proteins were revealed using clean-blot IP reagent Pierce (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL USA).

For immunocytochemical assays, cells were incubated 15min with 150nM de MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen), then washed with PBS and fixed with 1% paraformaldehyde and in PBS for 30 min at RT. Cells were washed three times in PBS and permeabilized with 0.1% SDS in PBS for 10 min at RT. Cells were washed again 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 ; p53 BD Pharmigen #554294). After three washes in PBS, incubation with secondary antibodies (anti-rabbit or anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor 488) was performed in 1% gelatin in PBS for 2h 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 crosslinked experiments were lysed on ice using 1% CHAPS buffer with protease phosphatase inhibitors, and extract were cleared by centrifugation 15min 13 000g at 4°C. 100µg of protein extract were incubated with 5mM of DSS in Hepes 20mM buffer. After tumbling for 30min at room temperature, 50mM of Tris-HCl pH 7,5 was added to stop the reaction. After 15min of incubation, crosslinked extracts were denaturated for western blot.

Cell viability was determined by a trypan blue staining procedure.

### **Immunoblot analysis and antibodies**

After two washings with cold PBS, cells were lysed in ice-cold lysis buffer (SDS: 1%; EDTA: 10 mM; Tris-Hcl pH 8,1: 50 mM; protease inhibitors Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 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). Following antibodies were used: actin (MAB1501R, Millipore), β-tubulin (T0198, Sigma), BAX (A3533, Dako, Glostrup, Denmark), BCL-xL (1018-1, Epitomics), LC3 (4108, Cell Signaling, Danvers, MA, 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 Pharmigen San Diego, CA, USA), p53-phosphoS15 (9284, Cell Signalling). 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) following the manufacturer instructions. Retro-transcription was permormed from 500ng RNA using Maxima First strand cDNA Synthesis kit for RT-qPCR (Fisher Scientifique). Quantitative PCR was performed with EuroBioGreen qPCR Mix Lo-ROX (Eurobio) from 4ng

of retro-transcribed RNA using a Stratagene Mx3005P (Agilent). Data were analysed using Pfaffl method with 3 references genes (Pfaffl, 2001). Following primers were used :

Bax	GCAACTTCAACTGGGGCCGGG	GATCCAGCCCAACAGCCGCTC
Puma	GGAACAGTGGGCCCGGAGAGA	GTGCCGCTGCTGCTCCTCTT
Noxa	GCTGGAAGTCGAGTGTGCTA	CCTGAGCAGAAGAGTTTGGA
ActB	AGAAAATCTGGCACCACACC	CAGAGGCGTACAGGGATAGC
RPLP0	AACCCAGCTCTGGAGAAACT	CCCCTGGAGATTTTAGTGTT
RPS18	ATCCCTGAAAAGTTCCAGCA	CCCTCTGGTGAGGTCAATG

### Data analysis

Data were from at least three independent experiments. 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.

### Acknowledgements.

We thank members of the lab “Cell Survival and Tumor Escape in Breast Cancer” for their technical advice and for fruitful comments. J. Le Pen and C. Vuillier are supported by grants from INSERM Region and the Ministère de la Recherche et de l’Enseignement Supérieur respectively. P. Juin is supported by ARC (n° SFI20101201568), Fondation de France (Tumor committee), Région Pays de Loire and Canceropole Grand Ouest (2010-12798).

---

**Bibliography.**

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

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.

Arima, Y., Nitta, M., Kuninaka, S., Zhang, D., Fujiwara, T., Taya, Y., Nakao, M., and Saya, H. (2005). Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 19166–19176.

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.

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.

Braun, F., Bertin-Ciftci, J., Gallouet, A.-S., Millour, J., and Juin, P. (2011). Serum-nutrient starvation induces cell death mediated by Bax and Puma that is counteracted by p21 and unmasked by Bcl-x(L) inhibition. *PloS One* 6, e23577.

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.

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.

Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell* 37, 299–310.

Comel, A., Sorrentino, G., Capaci, V., and Del Sal, G. (2014). The cytoplasmic side of p53's oncosuppressive activities. *FEBS Lett.* 588, 2600–2609.

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.

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

- 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.
- Ferrandiz, N., Martin-Perez, J., Blanco, R., Donertas, D., Weber, A., Eilers, M., Dotto, P., Delgado, M.D., and Leon, J. (2009). 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* 8, 390–399.
- 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.
- 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., Morselli, E., Kepp, O., Vitale, I., Pinti, M., and Kroemer, G. (2011). Mitochondrial liaisons of p53. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1691–1714.
- 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.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458, 1127–1130.
- Hagn, 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.
- 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.
- Hoshino, A., Mita, Y., Okawa, Y., Ariyoshi, M., Iwai-Kanai, E., Ueyama, T., Ikeda, K., Ogata, T., and Matoba, S. (2013). Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. *Nat. Commun.* 4, 2308.
- Lalier, L., Cartron, P.-F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., and Vallette, F.M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 12, 887–896.
- Leber, B., Lin, J., and Andrews, D.W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene* 29, 5221–5230.

- 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.
- Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* 9, 749–758.
- 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.
- Moldoveanu, T., Grace, C.R., Llambi, F., Nourse, A., Fitzgerald, P., Gehring, K., Kriwacki, R.W., and Green, D.R. (2013). BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 589–597.
- Moll, U.M., Wolff, S., Speidel, D., and Deppert, W. (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 631–636.
- Ni Chonghaile, T., and Letai, A. (2008). Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene* 27 Suppl 1, S149–S157.
- 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.
- 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.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- 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.
- Roger, L., Jullien, L., Gire, V., and Roux, P. (2010). Gain of oncogenic function of p53 mutants regulates E-cadherin expression uncoupled from cell invasion in colon cancer cells. *J. Cell Sci.* 123, 1295–1305.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C., and Vousden, K.H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 332–337.
- Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., and Andrews, D.W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 508–520.
- Song, J.H., Kandasamy, K., Zemskova, M., Lin, Y.-W., and Kraft, A.S. (2011). The BH3 Mimetic ABT-737 Induces Cancer Cell Senescence. *Cancer Res.* 71, 506–515.

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.

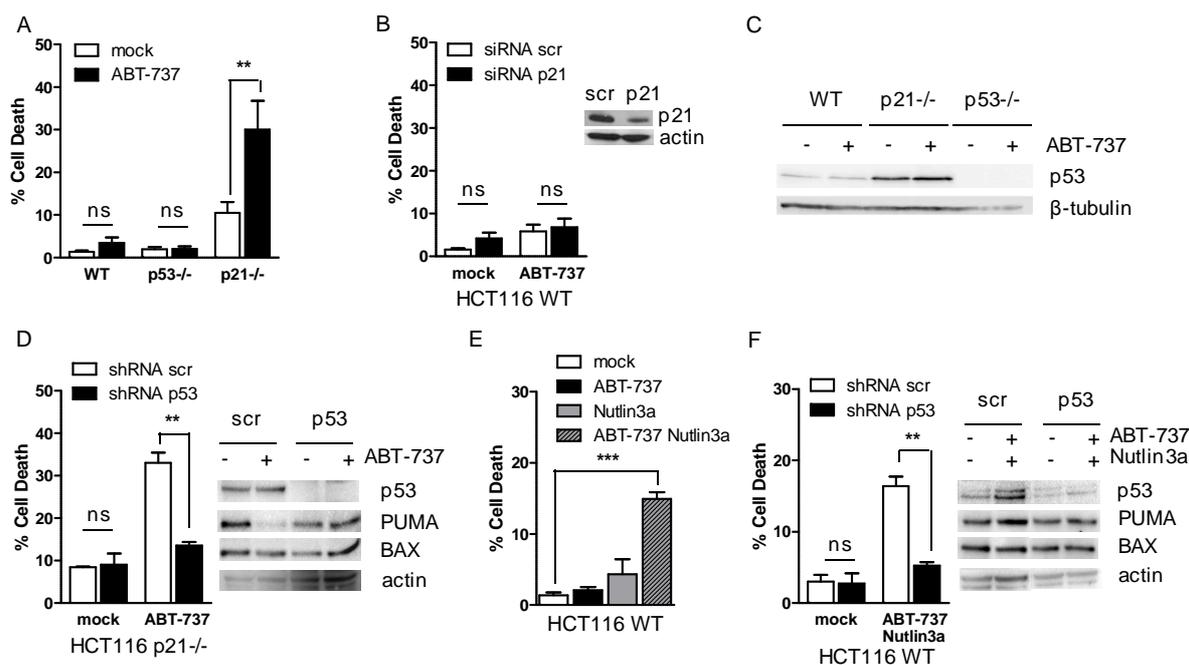
Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Cell survival in tough times: The mitochondrial recovery plan. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 4254–4255.

Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., et al. (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell Biol.* 10, 676–687.

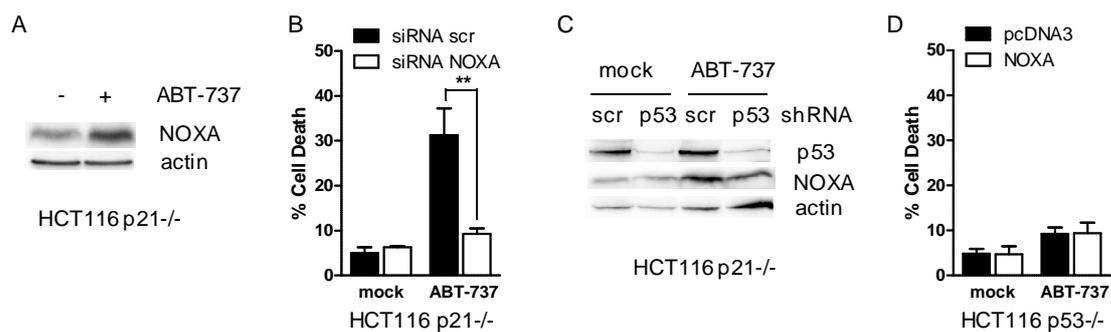
Vaseva, A.V., and Moll, U.M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 414–420.

Vaseva, A.V., Marchenko, N.D., and Moll, U.M. (2009). The transcription-independent mitochondrial p53 program is a major contributor to nutlin-induced apoptosis in tumor cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 1711–1719.

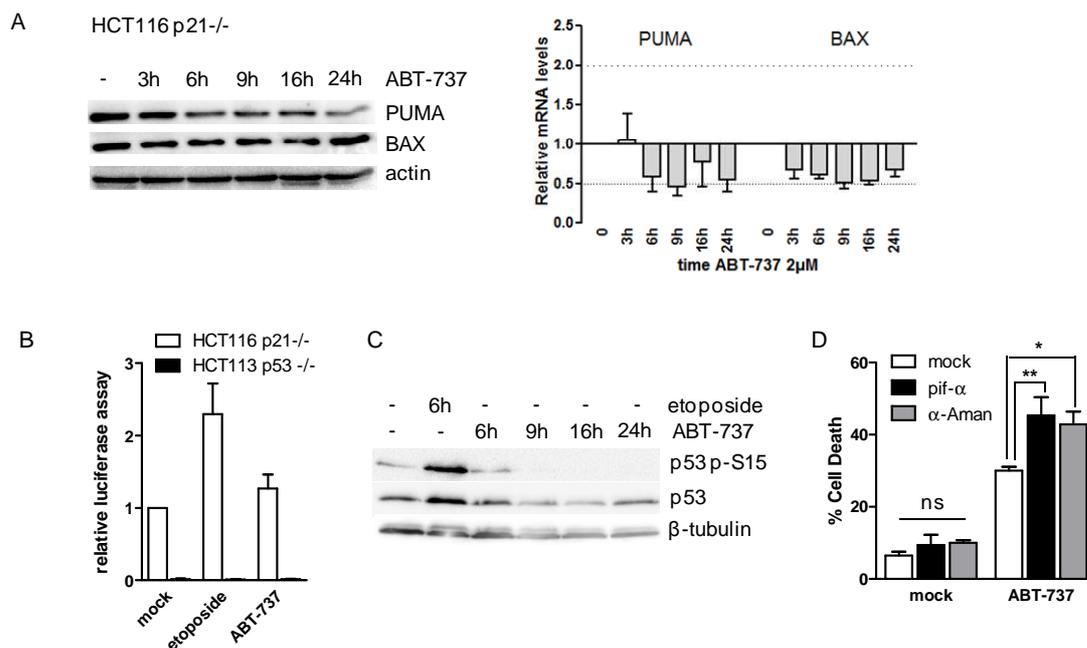
Wang, S., Yang, D., and Lippman, M.E. (2003). Targeting Bcl-2 and Bcl-XL with nonpeptidic small-molecule antagonists. *Semin. Oncol.* 30, 133–142.



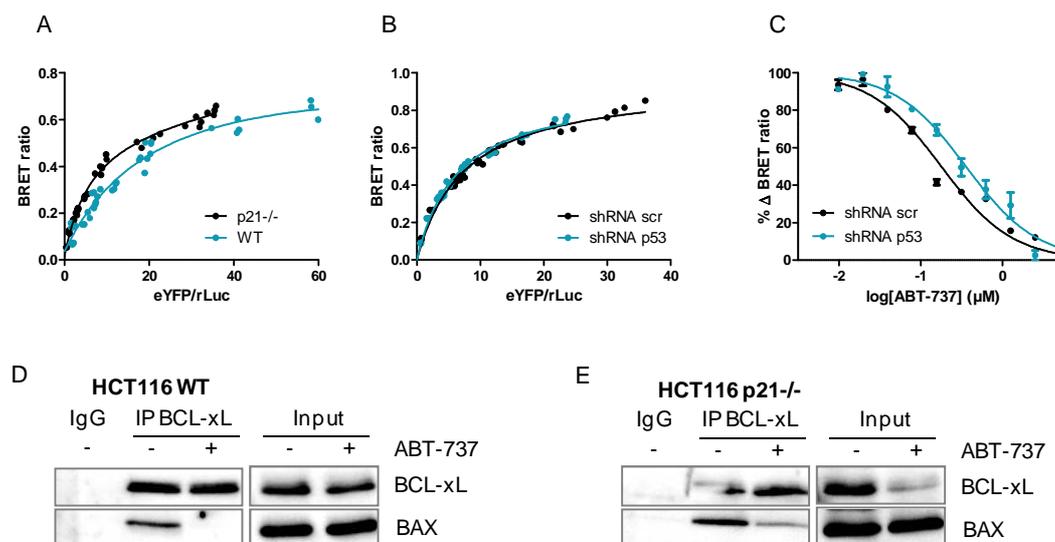
**Figure 1 : p53 is involved in ABT-737 sensitivity.** (A) HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup> or p21<sup>-/-</sup> cells were treated for 24h by 2μM ABT-737 before cell death measurement. (B) HCT116 WT cells were transfected with control (scr) or p21 siRNAs. Forty-eight hours later, cells were treated by 2μM ABT-737 for 24h before western blot and cell death measurement. (C) Cells were treated as in (A) for western-blot analysis. (D) HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells previously infected with a control (scr) or p53 shRNAs were treated by 2μM ABT-737 for 24h before cell death analysis and western-blot. (E) HCT116 WT were treated for 24h by 2μM ABT-737 and/or 10μM Nutlin3a before cell death analysis. (F) HCT116 WT cells previously infected with a control (scr) or p53 shRNAs were treated by 2μM ABT-737 and 10μM Nutlin3a for 24h before cell death analysis and western-blot. Cell death was assessed by a trypan blue staining procedure. Data presented are mean±S.E.M. of three independent experiments.



**Figure 2 : p53-independent increase of Noxa is involved in HCT116 p21<sup>-/-</sup> sensitivity to ABT-737. (A)** HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells were treated for 24h by 2 $\mu$ M ABT-737 before western-blot analysis. **(B)** HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells were transfected by control (scr) or Noxa siRNAs for forty-eight hours and treated for 24 additional hours by 2 $\mu$ M ABT-737 before cell death analysis. **(C)** HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells previously infected with a control (scr) or p53 shRNAs were treated by 2 $\mu$ M ABT-737 for 24h before western-blot analysis. **(D)** HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells were transfected with pcDNA3 or pcDNA3-Noxa vector. Twenty-four hours later, cells were treated by 2 $\mu$ M ABT-737 for 24h before cell death analysis. Cell death was assessed by a trypan blue staining procedure. Data presented are mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments.



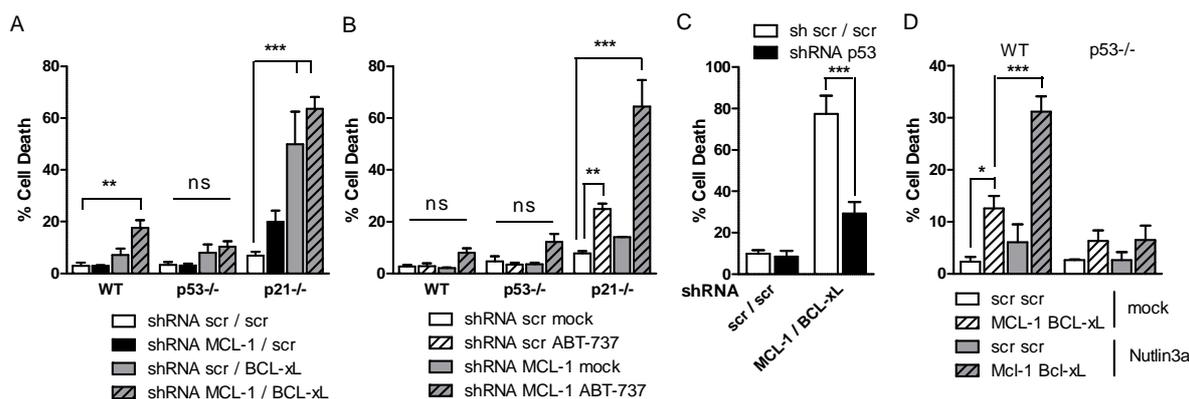
**Figure 3 : p53 transcriptional activity is dispensable to promote cell death triggered by ABT-737. (A-C)** HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells were treated for the indicated time by 2μM ABT-737 or 20μM etoposide before qPCR and western-blot analysis. **(B)** HCT116 p21<sup>-/-</sup> and p53<sup>-/-</sup> transfected with TA-luciferase control vector or p53-reporter luciferase vector, in parallel of a pCMV-βgalactosidase vector as transfection control. Twenty-four hours later, cells were treated 6h by 2μM ABT-737 or 50μM etoposide, before lysis for luciferase assay. **(D)** HCT116 p21<sup>-/-</sup> were pretreated 24h by 40μM pifithrine-α or 10μM α-Amanitine, before treatment for 24h by 2μM ABT-737 and cell death analysis. Cell death was assessed by a trypan blue staining procedure. Data presented are mean±S.E.M. of three independent experiments



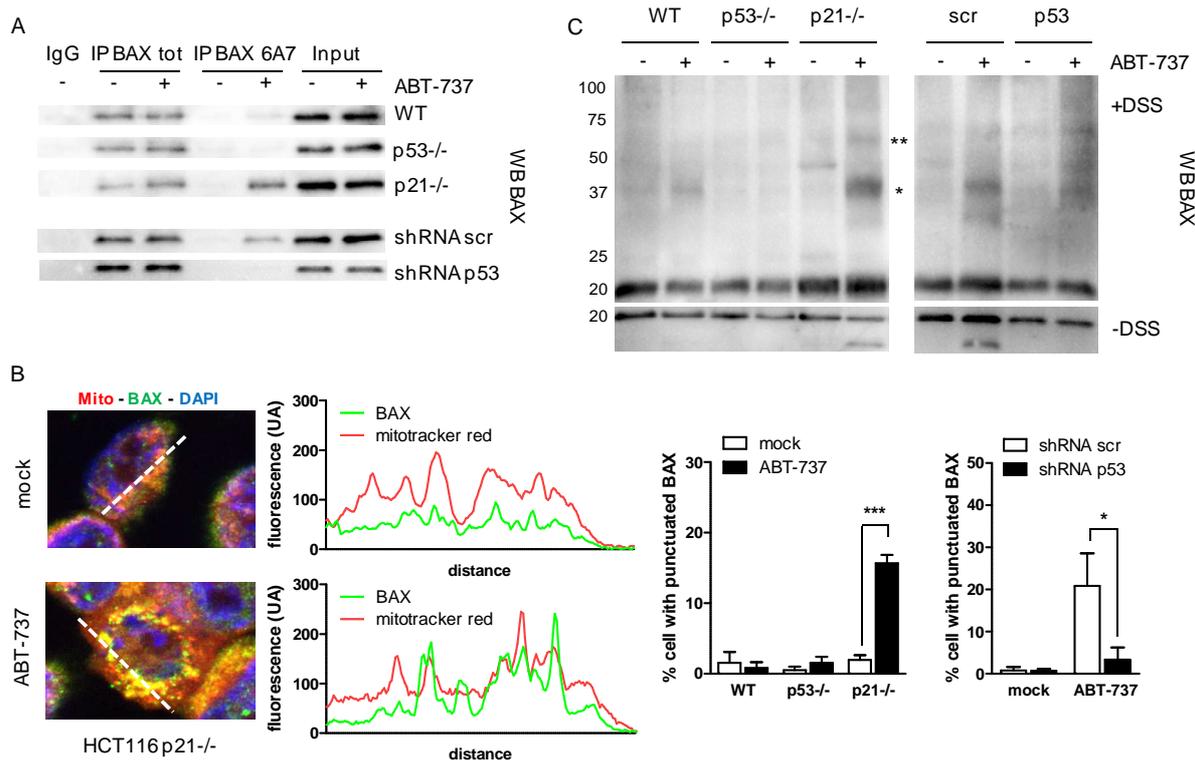
**Figure 4 : p53 does not modulate BCL-xL Bax binding activity.** Donor saturation assay analysis: saturation curves were performed on HCT116 WT (blue) and HCT116 p21<sup>-/-</sup> (black) cells (A), or HCT116 p21<sup>-/-</sup> previously infected with control (black) or p53 shRNAs (B), using increasing amount of vectors encoding YFP-BCL-xL in the presence of a fixed amount of the vector-encoding Rluc-BAX. BRET ratios (BRET Unit) are 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. Dose-response effect of ABT-737 on disruption of BCL-xL/Rluc-BAX complexes. (C) HCT116 p21<sup>-/-</sup> 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 dose of ABT-737 (0,1 to 10 μM). %ΔBRET is plotted as a function of the semi-logarithmic ABT-737 concentrations. The data were fitted using a nonlinear regression, which provided the EC50, the concentration of ABT-737 inhibitor where the BRET signal for a fixed ratio response is reduced by half, shown in supplementary table 1. Data shown represent results from one of three separate BRET titration experiments (performed in duplicate) that produced quantitatively similar results. (D-E) HCT116 WT or HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells were treated for 16h by 2μM ABT-737, before immunoprecipitation with a control or an anti-BCL-xL antibody and western-blot analysis.

	BRET50	EC50
WT	14,6 ±2,2	315±1nM
p21 <sup>-/-</sup>	7,9 ±0,4	156±30nM
p21 <sup>-/-</sup> shRNA scr	8,0 ±0,4	205±163nM
p21 <sup>-/-</sup> shRNA p53	6,2 ±0,3	350±205nM

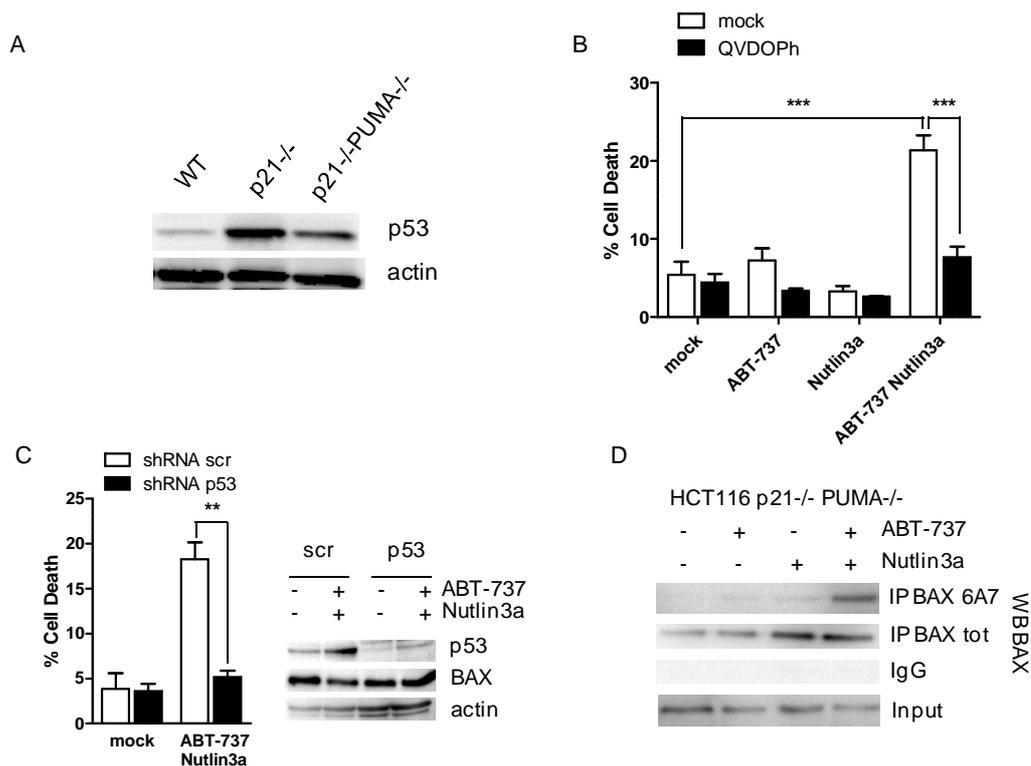
**Table 1 : p53 does not modulate BCL-xL Bax binding activity. Donor saturation assay analysis:** saturation curves were performed on indicated cells using increasing amount of vectors encoding YFP-BCL-xL in the presence of a fixed amount of the vector-encoding Rluc-BAX. BRET ratios (BRET Unit) are measured 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. BRET50 for YFP-BCL-xL/Rluc-BAX was calculated from the saturation curves. Data shown represent results from one of three separate BRET titration experiments (performed in duplicate) that produced quantitatively similar results. **Dose-response effect of ABT-737 on disruption of Bcl-xL/Rluc-Bax complexes** Indicated cells 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 dose of ABT-737 (0,1 to 10 μM). %ΔBRET is plotted as a function of the semi-logarithmic ABT-737 concentrations. The data were fitted using a nonlinear regression, which provided the EC50, the concentration of ABT-737 inhibitor where the BRET signal for a fixed ratio response is reduced by half. Data shown represent results from two (WT vs p21<sup>-/-</sup>) or three (shRNA scr vs p53) separate BRET titration experiments (performed in duplicate).



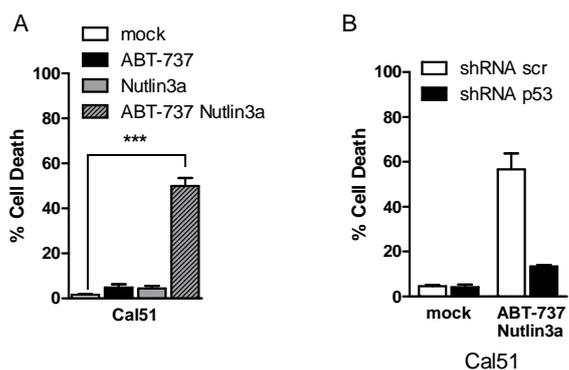
**Figure 5 : p53 contributes to efficient cell death induced by silencing of the two anti-apoptotic proteins, Mcl-1 and Bcl-xL.** (A) HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup> or p21<sup>-/-</sup> cells were infected with control (scr) or MCL-1 shRNAs. Six hours later, cells were infected with control (scr) or BCL-xL shRNAs. Twenty-four hours later, cells were rinsed, and cell death was assessed after forty-eight additional hours. (B) HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup> or p21<sup>-/-</sup> cells were infected with control (scr) or MCL-1 shRNAs. Cells were rinsed after 24h, and treated 16h by 2 $\mu$ M ABT-737 before cell death analysis. (C) HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells previously infected with control or p53 shRNAs were infected with control (scr) or MCL-1 shRNAs. Six hours later, cells were infected with control (scr) or BCL-xL shRNAs. Twenty-four hours later, cells were rinsed, and cell death was assessed after forty-eight additional hours. (D) HCT116 WT or p53<sup>-/-</sup> cells were infected with control (scr) or MCL-1 shRNAs. Six hours later, cells were infected with control (scr) or BCL-xL shRNAs. Twenty-four hours later, cells were rinsed and treated by 10 $\mu$ M Nutlin3a for 48h before cell death analysis. Cell death was assessed by a trypan blue staining procedure. Data presented are mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments.



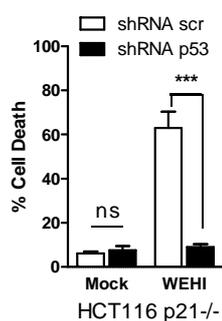
**Figure 6 : p53 favors Bax activation upon ABT-737 treatment. (A)** HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup>, p21<sup>-/-</sup> or p21<sup>-/-</sup> previously infected with control (scr) or p53 shRNAs were treated for 16h by 2 $\mu$ M ABT-737, before immunoprecipitation using an antibody against Bax, or a 6A7-specific-Bax antibody. **(B)** HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup>, p21<sup>-/-</sup> or p21<sup>-/-</sup> previously infected with control (scr) or p53 shRNAs were treated for 16h by 2 $\mu$ M ABT-737. 100 $\mu$ g of proteins were crosslinked by DSS before western-blot analysis. (\*) size in agreement with BAX dimer (\*\*) size in agreement with BAX tetramer **(C)** HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup>, p21<sup>-/-</sup> or p21<sup>-/-</sup> previously infected with control (scr) or p53 shRNAs were treated for 20h by 2 $\mu$ M ABT-737. Cells were stained using mitotracker red, and a Bax-antibody. At least 50 cells were observed per treatment, cells with punctuated Bax staining were counted. Data presented are mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments.



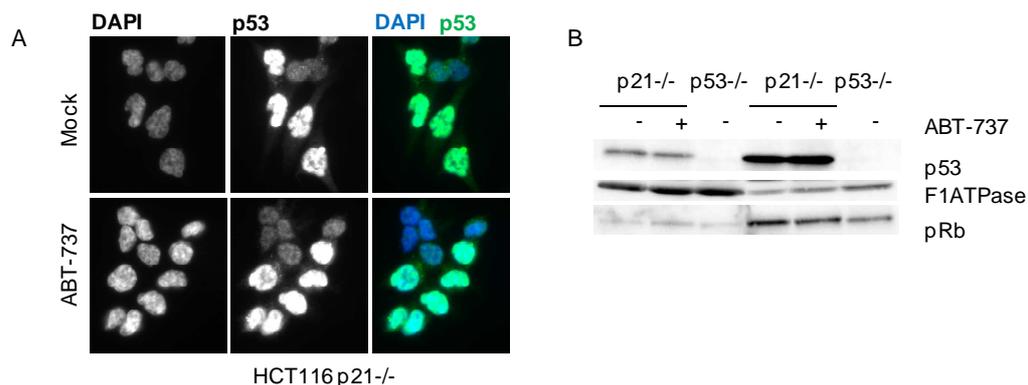
**Figure 7 : p53 favors Bax activation independently from the BH3-only PUMA. (A)** western blot analysis of p53 level in HCT116 WT, p21<sup>-/-</sup> and p21<sup>-/-</sup> Puma<sup>-/-</sup> cells. **(B)** HCT116 p21<sup>-/-</sup> PUMA<sup>-/-</sup> cells were treated for 24h by 2μM ABT-737, 10μM Nutlin3a and/or 10μM of the pan caspase inhibitor QVD-Oph, before cell death analysis. **(C)** HCT116 p21<sup>-/-</sup> PUMA<sup>-/-</sup> cells previously infected with control (scr) or p53 shRNAs were treated for 24h by 2μM ABT-737 and 10μM Nutlin3a before cell death analysis and western-blot. **(D)** HCT116 p21<sup>-/-</sup> PUMA<sup>-/-</sup> were treated for 20h by 2μM ABT-737 and/or 10μM Nutlin3a, before immunoprecipitation using an antibody against Bax, or a 6A7-specific-Bax antibody.



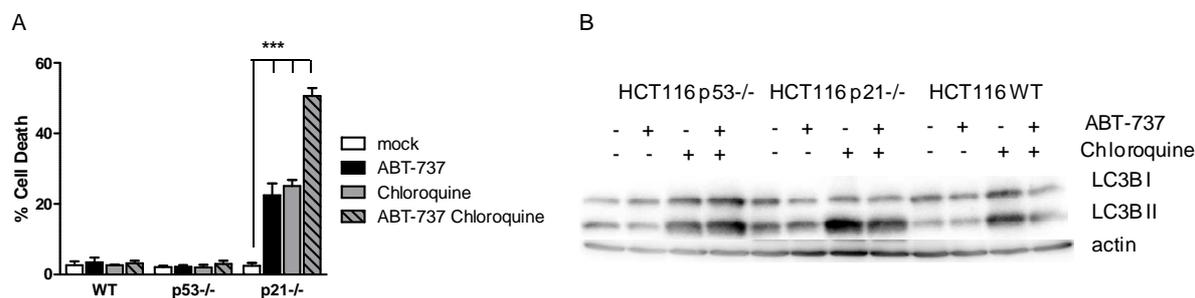
**Figure S1 : p53 is involved in ABT-737 sensitivity.** (A) Cal51 cells were treated for 24h by 2 $\mu$ M ABT-737 and/or 10 $\mu$ M Nutlin3a before cell death analysis. (B) Cal51 cells previously infected by control (scr) or p53 shRNAs were treated for 24h by 2 $\mu$ M ABT-737 and 10 $\mu$ M Nutlin3a before cell death analysis. Cell death was assessed by a trypan blue staining procedure. Data presented are mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments.



**Figure S2 : p53 is involved in cell death triggered by BCL-xL inhibition by WEHI-539.** HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells previously infected with control (scr) or p53 shRNAs were treated for 24h using 2 $\mu$ M WEHI-539. Cell death was assessed by a trypan blue staining procedure. Data presented are mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments.



**Figure S3 : p53 is located in cytoplasmic and mitochondrial compartment of HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells. (A)** HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells were treated for 16h by 2 $\mu$ M ABT-737, before staining using anti-p53 antibody. **(B)** HCT116 p21<sup>-/-</sup> or p53<sup>-/-</sup> cells were treated for 16h by 2 $\mu$ M ABT-737 before mitochondrial isolation and western-blot analysis.



**Figure S4 : p53 does not favor cell death upon ABT-737 treatment by inhibiting autophagy.** HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup>, p21<sup>-/-</sup> cells **(A)**, or HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells previously infected with control (scr) or p53 shRNAs **(B)** were treated for 24h by 2 $\mu$ M ABT-737 and/or 50 $\mu$ M Chloroquine. Cell death was assessed by a trypan blue staining procedure. Data presented are mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments. **(C)** HCT116 WT, p53<sup>-/-</sup>, p21<sup>-/-</sup> cells were treated for 24h by 2 $\mu$ M ABT-737 and/or 50 $\mu$ M Chloroquine before western-blot analysis.

La réponse des cellules cancéreuses aux différentes thérapies repose particulièrement sur l'équilibre entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Le niveau d'expression de ces protéines détermine en partie le *priming* de la cellule et sa susceptibilité à déclencher des signaux apoptotiques en réponse à des traitements (Placzek *et al.*, 2010; Sarosiek *et al.*, 2013). La surexpression fréquente des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans les cellules tumorales participe à leur survie aberrante et à leur résistance aux chimiothérapies classiques. Le développement d'inhibiteurs spécifiques de ces protéines mimant le domaine BH3 de leurs partenaires permet de contrecarrer cette résistance en modulant le réseau d'interactions de la famille Bcl-2 (Warr & Shore, 2008). Les BH3-mimétiques développés peuvent ainsi initier la mort des cellules tumorales (Oltersdorf *et al.*, 2005; Ugarenko *et al.*, 2010). Ces molécules entraînent une réponse clinique encourageante, en combinaison avec des thérapies classiques ou en agents simples (Juin *et al.*, 2013). Cependant, il existe de nombreux contextes où de tels traitements n'apparaissent pas suffisants, ou entraînent des effets secondaires importants comme une thrombopénie massive. Il est dans ce contexte nécessaire de comprendre les conditions permettant ou non la réponse aux BH3-mimétiques. Les principales voies de suppression tumorale, telle que la voie pRb/E2F1 ou la voie p53, sont elles-mêmes impliquées dans le déclenchement de l'apoptose, en modulant transcriptionnellement l'expression de gènes apoptotiques ou en modifiant les réseaux d'interactions entre les membres de la famille Bcl-2. Ces voies sont fréquemment altérées dans les tumeurs, participant à la résistance aux thérapies classiques. Leur réactivation pourrait constituer une stratégie prometteuse pour tuer les cellules cancéreuses (Khoo *et al.*, 2014; Wu & Yu, 2009; Yu *et al.*, 2014) directement mais également pour l'utilisation de molécules dont l'efficacité thérapeutique ne dépend pas *a priori* du bon fonctionnement de ces voies. Mon travail de thèse montre ainsi que les voies pRb/E2F1 et p53 participent à la pleine efficacité des BH3 mimétiques qui ciblent directement la voie mitochondriale de l'apoptose. Ceci implique que ces molécules ne court-circuitent pas pleinement les défauts fonctionnels en ces voies qu'abritent certaines cellules tumorales, et met en évidence des relations complexes de régulation mutuelle entre ces voies de suppression tumorale et la famille Bcl-2 (Braun *et al.*, 2013).

---

## A. Implication de la voie pRb/E2F1 en réponse à l'ABT-737

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que l'inhibition de Bcl-2 et Bcl-xL par l'ABT-737 peut entraîner une augmentation transcriptionnelle du BH3-seul Noxa, inhibant Mcl-1 et permettant l'amplification à long terme de la mort cellulaire. Cette augmentation met en jeu le facteur de transcription E2F1 et de façon plus surprenante son régulateur pRb. Nous avons décrit un mécanisme inédit par lequel l'activation sub-létale des caspases entraîne le clivage de pRb, dont le fragment p68<sup>Rb</sup> s'associe avec E2F1 pour transactiver le gène codant Noxa.

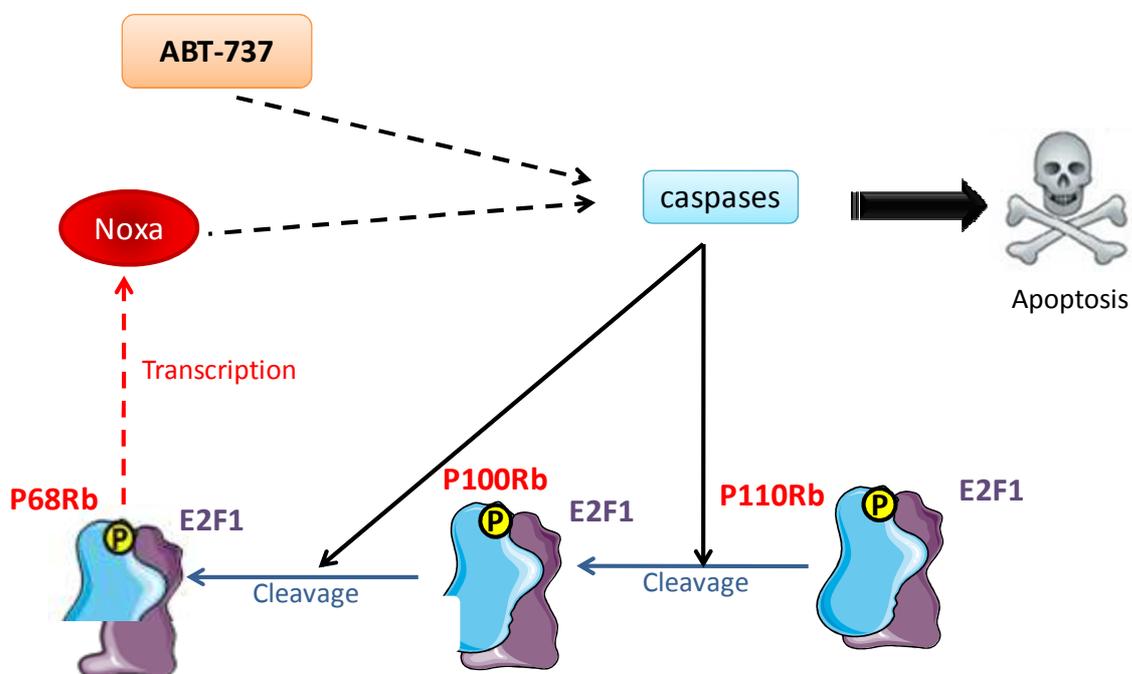
Dans les cellules de la lignée de glioblastome U251, l'ABT-737 entraîne une augmentation de l'expression de Noxa, en accord avec plusieurs études décrivant l'augmentation du BH3-seul par les BH3-mimétiques (Albershardt *et al.*, 2011; Peter *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2011). Les cellules de la lignée U251 étant mutées pour p53, nous avons montré l'implication d'E2F1 dans cette induction. Un rôle pro-apoptotique d'E2F1 a déjà été décrit en réponse à des stress oncogéniques ou à des dommages de l'ADN, notamment par la régulation de gène codant les protéines BH3-seuls (Hershko & Ginsberg, 2004; Iaquinta & Lees, 2007; Polager & Ginsberg, 2009).

De façon classique, l'activité transcriptionnelle d'E2F1 requiert sa libération de pRb, son régulateur négatif (Dick, 2007). Cette libération est régulée en particulier par la phosphorylation de l'extrémité C-terminale de pRb (Harbour *et al.*, 1999). Dans notre étude, la protéine pRb reste hyper-phosphorylée lors du traitement à l'ABT-737. Nous avons plus particulièrement analysé les phosphorylations des résidus S-807 et S-811 sous ABT-737 et celles-ci ne sont pas modifiées. Par ailleurs, en accord avec différentes publications, nous avons observé que la forme phosphorylée de pRb est en réalité toujours capable d'interagir avec E2F1 (Cecchini & Dick, 2011; Ianari *et al.*, 2009). L'hyperphosphorylation de pRb lors de dommages à l'ADN peut ainsi participer à la formation de complexes actifs E2F1/pRb/P-CAF, favorisant la transcription des gènes de l'apoptose tel que la caspase-7 ou p73, et non de ceux impliqués dans le cycle cellulaire. La phosphorylation de pRb pourrait donc participer à l'induction de transcription de Noxa par E2F1, sans entraîner la dissociation de pRb/E2F1. Cette activité pro-apoptotique du complexe pRb/E2F1 serait particulièrement liée au deuxième site de fixation d'E2F1 sur pRb, indépendamment de la poche de liaisons aux E2Fs (Dick & Dyson, 2003).

Nous avons par ailleurs observé un clivage caspase dépendant de pRb en deux fragments p48<sup>Rb</sup> et p68<sup>Rb</sup> lors du traitement à l'ABT-737. Le clivage de pRb par les caspases est séquentiel : les caspases clivent le site DEAD en C-terminal, aboutissant à la forme p100<sup>Rb</sup>, puis le site DSID, en deux fragments p48<sup>Rb</sup> et p68<sup>Rb</sup> (Fattman *et al.*, 2001). Bien que le fragment p68<sup>Rb</sup> conserve les deux sites de liaisons à E2F1, plusieurs équipes ont fait l'hypothèse que le clivage de pRb entrainerait la libération d'E2F1, pouvant alors activer la transcription de gènes cibles et amplifier la mort cellulaire (Boutillier *et al.*, 2000; Fattman *et al.*, 1997; Katsuda *et al.*, 2002). Contrairement à cette hypothèse, nous avons pour la première fois démontré une association entre p68<sup>Rb</sup> et E2F1 lors du traitement des U251 à l'ABT-737. L'activation des caspases étant essentielle pour l'augmentation de niveau de Noxa, nous avons alors proposé que le fragment p68<sup>Rb</sup> ait un rôle actif sur cette induction transcriptionnelle par E2F1. En accord avec cette hypothèse, nous avons montré la présence de la forme tronquée p68<sup>Rb</sup> au niveau de la chromatine lors du traitement à l'ABT-737 et que l'expression de cette forme tronquée est capable d'induire l'expression de Noxa dans la lignée BT-549 déficiente pour pRb. La protéine est retrouvée sur le promoteur de Noxa lors d'un traitement des U251 à l'ABT-737 par des expériences de CHIP. Il est en revanche plus difficile de discriminer le rôle de la forme tronquée p68<sup>Rb</sup> de sa forme entière, les anticorps disponibles reconnaissant les deux formes. Des expériences de gel retard permettraient de déterminer formellement quelle forme est complexée à E2F1 sur le promoteur de Noxa. Une autre approche consisterait à exprimer les formes tronquées dans un fond déficient pour pRb et de réaliser des expériences de CHIP. Par ailleurs, la stabilisation de pRb par la Nutlin3a, inhibiteur de l'ubiquitine ligase MDM2, est suffisante pour sensibiliser à l'ABT-737 les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-468 mutées pour p53 et ceci de façon dépendante de pRb, validant le rôle de ce suppresseur de tumeur. Ce résultat soulève de nouvelles perspectives thérapeutiques : la réactivation de la voie pRb/E2F1, fréquemment inhibée dans les cancers, pourrait ainsi sensibiliser les tumeurs aux BH3-mimétiques.

L'ensemble de nos données permet de dessiner une hypothèse inédite, par laquelle la voie pRb/E2F1 permet l'amplification de l'apoptose induite par l'ABT-737 (figure 50). L'inhibition de Bcl-xL et Bcl-2 par l'ABT-737 conduit ainsi à une activation sub-létale des caspases qui clivent pRb en deux fragments p48<sup>Rb</sup> et p68<sup>Rb</sup>. Le fragment p68<sup>Rb</sup> reste fixé à E2F1 et favorise l'induction du BH3-seul Noxa. Il est décrit que la

perméabilisation mitochondriale lors d'un signal apoptotique peut être limitée à un petit nombre de mitochondries insuffisant pour tuer les cellules (Tait *et al.*, 2010). Cette absence de perméabilisation d'une population de mitochondries serait liée à une concentration importante de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 à leur surface, empêchant l'activation et l'oligomérisation de Bax et Bak. Dans notre étude, l'induction de Noxa entraîne l'inhibition de Mcl-1, principal frein de la sensibilité à l'ABT-737. L'induction du BH3-seul permettrait une seconde vague de perméabilisation des mitochondries présentant un fort taux de Mcl-1, restées intactes suite au traitement à l'ABT-737. Ce système d'amplification augmente l'activation des caspases conduisant à la mort cellulaire. Les mécanismes impliqués dans l'hétérogénéité des populations mitochondriales, notamment en terme de concentrations de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 décrites précédemment (Tait *et al.*, 2010), serait particulièrement intéressants à explorer. Par quels processus ces populations de mitochondries présentant des différences de niveaux de protéines de la famille Bcl-2 se forment-elles ?



**Figure 50 : Boucle d'amplification de la réponse apoptotique par pRb/E2F1, permettant une sensibilisation tardive à l'ABT-737.**

---

Ces mécanismes impliquent-ils des partenaires protéiques décrits comme interagissant de la famille Bcl-2 à la mitochondrie (VDAC, complexe TOM...) ? Comment les machineries de fissions et fusions modulent-elles l'existence de ces populations mitochondriales différentes en régulant de façon dynamique le réseau de mitochondries? Les mitochondries diffèrent-elles par leurs compositions lipidiques, ce qui pourrait favoriser les différences au niveau protéique ?

L'implication de la voie pRb/E2F1 a été retrouvée dans plusieurs lignées mutées pour p53. Cependant, lorsque p53 est présent, il semble que la voie d'amplification par pRb/E2F1 ne soit pas décisive pour la sensibilisation au BH3-mimétique. En effet, dans les cellules contenant du p53 sauvage, la sensibilité à l'ABT-737 n'est pas altérée par l'extinction d'E2F1 ou pRb. La voie pRb/E2F1 pourrait être une voie « de secours » lorsque p53 est absent, qui permet la transcription de Noxa, mais également de p73, homologue de p53 partageant notamment des fonctions redondantes dans l'apoptose (résultats non présentés). Lors de la seconde partie de ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes mis en jeu dans la sensibilité à l'ABT-737, dans un contexte cellulaire p53 sauvage.

## **B. Implication de p53 dans la réponse à l'ABT-737**

Nos résultats ont permis de mettre en évidence un rôle majeur de la protéine p53 sauvage dans la réponse à l'inhibition des anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ainsi, alors que les lignées isogéniques du cancer colorectal HCT116 parentale et p53<sup>-/-</sup> sont résistantes à l'ABT-737, le traitement déclenche l'apoptose des cellules de la lignée HCT116 p21<sup>-/-</sup> qui présentent une surexpression de p53. Cette lignée p21<sup>-/-</sup> est décrite comme hypersensible à divers stimuli apoptotiques, que ce soit du fait de l'absence de p21 dans le cas de carence en nutriment (Braun *et al.*, 2011) ou de l'expression de p53 lors de traitements à différents agents anticancéreux (Ferrandiz *et al.*, 2009). Dans le cadre du traitement à l'ABT-737, l'extinction de p53 abroge la mortalité des cellules p21<sup>-/-</sup>, suggérant un rôle du suppresseur de tumeur. L'extinction de p21 dans la lignée parentale n'a pas d'effet sur la sensibilité au BH3-mimétique, contrairement à ce que nous avons observé dans le cadre d'une carence nutritive (Braun *et al.*, 2011). Par

---

ailleurs, la stabilisation de p53 est suffisante pour sensibiliser à l'ABT-737 dans au moins deux lignées, la lignée de cancer colorectal HCT116 parentale et la lignée de cancer du sein Cal51.

Afin de déterminer les mécanismes de l'implication de p53 dans la sensibilité à l'ABT-737, nous avons exploré d'une part l'effet transcriptionnel du suppresseur de tumeur, et d'autre part ses activités non transcriptionnelles. En effet si p53 est principalement décrit comme un facteur de transcription capable d'induire notamment l'expression de membres de la famille Bcl-2 (Schuler & Green, 2001), il peut également moduler le réseau d'interactions de ces protéines en inhibant directement les anti-apoptotiques (Hagn *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2010; Mihara *et al.*, 2003) ou en activant les pro-apoptotiques effecteurs (Chipuk *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2004).

### **1) Fonction transcriptionnelle de p53 lors de l'inhibition de Bcl-xL**

Il a été publié par le laboratoire que l'ABT-737 induit la libération de Bax de Bcl-xL dans les HCT116 p21<sup>-/-</sup>, l'activation de Bax par Puma conduisant à la mort cellulaire (Gallenne *et al.*, 2009). Or p53 module l'expression des protéines de la famille Bcl-2 et notamment Bax et Puma (Schuler & Green, 2001). Nous n'observons pas de variation de l'expression de Bax et son activateur Puma lors d'un traitement à l'ABT-737 ou de l'extinction de p53 dans les HCT116 p21<sup>-/-</sup>. Ces observations suggèrent que p53 ne joue pas son rôle dans la sensibilité à l'ABT-737 en soutenant l'expression de Puma ou Bax, lors du traitement comme de façon basale. Plus généralement, la fonction transcriptionnelle de p53 n'est pas augmentée lors d'un traitement à l'ABT-737. A des doses plus fortes, l'ABT-737 induit une activation de p53 dans plusieurs lignées humaines, par l'activation de la voie ATM (ataxia telangiectasia mutated) via une activité génotoxique du BH3-mimétique suite à l'activation de caspases (Song *et al.*, 2011). Il serait donc intéressant d'analyser la présence de dommages à l'ADN et l'activation de la voie ATM dans nos conditions pour comprendre à quel niveau cette voie d'activation de p53 est bloquée.

Nous avons montré que l'inhibition de la fonction transcriptionnelle de p53 par un inhibiteur global ( $\alpha$ -amanitine) ou spécifique (pifithrine- $\alpha$ ) n'abroge pas l'induction de l'apoptose par l'ABT-737 dans les HCT116 p21<sup>-/-</sup>. Ces données indiquent que l'activation transcriptionnelle de p53 n'est pas requise dans la sensibilité des HCT116

---

p21-/- à l'ABT-737. Au contraire, nous avons observé une augmentation de la mortalité lors du co-traitement ABT-737 avec l'  $\alpha$ -amanitine. Ce composé inhibe la transcription mais il est également décrit comme inducteur d'une accumulation mitochondriale de p53, notamment via la phosphorylation de la serine S-46 du suppresseur de tumeur (Arima et al., 2005a). L'augmentation de la mortalité par le co-traitement ABT-737  $\alpha$ -amanitine pourrait alors être due à une fonction mitochondriale de p53. Alternativement, les effets de l'alpha-amanitine pourraient résulter de la perte d'expression d'une protéine de survie labile, comme Mcl-1.

Par ailleurs, nous avons observé que l'ABT-737 induit une augmentation de Noxa dans la lignée HCT116 p21-/. Cette augmentation est indépendante de p53 et n'est pas liée à une induction transcriptionnelle (données non présentées de qPCR), suggérant un mécanisme de stabilisation du BH3-seul sous ABT-737, qui reste à explorer. L'extinction de Noxa abroge la sensibilité à l'ABT-737, mais sa surexpression n'est pas suffisante pour sensibiliser les cellules dépourvues de p53. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de Noxa est nécessaire mais pas suffisante pour la sensibilité des HCT116 p21-/- à l'ABT-737, et que p53 n'intervient pas dans cette stabilisation. L'ensemble de ces résultats a orienté notre réflexion vers un rôle non-transcriptionnel de p53 dans la sensibilisation à l'ABT-737.

En accord avec ces résultats, nous avons confirmé la présence de p53 dans les compartiments cytoplasmiques et mitochondriaux des cellules HCT116 p21-/-, compatible avec une activité de p53 à l'extérieur du noyau. Toutefois, nous n'avons pas détecté de modification de la localisation lors du traitement à l'ABT-737, alors que l'irradiation stimule la translocation mitochondriale de p53 (Mihara *et al.*, 2003).

## 2) Interactions de p53 avec les protéines de la famille Bcl-2

Plusieurs études montrent que des modifications post-traductionnelles particulières stimuleraient les activités mitochondriales de p53 en modulant sa localisation (Mancini *et al.*, 2009; Marchenko *et al.*, 2007; Sykes *et al.*, 2006). Sykes *et al.* ont ainsi décrit l'importance de l'acétylation de p53, en particulier sur sa lysine K-120, dans sa fonction pro-apoptotique à la mitochondrie et notamment pour la libération de Bak de Mcl-1 (Sykes *et al.*, 2006). Par une mesure ELISA de l'acétylation globale de p53, nous n'avons pas observé de modification du niveau global d'acétylation de p53 lors du

traitement à l'ABT-737 dans les HCT116 p21<sup>-/-</sup> (données non présentées). Toutefois une analyse western blot plus ciblée est à envisager pour évaluer l'acétylation du résidu K-120 lors du traitement au BH3-mimétique. Mancini *et al* ont par ailleurs montré que p53 phosphorylé sur la serine S-46 est pris en charge par MDM4 qui favorise la localisation mitochondriale de p53 et son interaction avec des protéines de la famille Bcl-2 (Mancini *et al.*, 2009). Dans notre modèle, nous n'avons pas détecté de phosphorylation du résidu S-46 sur p53 par western-blot quelles que soient les conditions (données non présentées). De nouveaux anticorps devront être testés, y compris dans des conditions décrites pour stimuler la phosphorylation de cette serine, par exemple lors d'un traitement à l' $\alpha$ -amanitine (Arima *et al.*, 2005a), l'etoposide ou encore la doxorubicine (Sorrentino *et al.*, 2013). La proline-isomérase Pin1 stimule l'activité pro-apoptotique de p53 à la mitochondrie de façon dépendante de la phosphorylation de la sérine S-46 (Sorrentino *et al.*, 2013). Nous avons voulu déterminer si la surexpression de Pin1 pouvait sensibiliser les cellules HCT116 à l'ABT-737. Nous n'avons pas observé de modification de la viabilité des cellules HCT116 parentales (données non présentées), Ceci suggère que p53 ne soit pas phosphorylé sur la sérine S-46 lors du traitement au BH3 mimétique auquel cas Pin1 ne stimulerait pas l'activité mitochondriale. Il est également possible que l'activité mitochondriale de p53, stimulé par Pin1, ne soit pas impliqué dans la sensibilité à l'ABT-737. L'analyse de la localisation de p53 permettra de vérifier si la surexpression de Pin1 induit une augmentation du niveau de p53 mitochondrial, afin de conclure sur ces deux différentes hypothèses. Il est à noter que la localisation de p53 est inchangée par le traitement à l'ABT-737 dans la lignée HCT116 p21<sup>-/-</sup>. Ces observations suggèrent que le suppresseur de tumeur ne subit pas de modification post-traductionnelle conduisant à sa stabilisation mitochondriale lors d'un traitement au BH3-mimétique. Des analyses plus globales par spectrométrie de masse peuvent néanmoins être menées pour déterminer si le traitement au BH3-mimétique entraîne des modifications post-traductionnelle de p53 impliquées dans la sensibilité. Enfin, les modifications post-traductionnelles des protéines de la famille Bcl-2 sont moins décrites, mais elles participent également à la modulation de leur réseau d'interactions. Nous avons par exemple montré au laboratoire qu'une phosphorylation de la sérine S-62 sur la boucle non structurée de Bcl-xL lors d'un arrêt mitotique favorise la libération du pro-apoptotique Bax par l'ABT-737 (Bah et al., 2014). L'analyse des modifications post-traductionnelles de ces

---

protéines dans notre modèle et de l'implication de p53 sur celles-ci serait alors particulièrement intéressante, par des stratégies ciblées en western-blot ou plus globalement par spectroscopie de masse.

Par ailleurs, il a été décrit qu'une fraction de p53 acquiert une conformation particulière « *mutant-like* » dans les cellules de la lignée p21<sup>-/-</sup> (Roger *et al.*, 2010). Cette conformation particulière pourrait être liée à la sensibilité de cette lignée. Pour exclure cette hypothèse, nous pourrions utiliser des molécules permettant la réactivation de p53 en modulant sa conformation, comme PRIMA-1 (Yu *et al.*, 2014). Dès lors, nous pourrions évaluer la modulation de la sensibilité à l'ABT-737 par PRIMA-1 dans les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup>. Il faut toutefois garder à l'esprit que la stabilisation de p53 est suffisante pour sensibiliser à l'ABT-737 les lignées HCT116 et Cal51. Il faudrait vérifier l'absence de forme *mutant like* dans les cellules HCT116 et Cal51 dans nos conditions de stabilisation à la Nutlin3a. Ceci semble peu envisageable, Roger *et al.* ayant observé que l'augmentation de p53 par la bléomycine dans les HCT116 parentale n'entraîne pas d'apparition de cette forme. Ces données suggèrent que la stabilisation de p53 ne permet pas l'acquisition de la forme *mutant-like*, mais est suffisante à sensibiliser à l'ABT-737. Ainsi un rôle prépondérant de la conformation sauvage de p53 dans la sensibilisation à l'ABT-737 semble probable.

Le réseau d'interactions de la famille Bcl-2, cible directe de l'ABT-737, peut être directement modulé par p53 (Chipuk *et al.*, 2004; Hagn *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2010; Leu *et al.*, 2004; Mihara *et al.*, 2003). Nous nous sommes alors demandé dans quelle mesure p53 favorisait la sensibilité à l'ABT-737 via ses interactions avec les protéines de la famille Bcl-2. Le suppresseur de tumeur peut notamment interagir avec les membres anti-apoptotiques, facilitant la libération de leurs partenaires pro-apoptotiques (Deng *et al.*, 2006; Hagn *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2010; Petros *et al.*, 2004; Tomita *et al.*, 2006). En accord avec ces études, nos expériences de BRET en cellules vivantes indiquent que bien que l'extinction de p53 ne modifie pas la quantité de complexes entre Bcl-xL et Bax en absence de traitement, p53 favorisait significativement la dissociation de ces complexes par l'ABT-737. Cet effet reste néanmoins modeste, et en immunoprécipitation nous n'avons pas observé de différence en terme de libération de Bax de Bcl-xL par l'ABT-737 entre les cellules de la lignée HCT116 parentales et les cellules de la lignée p21<sup>-/-</sup>. Le suppresseur de tumeur ne sensibiliserait donc pas à l'ABT-737 en favorisant la

libération de Bax de Bcl-xL. Mcl-1 n'étant pas inhibé par l'ABT-737, il est le principal frein à la sensibilité au BH3-mimétique. p53 pourrait alors participer à la sensibilité en inhibant ce second anti-apoptotique majeur. L'extinction de Mcl-1 augmente la mortalité des cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> suite à un traitement à l'ABT-737. En revanche, les cellules HCT116 parentales et p53<sup>-/-</sup> ne sont pas sensibilisées à l'ABT-737 par l'extinction de Mcl-1. Ce résultat suggère que p53 ne sensibilise pas les cellules en modulant Mcl-1. De manière surprenante, l'extinction conjointe de Bcl-xL et Mcl-1 ne déclenche qu'une apoptose modérée dans les cellules HCT116 parentales, mais massive dans les cellules déficientes pour p21<sup>-/-</sup>. Cette apoptose est abrogée lorsque p53 est mis sous silence dans la lignée p21<sup>-/-</sup>. Ainsi, p53 est requis pour la mort cellulaire suite à l'extinction de Bcl-xL et Mcl-1. A l'inverse, les HCT116 WT sont sensibilisées par le traitement à la Nutlin3a à la double extinction de l'expression de Mcl-1 et Bcl-xL, contrairement aux cellules déficientes en p53<sup>-/-</sup>. La stabilisation de p53 est donc nécessaire et suffisante pour sensibiliser les cellules à l'extinction des deux principaux anti-apoptotiques. L'ensemble de ces résultats montrent que la libération des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, si elles nécessaires (Gautier *et al.*, 2011; Willis *et al.*, 2007) n'est peut être pas suffisante au déclenchement de l'apoptose et que cette apoptose requiert une influence, directe ou non, de p53 sur les protéines pro-apoptotiques libres. Par ailleurs, la stabilisation de p53 par la Nutlin3a n'est pas à elle-seule suffisante pour tuer les cellules. La mortalité des cellules par la stabilisation de p53 nécessite également l'inhibition ou la mise sous silence des homologues anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ainsi, p53 aurait un rôle dans le déclenchement de l'apoptose en aval de la libération des pro-apoptotiques par les membres anti-apoptotiques.

Il a été démontré que p53 est capable d'activer directement les pro-apoptotiques effecteurs (Chipuk *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2004). Le suppresseur de tumeur a notamment été décrit comme capable d'interagir avec Bak, favorisant son oligomérisation (Pietsch *et al.*, 2007). Ainsi, p53 peut induire l'activation conformationnelle de Bak sans dissocier les complexes Bak/Bcl-xL. La libération ultérieure de Bak déclenche alors son oligomérisation spontanée et la mort cellulaire (Nieminen *et al.*, 2013). Le système décrit nécessite à la fois la présence de p53 et la dissociation des complexes des protéines de la famille Bcl-2 pour le déclenchement de la mort, en accord avec nos propres résultats. La libération des partenaires pro-apoptotiques est observée dans l'ensemble des lignées HCT116 lors du traitement à l'ABT-737. Ainsi la seule libération

---

de Bax de Bcl-xL n'est pas suffisante au déclenchement de l'apoptose. Nos données indiquent que la présence de p53 est requise pour les différentes étapes de l'activation de Bax suite à sa libération (dépliage, localisation mitochondriale, oligomérisation).

L'activation de Bax favorisée par p53 est observée même en absence de son activateur privilégié dans ce modèle, Puma (Gallenne *et al.*, 2009). Les cellules HCT116 p21<sup>-/-</sup> Puma<sup>-/-</sup> qui présentent un taux basal de p53 proche des cellules p21<sup>-/-</sup>, sont résistantes à l'ABT-737. Cependant, la stabilisation supplémentaire du suppresseur de tumeur par la Nutlin3a permet de déclencher l'activation de Bax sous ABT-737 dans les p21<sup>-/-</sup> Puma<sup>-/-</sup> et d'induire l'apoptose. Ceci confirme le rôle clef de Puma comme activateur de Bax, mais indique qu'un excès de p53 permet de déclencher l'activation en absence de Puma. Réciproquement, la présence de Puma dans les cellules HCT116 parentale et déficiente pour p53 n'est pas suffisante pour déclencher efficacement l'activation de Bax. Les deux protéines Puma et p53 participeraient ainsi conjointement à l'activation de Bax pour entraîner la mort cellulaire. L'activation de l'effecteur est possible en présence de p53 seul indiquant qu'il ne requière pas la présence de Puma pour activer Bax. Cette activation nécessite cependant un large excès du suppresseur de tumeur. Il est envisageable que Puma et p53 participent tous deux en parallèle à l'activation de Bax, et que la présence des deux activateurs est nécessaire pour atteindre un seuil de Bax activé suffisant pour le déclenchement de l'apoptose. L'activation de Bax se fait via deux interactions successives avec les BH3-seuls, au niveau des hélices  $-\alpha 1$  et  $-\alpha 6$ , puis au niveau de la poche hydrophobe (Gavathiotis *et al.*, 2008). Le suppresseur de tumeur pourrait participer à une de ces étapes, notamment en interagissant via son DBD sur l'hélice  $\alpha 1$  et la boucle entre les hélices  $\alpha 5$ - $\alpha 6$ , sur le modèle de son interaction avec Bcl-xL (Petros *et al.*, 2004), ou favoriser l'ensemble du processus.

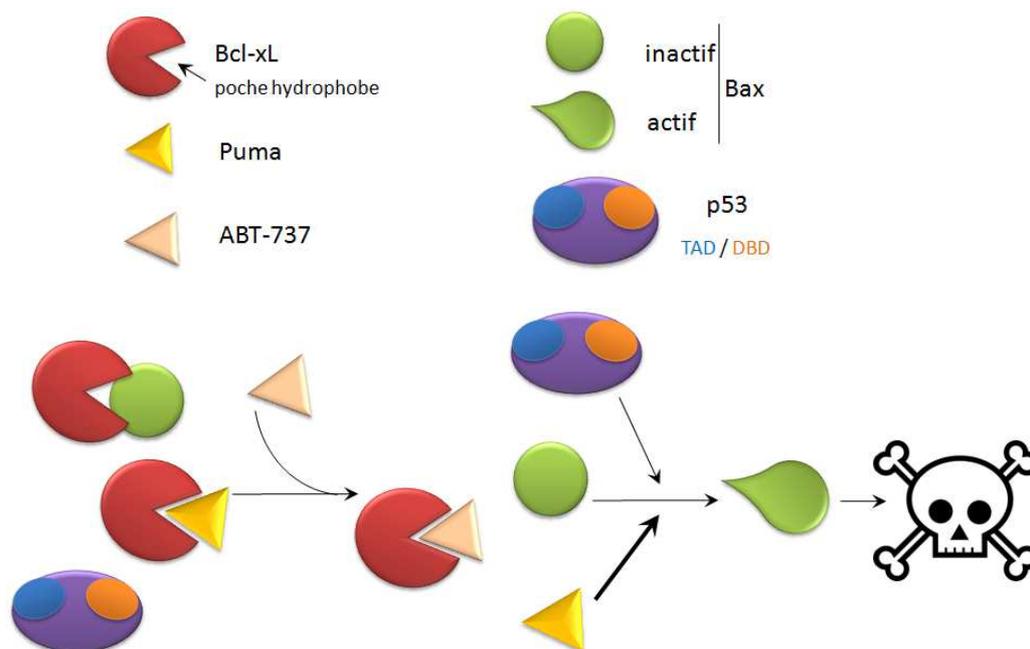
L'activation de Bax par p53 a été décrite dans un modèle acellulaire, par des expériences en liposomes (Chipuk *et al.*, 2004). Nos premières données suggèrent qu'une interaction physique est possible entre p53 et Bax dans les HCT116 p21<sup>-/-</sup> mais nécessite des contrôles supplémentaires pour réellement valider l'existence de cette interaction et son implication directe dans les phénomènes observés. Des interactions de p53 avec les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ainsi qu'avec le second effecteur Bak ont déjà été caractérisées. Elles mettent particulièrement en jeu le DBD de p53, qui interagirait avec une surface acide opposée à la poche hydrophobe. Compte

tenu de la forte homologie de Bax avec les autres protéines à multi-domaines de la famille Bcl-2, il est envisageable qu'une interaction Bax/p53 soit possible avec une interface similaire. Cette interaction n'a à ce jour jamais pu être formellement identifiée, ce qui nous a conduits à nous interroger sur la possibilité d'une modulation indirecte de l'activation de Bax par p53, permettant la sensibilisation des cellules à l'ABT-737.

Il serait également intéressant de déterminer les domaines de p53 impliqués dans sa fonction pro-apoptotique favorisant l'activation de Bax dans notre modèle. Lors de nos tentatives d'études structure/fonction par la complémentation en cellules HCT116 p53<sup>-/-</sup> par des mutants de p53, nous avons été confrontés à plusieurs problèmes (données non présentées). Le taux de transfection des cellules est limité à ~30% et la transfection elle-même fragilise les cellules, rendant les observations difficiles. Par ailleurs, la surexpression de p53 augmente la mortalité des cellules même en absence de traitement, augmentant encore le bruit de fond et gênant les analyses. Cette mortalité pourrait être liée à un effet transcriptionnel. Nous avons par ailleurs noté que l'expression de mutants au niveau du DBD (R175H, R273H) ne permet pas la sensibilisation à l'ABT-737. Le DBD étant impliqué à la fois dans la fonction transcriptionnelle et dans les interactions de p53 avec les protéines de la famille Bcl-2, il est difficile de discriminer laquelle de ces fonctions est impliquée par ce système. Pour s'astreindre de l'effet transcriptionnel de p53 et des éventuels effets indirects, nous avons réalisé des expériences en modèle levure. L'utilisation de ce modèle avait permis de montrer que l'expression de Bax ne modifiait pas la croissance des levures, son expression conjointe à l'expression de Puma entraînait un relargage de cytochrome C et une mortalité des levures, reversés par l'expression de Bcl-xL (Gallenne *et al.*, 2009). Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet de p53 sur l'activation de Bax, seul ou en présence de Puma dans ce modèle de levure. Cette absence d'effet peut suggérer un effet indirect de p53 dans la réponse aux BH3 mimétiques, ou la nécessité d'une modification post-transcriptionnelle de p53 pour son rôle sur Bax, uniquement possible en lignée mammifère. Cette dernière hypothèse est en accord avec l'utilisation de p53 immunoprécipité de MCF7 préalablement irradiées p53<sup>UVIP</sup> dans les expériences décrivant l'activation de Bax par p53 en liposomes et mitochondries isolées (Chipuk *et al.*, 2004).

En lien avec l'étude des domaines de p53 impliqués dans la sensibilité à l'ABT-737, nous pourrions évaluer de quelle façon les différentes isoformes de p53 peuvent moduler la réponse au BH3-mimétique. Il faut noter que la ligné HCT116 p53<sup>-/-</sup> comporte en réalité certains isoformes de p53 ( $\Delta 40p53$  et  $\Delta 133p53$ ; Aoubala *et al.*, 2011). La mise sous silence de ces isoformes n'a pas permis de sensibiliser les HCT116 à l'ABT-737, suggérant qu'elles ne modulent pas négativement la réponse au BH3-mimétique (données non présentées). Les isoformes de p53 étant fréquemment exprimées de façon aberrante dans les cancers, il serait intéressant d'étudier s'il existe une corrélation entre l'expression de ces isoformes et la sensibilité à l'ABT-737 (Bourdon *et al.*, 2013).

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis de mettre en évidence une interaction fonctionnelle de p53 et Bax, par laquelle le suppresseur de tumeur favorise l'activation de Bax et le déclenchement de l'apoptose dans plusieurs modèles cellulaires (figure 51). Nous avons montré que cette fonction du suppresseur de tumeur pouvait moduler la réponse aux thérapies anticancéreuses, notamment aux BH3-mimétiques. Ainsi, notre étude met en avant l'idée que la réactivation et/ou la stabilisation de p53 pourrait permettre d'améliorer la réponse aux traitements. Cette réactivation pourrait stimuler à la fois par la voie transcriptionnelle (augmentation de Puma, Noxa ou Bax,



**figure 51 : p53 participe à la réponse à l'ABT-737 en favorisant l'activation du proapoptotique effecteur Bax, libéré de Bcl-xL par le BH3-mimétique.**

---

répression de Bcl-xL) et non-transcriptionnelle (inhibition des anti-apoptotiques, activation directe de Bax). Il reste à déterminer dans quelle mesure p53 et Puma coopèrent pour activer Bax et des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'activation de Bax par Puma et p53.

### **3) Implication des processus cellulaires modulés par p53 dans la mort induite par ABT-737**

Depuis plus d'une décennie, les preuves de la multiplicité des fonctions non-transcriptionnelles de p53 s'accumulent (revues par Comel *et al.*, 2014; Galluzzi *et al.*, 2011; Green & Kroemer, 2009). Le suppresseur de tumeur est ainsi décrit comme impliqué dans des processus aussi divers que l'autophagie, la duplication des centrosomes, le métabolisme énergétique, des dérivés réactifs de l'oxygène ou encore le trafic des membranes internes. Il a à ce jour plus de 2100 interactants physiques reconnus (base de données BioGRID). Cette diversité complique donc considérablement l'étude d'un rôle cytoplasmique de p53 dans la sensibilité à l'ABT-737 en dehors de son rôle sur le réseau de protéines de la famille Bcl-2.

Nous avons dans un premier temps exploré l'implication dans la sensibilité à l'ABT-737 de l'inhibition de l'autophagie par le p53 cytoplasmique (Tasdemir *et al.*, 2008). L'ABT-737 déclenche l'autophagie en libérant Beclin-1 des anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Maiuri *et al.*, 2007b). Nous nous sommes demandés si p53 jouait son rôle dans la mort induite par l'ABT-737 en inhibant l'autophagie déclenchée, déplaçant l'équilibre vers l'apoptose. Toutefois nous avons observé que les cellules p21<sup>-/-</sup> ont un niveau d'autophagie plus élevé que les cellules parentales ou p53<sup>-/-</sup> en absence de traitement. L'ABT-737 entraîne une hausse du flux autophagique dans la lignée p21<sup>-/-</sup> mais peu dans la lignée parentale ou p53<sup>-/-</sup>. Ces données sont plus en accord avec une action transcriptionnelle pro-autophagique de p53 dans les cellules p53<sup>-/-</sup>. Enfin, le traitement à la Chloroquine, inhibiteur de l'autophagie, ne permet pas de sensibiliser à l'ABT-737 les cellules HCT116 parentales ou p53<sup>-/-</sup>. Ces premières données ne supportent pas l'hypothèse que le p53 cytoplasmique sensibilise à l'ABT-737 en inhibant l'autophagie dans les cellules. En revanche, elles suggèrent que p53 contribue à un l'existence d'un signal qui rendent les cellules particulièrement dépendantes d'un flux

autophagique pour le maintien de leur survie. Nous effectuons actuellement des expériences tenant à étudier si ce signal (inhibé par l'autophagie et dont la nature resterait à déterminer) conduit à l'activation de Bax et par là même à une sensibilité aux BH3 mimétiques.

Parmi les fonctions non transcriptionnelles de p53, il serait notamment intéressant d'évaluer le rôle du suppresseur de tumeur sur la dynamique mitochondriale étant donné son interaction récemment identifiée avec Drp1 (Guo *et al.*, 2014), la masse mitochondriale par le contrôle de la mitophagie (Hoshino *et al.*, 2013b), ou encore le niveau de dérivés réactifs de l'oxygène, pouvant altérer les mitochondries et faciliter le déclenchement de l'apoptose.

### **C. Conclusions générales**

Au cours de notre travail, nous avons décrit différents mécanismes par lesquels les voies de suppression tumorale pRb/E2F1 et p53 modulent le réseau d'interactions de la famille Bcl-2. Nous avons ainsi décrit une nouvelle activité pro-apoptotique de pRb, dont le clivage par une fraction sub-létale de caspase permet d'acquérir une fonction transcriptionnelle inédite, par la formation du complexe du fragment p68<sup>Rb</sup> avec E2F1. La transactivation de Noxa par ce complexe permet l'amplification du signal apoptotique aboutissant à la mort des cellules. Nous avons en revanche montré que p53 participe à la réponse à l'ABT-737 indépendamment de sa fonction transcriptionnelle. Il est requis pour les différentes étapes de l'activation de Bax, même lorsque celui-ci est libéré de ses partenaires anti-apoptotiques. Les modalités moléculaires de cette interaction fonctionnelles restent à déterminer au cours de futures études.

- 
- Adams, J.M., and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324–1337.
- Di Agostino, S., Strano, S., Emiliozzi, V., Zerbini, V., Mottolèse, M., Sacchi, A., Blandino, G., and Piaggio, G. (2006). Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer Cell* 10, 191–202.
- Albershardt, T.C., Salerni, B.L., Soderquist, R.S., Bates, D.J.P., Pletnev, A.A., Kisselev, A.F., and Eastman, A. (2011). Multiple BH3 mimetics antagonize antiapoptotic MCL1 protein by inducing the endoplasmic reticulum stress response and up-regulating BH3-only protein NOXA. *J. Biol. Chem.* 286, 24882–24895.
- 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.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J.C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* 345 Pt 2, 271–278.
- Aoubala, M., Murray-Zmijewski, F., Khoury, M.P., Fernandes, K., Perrier, S., Bernard, H., Prats, A.-C., Lane, D.P., and Bourdon, J.-C. (2011). p53 directly transactivates p133p53 $\alpha$ , regulating cell fate outcome in response to DNA damage. *Cell Death Differ.* 18, 248–258.
- 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.
- Arima, Y., Nitta, M., Kuninaka, S., Zhang, D., Fujiwara, T., Taya, Y., Nakao, M., and Saya, H. (2005a). Transcriptional Blockade Induces p53-dependent Apoptosis Associated with Translocation of p53 to Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 19166–19176.
- Arima, Y., Nitta, M., Kuninaka, S., Zhang, D., Fujiwara, T., Taya, Y., Nakao, M., and Saya, H. (2005b). Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 19166–19176.
- Arima, Y., Inoue, Y., Shibata, T., Hayashi, H., Nagano, O., Saya, H., and Taya, Y. (2008). Rb depletion results in deregulation of E-cadherin and induction of cellular phenotypic changes that are characteristic of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 68, 5104–5112.
- 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.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Sheiko, T., Craigen, W.J., and Molkenin, J.D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat. Cell Biol.* 9, 550–555.
- Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., et al. (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217–221.
- Banerjee, J., and Ghosh, S. (2004). Bax increases the pore size of rat brain mitochondrial voltage-dependent anion channel in the presence of tBid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 310–314.

- 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.
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.W., Luzio, J.P., Simari, R., and Weissberg, P. (1998). Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 282, 290–293.
- 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.
- Bharatham, N., Chi, S.-W., and Yoon, H.S. (2011). Molecular basis of Bcl-X(L)-p53 interaction: insights from molecular dynamics simulations. *PloS One* 6, e26014.
- Biderman, L., Poyurovsky, M.V., Assia, Y., Manley, J.L., and Prives, C. (2012). MdmX is required for p53 interaction with and full induction of the Mdm2 promoter after cellular stress. *Mol. Cell Biol.* 32, 1214–1225.
- Bleicken, S., Classen, M., Padmavathi, P.V.L., Ishikawa, T., Zeth, K., Steinhoff, H.-J., and Bordignon, E. (2010). Molecular details of Bax activation, oligomerization, and membrane insertion. *J. Biol. Chem.* 285, 6636–6647.
- Ano Bom, A.P.D., Rangel, L.P., Costa, D.C.F., de Oliveira, G.A.P., Sanches, D., Braga, C.A., Gava, L.M., Ramos, C.H.I., Cepeda, A.O.T., Stumbo, A.C., et al. (2012). Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: implications for cancer. *J. Biol. Chem.* 287, 28152–28162.
- Bourdon, J.-C., Surget, S., and Khoury, M.P. (2013). Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *OncoTargets Ther.* 57.
- Boutillier, A.L., Trinh, E., and Loeffler, J.P. (2000). Caspase-dependent cleavage of the retinoblastoma protein is an early step in neuronal apoptosis. *Oncogene* 19, 2171–2178.
- Bracken, A.P., Ciro, M., Cocito, A., and Helin, K. (2004). E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem. Sci.* 29, 409–417.
- Brady, C.A., and Attardi, L.D. (2010). p53 at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 2527–2532.
- Braun, F., Bertin-Ciftci, J., Gallouet, A.-S., Millour, J., and Juin, P. (2011). Serum-nutrient starvation induces cell death mediated by Bax and Puma that is counteracted by p21 and unmasked by Bcl-x(L) inhibition. *PloS One* 6, e23577.
- 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.
- Brooks, C.L., and Gu, W. (2011). The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein Cell* 2, 456–462.
- 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.
- Brooks, C., Cho, S.-G., Wang, C.-Y., Yang, T., and Dong, Z. (2011). Fragmented mitochondria are sensitized to Bax insertion and activation during apoptosis. *AJP Cell Physiol.* 300, C447–C455.

- 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*.
- Burkhardt, D.L., and Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* 8, 671–682.
- 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.
- Cartron, P.-F., Bellot, G., Oliver, L., Grandier-Vazeille, X., Manon, S., and Vallette, F.M. (2008). Bax inserts into the mitochondrial outer membrane by different mechanisms. *FEBS Lett.* 582, 3045–3051.
- Cecchini, M.J., and Dick, F.A. (2011). The biochemical basis of CDK phosphorylation-independent regulation of E2F1 by the retinoblastoma protein. *Biochem. J.* 434, 297–308.
- Ceol, C.J., and Horvitz, H.R. (2001). dpl-1 DP and efl-1 E2F act with lin-35 Rb to antagonize Ras signaling in *C. elegans* vulval development. *Mol. Cell* 7, 461–473.
- Certo, M., Moore, V.D.G., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A., and Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9, 351–365.
- Chan, W.M., Siu, W.Y., Lau, A., and Poon, R.Y.C. (2004). How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Mol. Cell. Biol.* 24, 3536–3551.
- Charan, R.A., Johnson, B.N., Zaganelli, S., Nardozi, J.D., and LaVoie, M.J. (2014). Inhibition of apoptotic Bax translocation to the mitochondria is a central function of parkin. *Cell Death Dis.* 5, e1313.
- Charlot, J.F., Nicolier, M., Pr  tet, J.L., and Mougin, C. (2006). Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin- $\alpha$  on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 11, 813–827.
- 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.
- Chicas, A., Molina, P., and Bargonetti, J. (2000). Mutant p53 forms a complex with Sp1 on HIV-LTR DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 383–390.
- Chinnam, M., and Goodrich, D.W. (2011). Chapter 5 - RB1, Development, and Cancer. In *Current Topics in Developmental Biology*, Michael A. Dyer, ed. (Academic Press), pp. 129–169.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.* 18, 157–164.
- 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., 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.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell* *37*, 299–310.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* *265*, 346–355.
- Chou, N.-H., Chen, H.-C., Chou, N.-S., Hsu, P.-I., and Tseng, H.-H. (2006). Expression of altered retinoblastoma protein inversely correlates with tumor invasion in gastric carcinoma. *World J. Gastroenterol.* *WJG* *12*, 7188–7191.
- Colin, J., Garibal, J., Mignotte, B., and Guénel, I. (2009). The mitochondrial TOM complex modulates bax-induced apoptosis in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *379*, 939–943.
- Comel, A., Sorrentino, G., Capaci, V., and Del Sal, G. (2014). The cytoplasmic side of p53's oncosuppressive activities. *FEBS Lett.* *588*, 2600–2609.
- Costanzo, A., Pediconi, N., Narcisi, A., Guerrieri, F., Belloni, L., Fausti, F., Botti, E., and Levrero, M. (2014). TP63 and TP73 in cancer, an unresolved “family” puzzle of complexity, redundancy and hierarchy. *FEBS Lett.*
- Craxton, A., Butterworth, M., Harper, N., Fairall, L., Schwabe, J., Ciechanover, A., and Cohen, G.M. (2012). NOXA, a sensor of proteasome integrity, is degraded by 26S proteasomes by an ubiquitin-independent pathway that is blocked by MCL-1. *Cell Death Differ.* *19*, 1424–1434.
- 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.
- Czabotar, P.E., Lee, E.F., van Delft, M.F., Day, C.L., Smith, B.J., Huang, D.C.S., Fairlie, W.D., Hinds, M.G., and Colman, P.M. (2007). Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 6217–6222.
- 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. (2013a). Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* *152*, 519–531.
- 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. (2013b). 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.
- Dai, H., Ding, H., Meng, X.W., Lee, S.-H., Schneider, P.A., and Kaufmann, S.H. (2013). Contribution of Bcl-2 phosphorylation to Bak binding and drug resistance. *Cancer Res.* *73*, 6998–7008.
- Davison, T.S., Vagner, C., Kaghad, M., Ayed, A., Caput, D., and Arrowsmith, C.H. (1999). p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53. *J. Biol. Chem.* *274*, 18709–18714.
- Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* *22*, 8543–8567.

- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., and Old, L.J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 2420–2424.
- Delston, R.B., Matatall, K.A., Sun, Y., Onken, M.D., and Harbour, J.W. (2011). p38 phosphorylates Rb on Ser567 by a novel, cell cycle-independent mechanism that triggers Rb–Hdm2 interaction and apoptosis. *Oncogene* *30*, 588–599.
- Deng, X., Gao, F., Flagg, T., Anderson, J., and May, W.S. (2006). Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 4421–4434.
- Deshpande, A., and Hinds, P.W. (2006). The retinoblastoma protein in osteoblast differentiation and osteosarcoma. *Curr. Mol. Med.* *6*, 809–817.
- Deter, R.L., Baudhuin, P., and De Duve, C. (1967). Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J. Cell Biol.* *35*, C11–C16.
- 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.
- Dick, F.A. (2007). Structure-function analysis of the retinoblastoma tumor suppressor protein - is the whole a sum of its parts? *Cell Div.* *2*, 26.
- 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.
- Diederich, L., Fotedar, A., and Fotedar, R. (1998). Proteolytic cleavage of retinoblastoma protein upon DNA damage and Fas-mediated apoptosis. *Cell Biol. Toxicol.* *14*, 133–140.
- 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.
- Ding, W.-X., Ni, H.-M., Li, M., Liao, Y., Chen, X., Stolz, D.B., Dorn, G.W., and Yin, X.-M. (2010). Nix Is Critical to Two Distinct Phases of Mitophagy, Reactive Oxygen Species-mediated Autophagy Induction and Parkin-Ubiquitin-p62-mediated Mitochondrial Priming. *J. Biol. Chem.* *285*, 27879–27890.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* *356*, 215–221.
- Dou, Q.P., Zhao, S., Levin, A.H., Wang, J., Helin, K., and Pardee, A.B. (1994). G1/S-regulated E2F-containing protein complexes bind to the mouse thymidine kinase gene promoter. *J. Biol. Chem.* *269*, 1306–1313.
- 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.
- Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* *44*, 817–829.

- Engelmann, D., and Pützer, B.M. (2012). The dark side of E2F1: in transit beyond apoptosis. *Cancer Res.* *72*, 571–575.
- Epand, R.F., Martinou, J.-C., Montessuit, S., Epand, R.M., and Yip, C.M. (2002). Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *298*, 744–749.
- Erster, S., Mihara, M., Kim, R.H., Petrenko, O., and Moll, U.M. (2004). In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 6728–6741.
- Fattman, C.L., An, B., and Dou, Q.P. (1997). Characterization of interior cleavage of retinoblastoma protein in apoptosis. *J. Cell. Biochem.* *67*, 399–408.
- Fattman, C.L., Delach, S.M., Dou, Q.P., and Johnson, D.E. (2001). Sequential two-step cleavage of the retinoblastoma protein by caspase-3/-7 during etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* *20*, 2918–2926.
- Ferecatu, I., Le Floch, N., Bergeaud, M., Rodríguez-Enfedaque, A., Rincheval, V., Oliver, L., Vallette, F.M., Mignotte, B., and Vayssière, J.-L. (2009). Evidence for a mitochondrial localization of the retinoblastoma protein. *BMC Cell Biol.* *10*, 50.
- Ferrandiz, N., Martin-Perez, J., Blanco, R., Donertas, D., Weber, A., Eilers, M., Dotto, P., Delgado, M.D., and Leon, J. (2009). 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* *8*, 390–399.
- Fesik, S.W. (2005). Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 876–885.
- Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell. Microbiol.* *8*, 1812–1825.
- Le Floch, N., Rincheval, V., Ferecatu, I., Ali-Boina, R., Renaud, F., Mignotte, B., and Vayssière, J.-L. (2010). The p76(Rb) and p100(Rb) truncated forms of the Rb protein exert antagonistic roles on cell death regulation in human cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *399*, 173–178.
- Fogal, V., Hsieh, J.-K., Royer, C., Zhong, S., and Lu, X. (2005). Cell cycle-dependent nuclear retention of p53 by E2F1 requires phosphorylation of p53 at Ser315. *EMBO J.* *24*, 2768–2782.
- 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.
- Fontemaggi, G., Kela, I., Amariglio, N., Rechavi, G., Krishnamurthy, J., Strano, S., Sacchi, A., Givol, D., and Blandino, G. (2002). Identification of direct p73 target genes combining DNA microarray and chromatin immunoprecipitation analyses. *J. Biol. Chem.* *277*, 43359–43368.
- Forget, K.J., Tremblay, G., and Roucou, X. (2013). p53 Aggregates penetrate cells and induce the co-aggregation of intracellular p53. *PloS One* *8*, e69242.

- 
- Frank, A.K., Pietsch, E.C., Dumont, P., Tao, J., and Murphy, M.E. (2011). Wild-type and mutant p53 proteins interact with mitochondrial caspase-3. *Cancer Biol. Ther.* *11*, 740–745.
- Freed-Pastor, W.A., Mizuno, H., Zhao, X., Langerød, A., Moon, S.-H., Rodriguez-Barrueco, R., Barsotti, A., Chicas, A., Li, W., Polotskaia, A., et al. (2012). Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell* *148*, 244–258.
- 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., Morselli, E., Kepp, O., Tajeddine, N., and Kroemer, G. (2008). Targeting p53 to mitochondria for cancer therapy. *Cell Cycle Georget. Tex* *7*, 1949–1955.
- Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Vitale, I., Pinti, M., and Kroemer, G. (2011). Mitochondrial liaisons of p53. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 1691–1714.
- 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.
- Gauthier, M.L., Berman, H.K., Miller, C., Kozakeiwicz, K., Chew, K., Moore, D., Rabban, J., Chen, Y.Y., Kerlikowske, K., and Tlsty, T.D. (2007). Abrogated response to cellular stress identifies DCIS associated with subsequent tumor events and defines basal-like breast tumors. *Cancer Cell* *12*, 479–491.
- Gautier, F., Guillemain, 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.
- 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.
- Geng, Y., Eaton, E.N., Picón, M., Roberts, J.M., Lundberg, A.S., Gifford, A., Sardet, C., and Weinberg, R.A. (1996). Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* *12*, 1173–1180.
- Goh, A.M., Coffill, C.R., and Lane, D.P. (2011). The role of mutant p53 in human cancer. *J. Pathol.* *223*, 116–126.
- Göhler, T., Jäger, S., Warnecke, G., Yasuda, H., Kim, E., and Deppert, W. (2005). Mutant p53 proteins bind DNA in a DNA structure-selective mode. *Nucleic Acids Res.* *33*, 1087–1100.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* *458*, 1127–1130.
- Greider, C., Chattopadhyay, A., Parkhurst, C., and Yang, E. (2002). BCL-x(L) and BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. *Oncogene* *21*, 7765–7775.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* *140*, 883–899.

- Gu, B., and Zhu, W.-G. (2012). Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *Int. J. Biol. Sci.* *8*, 672–684.
- Gu, W., and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell* *90*, 595–606.
- Guo, X., Sesaki, H., and Qi, X. (2014). Drp1 stabilizes p53 on the mitochondria to trigger necrosis under oxidative stress conditions in vitro and in vivo. *Biochem. J.* *461*, 137–146.
- Ha, J.-H., Shin, J.-S., Yoon, M.-K., Lee, M.-S., He, F., Bae, K.-H., Yoon, H.S., Lee, C.-K., Park, S.G., Muto, Y., et al. (2013). Dual-site interactions of p53 protein transactivation domain with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins reveal a highly convergent mechanism of divergent p53 pathways. *J. Biol. Chem.* *288*, 7387–7398.
- Hagenbuchner, J., Ausserlechner, M.J., Porto, V., David, R., Meister, B., Bodner, M., Villunger, A., Geiger, K., and Obexer, P. (2010). The anti-apoptotic protein BCL2L1/Bcl-xL is neutralized by pro-apoptotic PMAIP1/Noxa in neuroblastoma, thereby determining bortezomib sensitivity independent of prosurvival MCL1 expression. *J. Biol. Chem.* *285*, 6904–6912.
- Hagn, F., Klein, C., Demmer, O., Marchenko, N., Vaseva, A., Moll, 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.
- Hamel, W., Westphal, M., and Shepard, H.M. (1993). Loss in expression of the retinoblastoma gene product in human gliomas is associated with advanced disease. *J. Neurooncol.* *16*, 159–165.
- 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 Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Al-Harbi, S., Hill, B.T., Mazumder, S., Singh, K., Devecchio, J., Choudhary, G., Rybicki, L.A., Kalaycio, M., Maciejewski, J.P., Houghton, J.A., et al. (2011). An antiapoptotic BCL-2 family expression index predicts the response of chronic lymphocytic leukemia to ABT-737. *Blood* *118*, 3579–3590.
- Harbour, J.W., Luo, R.X., Santi, A.D., Postigo, A.A., and Dean, D.C. (1999). Cdk Phosphorylation Triggers Sequential Intramolecular Interactions that Progressively Block Rb Functions as Cells Move through G1. *Cell* *98*, 859–869.
- Hattori, T., Uchida, C., Takahashi, H., Yamamoto, N., Naito, M., and Taya, Y. (2014). Distinct and site-specific phosphorylation of the retinoblastoma protein at serine 612 in differentiated cells. *PLoS One* *9*, e86709.
- Haupt, Y., Rowan, S., and Oren, M. (1995). p53-mediated apoptosis in HeLa cells can be overcome by excess pRB. *Oncogene* *10*, 1563–1571.
- 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.

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.

Hirschi, A., Cecchini, M., Steinhardt, R.C., Schamber, M.R., Dick, F.A., and Rubin, S.M. (2010). An overlapping kinase and phosphatase docking site regulates activity of the retinoblastoma protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1051–1057.

Hock, A.K., and Vousden, K.H. (2014). The role of ubiquitin modification in the regulation of p53. *Biochim. Biophys. Acta* *1843*, 137–149.

Hollville, E., Carroll, R.G., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2014). Bcl-2 Family Proteins Participate in Mitochondrial Quality Control by Regulating Parkin/PINK1-Dependent Mitophagy. *Mol. Cell* *55*, 451–466.

Hoppins, S., Edlich, F., Cleland, M.M., Banerjee, S., McCaffery, J.M., Youle, R.J., and Nunnari, J. (2011). The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes. *Mol. Cell* *41*, 150–160.

Hoshino, A., Mita, Y., Okawa, Y., Ariyoshi, M., Iwai-Kanai, E., Ueyama, T., Ikeda, K., Ogata, T., and Matoba, S. (2013a). Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. *Nat. Commun.* *4*, 2308.

Hoshino, A., Mita, Y., Okawa, Y., Ariyoshi, M., Iwai-Kanai, E., Ueyama, T., Ikeda, K., Ogata, T., and Matoba, S. (2013b). Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. *Nat. Commun.* *4*, 2308.

Hoshino, A., Ariyoshi, M., Okawa, Y., Kaimoto, S., Uchihashi, M., Fukai, K., Iwai-Kanai, E., Ikeda, K., Ueyama, T., Ogata, T., et al. (2014a). Inhibition of p53 preserves Parkin-mediated mitophagy and pancreatic  $\beta$ -cell function in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 3116–3121.

Hoshino, A., Ariyoshi, M., Okawa, Y., Kaimoto, S., Uchihashi, M., Fukai, K., Iwai-Kanai, E., Ikeda, K., Ueyama, T., Ogata, T., et al. (2014b). Inhibition of p53 preserves Parkin-mediated mitophagy and pancreatic  $\beta$ -cell function in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 3116–3121.

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

Huang, X., Masselli, A., Frisch, S.M., Hunton, I.C., Jiang, Y., and Wang, J.Y.J. (2007). Blockade of tumor necrosis factor-induced Bid cleavage by caspase-resistant Rb. *J. Biol. Chem.* *282*, 29401–29413.

Ianari, A., Natale, T., Calo, E., Ferretti, E., Alesse, E., Screpanti, I., Haigis, K., Gulino, A., and Lees, J.A. (2009a). Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer Cell* *15*, 184–194.

Ianari, A., Natale, T., Calo, E., Ferretti, E., Alesse, E., Screpanti, I., Haigis, K., Gulino, A., and Lees, J.A. (2009b). 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.

- 
- 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.
- Ishimaru, D., Andrade, L.R., Teixeira, L.S.P., Quesado, P.A., Maiolino, L.M., Lopez, P.M., Cordeiro, Y., Costa, L.T., Heckl, W.M., Weissmüller, G., et al. (2003). Fibrillar aggregates of the tumor suppressor p53 core domain. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 9022–9027.
- Ivashyna, O., García-Sáez, A.J., Ries, J., Christenson, E.T., Schwille, P., and Schlesinger, P.H. (2009). Detergent-activated BAX protein is a monomer. *J. Biol. Chem.* 284, 23935–23946.
- Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A., and Weinberg, R.A. (1992). Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359, 295–300.
- James, D.I., and Martinou, J.-C. (2008). Mitochondrial Dynamics and Apoptosis: A Painful Separation. *Dev. Cell* 15, 341–343.
- Janumyan, Y., Cui, Q., Yan, L., Sansam, C.G., Valentin, M., and Yang, E. (2008). G0 function of BCL2 and BCL-xL requires BAX, BAK, and p27 phosphorylation by Mirk, revealing a novel role of BAX and BAK in quiescence regulation. *J. Biol. Chem.* 283, 34108–34120.
- Jiang, H., Martin, V., Alonso, M., Gomez-Manzano, C., and Fueyo, J. (2010). RB-E2F1: molecular rheostat for autophagy and apoptosis. *Autophagy* 6, 1216–1217.
- Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7, 279–296.
- Johnson, B.N., Berger, A.K., Cortese, G.P., and Lavoie, M.J. (2012). The ubiquitin E3 ligase parkin regulates the proapoptotic function of Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6283–6288.
- Juhász, G., Csikós, G., Sinka, R., Erdélyi, M., and Sass, M. (2003). The Drosophila homolog of Aut1 is essential for autophagy and development. *FEBS Lett.* 543, 154–158.
- 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.
- Julian, L.M., Palander, O., Seifried, L.A., Foster, J.E.G., and Dick, F.A. (2008). Characterization of an E2F1-specific binding domain in pRB and its implications for apoptotic regulation. *Oncogene* 27, 1572–1579.
- Kaesler, M.D., and Iggo, R.D. (2002). Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 95–100.
- Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 392–401.
- Kannan, K., Amariglio, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Kela, I., Kaminski, N., Getz, G., Domany, E., and Givol, D. (2001). DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene* 20, 2225–2234.
- Karbowski, M., Lee, Y.-J., Gaume, B., Jeong, S.-Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J. Cell Biol.* 159, 931–938.
- 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.

- 
- Katsuda, K., Kataoka, M., Uno, F., Murakami, T., Kondo, T., Roth, J.A., Tanaka, N., and Fujiwara, T. (2002). Activation of caspase-3 and cleavage of Rb are associated with p16-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 21, 2108–2113.
- Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Seymour, A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1992). Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 256, 827–830.
- Khoo, K.H., Hoe, K.K., Verma, C.S., and Lane, D.P. (2014). Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 217–236.
- Kim, H., Tu, H.-C., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., and Cheng, E.H.-Y. (2009). Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* 36, 487–499.
- Kline, M.P., Rajkumar, S.V., Timm, M.M., Kimlinger, T.K., Haug, J.L., Lust, J.A., Greipp, P.R., and Kumar, S. (2007). ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells. *Leukemia* 21, 1549–1560.
- Knights, C.D., Catania, J., Di Giovanni, S., Muratoglu, S., Perez, R., Swartzbeck, A., Quong, A.A., Zhang, X., Beerman, T., Pestell, R.G., et al. (2006). Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J. Cell Biol.* 173, 533–544.
- Knudsen, E.S., and Wang, J.Y. (1996). Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 271, 8313–8320.
- Koster, M.I., Kim, S., Mills, A.A., DeMayo, F.J., and Roop, D.R. (2004). p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev.* 18, 126–131.
- Kreso, A., and Dick, J.E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 14, 275–291.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R., and May, P. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J. Virol.* 31, 472–483.
- Kruse, J.-P., and Gu, W. (2009). MSL2 Promotes Mdm2-independent Cytoplasmic Localization of p53. *J. Biol. Chem.* 284, 3250–3263.
- Kutuk, O., and Letai, A. (2008). Alteration of the mitochondrial apoptotic pathway is key to acquired paclitaxel resistance and can be reversed by ABT-737. *Cancer Res.* 68, 7985–7994.
- 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* 111, 331–342.
- Lalier, L., Cartron, P.-F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., and Vallette, F.M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 12, 887–896.
- Lambert, P.F., Kashanchi, F., Radonovich, M.F., Shiekhattar, R., and Brady, J.N. (1998). Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J. Biol. Chem.* 273, 33048–33053.
- Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16.

- Lasagna-Reeves, C.A., Clos, A.L., Castillo-Carranza, D., Sengupta, U., Guerrero-Muñoz, M., Kelly, B., Wagner, R., and Kaye, R. (2013). Dual role of p53 amyloid formation in cancer; loss of function and gain of toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 963–968.
- Laulier, C., and Lopez, B.S. (2012). The secret life of Bcl-2: apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. *Mutat. Res.* 751, 247–257.
- Laulier, C., Barascu, A., Guirouilh-Barbat, J., Pennarun, G., Le Chalony, C., Chevalier, F., Paliarne, G., Bertrand, P., Verbavatz, J.M., and Lopez, B.S. (2011). Bcl-2 inhibits nuclear homologous recombination by localizing BRCA1 to the endomembranes. *Cancer Res.* 71, 3590–3602.
- Leber, B., Lin, J., and Andrews, D.W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene* 29, 5221–5230.
- Lee, D.-H., Ha, J.-H., Kim, Y., Jang, M., Park, S.J., Yoon, H.S., Kim, E.-H., Bae, K.-H., Park, B.C., Park, S.G., et al. (2014). A conserved mechanism for binding of p53 DNA-binding domain and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. *Mol. Cells* 37, 264–269.
- Lee, E.Y., Chang, C.Y., Hu, N., Wang, Y.C., Lai, C.C., Herrup, K., Lee, W.H., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 359, 288–294.
- Lee, W.H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L.J., Shew, J.Y., and Lee, E.Y. (1987). Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 235, 1394–1399.
- Lemaire, C., Godefroy, N., Costina-Parvu, I., Rincheval, V., Renaud, F., Trotot, P., Bouleau, S., Mignotte, B., and Vayssière, J.-L. (2005). Caspase-9 can antagonize p53-induced apoptosis by generating a p76(Rb) truncated form of Rb. *Oncogene* 24, 3297–3308.
- 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-XL inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* 9, 390–397.
- 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.
- Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* 9, 749–758.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2009). Autophagy in aging, disease and death: the true identity of a cell death impostor. *Cell Death Differ.* 16, 1–2.
- Levy, C.B., Stumbo, A.C., Ano Bom, A.P.D., Portari, E.A., Cordeiro, Y., Carneiro, Y., Silva, J.L., and De Moura-Gallo, C.V. (2011). Co-localization of mutant p53 and amyloid-like protein aggregates in breast tumors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 60–64.
- Li, J., Donath, S., Li, Y., Qin, D., Prabhakar, B.S., and Li, P. (2010). miR-30 regulates mitochondrial fission through targeting p53 and the dynamin-related protein-1 pathway. *PLoS Genet.* 6, e1000795.
- Li, M., Brooks, C.L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R., and Gu, W. (2003). Mono- Versus Polyubiquitination: Differential Control of p53 Fate by Mdm2. *Science* 302, 1972–1975.
- Linkermann, A., and Green, D.R. (2014). Necroptosis. *N. Engl. J. Med.* 370, 455–465.

- Linzer, D.I., and Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* *17*, 43–52.
- Liu, J., Zhang, C., and Feng, Z. (2014). Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *46*, 170–179.
- Liu, Q., Leber, B., and Andrews, D.W. (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* *11*, 3536–3542.
- 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.
- Lopez, H., Zhang, L., George, N.M., Liu, X., Pang, X., Evans, J.J.D., Targy, N.M., and Luo, X. (2010). Perturbation of the Bcl-2 network and an induced Noxa/Bcl-xL interaction trigger mitochondrial dysfunction after DNA damage. *J. Biol. Chem.* *285*, 15016–15026.
- Lucken-Ardjomande, S., Montessuit, S., and Martinou, J.-C. (2008). Contributions to Bax insertion and oligomerization of lipids of the mitochondrial outer membrane. *Cell Death Differ.* *15*, 929–937.
- Luo, S., Garcia-Arencibia, M., Zhao, R., Puri, C., Toh, P.P.C., Sadiq, O., and Rubinsztein, D.C. (2012). Bim inhibits autophagy by recruiting Beclin 1 to microtubules. *Mol. Cell* *47*, 359–370.
- Magzoub, M., and Miranker, A.D. (2011). Protein aggregation: p53 succumbs to peer pressure. *Nat. Chem. Biol.* *7*, 248–249.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007a). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 741–752.
- Maiuri, M.C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J.M., Tajeddine, N., Hickman, J.A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007b). BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* *3*, 374–376.
- Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Malik, S.A., and Kroemer, G. (2010). Autophagy regulation by p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 181–185.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., and Tainsky, M.A. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* *250*, 1233–1238.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 153–166.
- Mancini, F., Di Conza, G., Pellegrino, M., Rinaldo, C., Prodosmo, A., Giglio, S., D'Agnano, I., Florenzano, F., Felicioni, L., Buttitta, F., et al. (2009). MDM4 (MDMX) localizes at the mitochondria and facilitates the p53-mediated intrinsic-apoptotic pathway. *EMBO J.* *28*, 1926–1939.
- 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.

- 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.
- Martinou, J.-C., and Youle, R.J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell* *21*, 92–101.
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 961–967.
- Mathieu, A.-L., Sperandio, O., Pottiez, V., Balzarín, S., Herlédan, A., Elkaïm, J.O., Fogeron, M.-L., Piveteau, C., Dassonneville, S., Deprez, B., et al. (2014). Identification of Small Inhibitory Molecules Targeting the Bfl-1 Anti-Apoptotic Protein That Alleviates Resistance to ABT-737. *J. Biomol. Screen.*
- Mayo, L.D., Seo, Y.R., Jackson, M.W., Smith, M.L., Rivera Guzman, J., Korgaonkar, C.K., and Donner, D.B. (2005). Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified. *J. Biol. Chem.* *280*, 25953–25959.
- Mehta, S.V., Shukla, S.N., and Vora, H.H. (2013). Overexpression of Bcl2 protein predicts chemoresistance in acute myeloid leukemia: its correlation with FLT3. *Neoplasma* *60*, 666–675.
- Melero, J.A., Stitt, D.T., Mangel, W.F., and Carroll, R.B. (1979). Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. *Virology* *93*, 466–480.
- Meuwissen, R., Linn, S.C., Linnoila, R.I., Zevenhoven, J., Mooi, W.J., and Berns, A. (2003). Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell* *4*, 181–189.
- 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.
- Milet, C., Rincheval-Arnold, A., Mignotte, B., and Guénel, I. (2010). The Drosophila retinoblastoma protein induces apoptosis in proliferating but not in post-mitotic cells. *Cell Cycle Georget. Tex* *9*, 97–103.
- Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* *80*, 293–299.
- Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., and Reed, J.C. (1994). Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res.* *54*, 3131–3135.
- Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* *147*, 728–741.
- Moldoveanu, T., Grace, C.R., Llambi, F., Nourse, A., Fitzgerald, P., Gehring, K., Kriwacki, R.W., and Green, D.R. (2013). BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 589–597.

- 
- 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.
- Moll, U.M., Wolff, S., Speidel, D., and Deppert, W. (2005). Transcription-independent proapoptotic functions of p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 631–636.
- Montessuit, S., Somasekharan, S.P., Terrones, O., Lucken-Ardjomande, S., Herzig, S., Schwarzenbacher, R., Manstein, D.J., Bossy-Wetzels, E., Basañez, G., Meda, P., et al. (2010). Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell* *142*, 889–901.
- Moriwaki, K., and Chan, F.K.-M. (2013). RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev.* *27*, 1640–1649.
- Morselli, E., Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Kepp, O., Criollo, A., Vicencio, J.M., Soussi, T., and Kroemer, G. (2008). Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy. *Cell Cycle Georget. Tex* *7*, 3056–3061.
- Morselli, E., Shen, S., Ruckenstein, C., Bauer, M.A., Mariño, G., Galluzzi, L., Criollo, A., Michaud, M., Maiuri, M.C., Chano, T., et al. (2011). p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 2763–2769.
- Mukherjee, P., Cao, T.V., Winter, S.L., and Alexandrow, M.G. (2009). Mammalian MCM loading in late-G(1) coincides with Rb hyperphosphorylation and the transition to post-transcriptional control of progression into S-phase. *PloS One* *4*, e5462.
- Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nat. Cell Biol.* *15*, 2–8.
- Muller, P.A.J., Vousden, K.H., and Norman, J.C. (2011). p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J. Cell Biol.* *192*, 209–218.
- Munro, S., Carr, S.M., and La Thangue, N.B. (2012). Diversity within the pRb pathway: is there a code of conduct? *Oncogene* *31*, 4343–4352.
- Murray-Zmijewski, F., Lane, D.P., and Bourdon, J.-C. (2006). p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* *13*, 962–972.
- Nabel, E.G. (2002). CDKS and CKIS: Molecular targets for tissue remodelling. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*, 587–598.
- Nakajima, W., and Tanaka, N. (2011). Noxa induces apoptosis in oncogene-expressing cells through catch-and-release mechanism operating between Puma and Mcl-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *413*, 643–648.
- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* *7*, 683–694.
- Ni Chonghaile, T., and Letai, A. (2008). Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene* *27 Suppl 1*, S149–S157.
- Nie, L., Sasaki, M., and Maki, C.G. (2007). Regulation of p53 nuclear export through sequential changes in conformation and ubiquitination. *J. Biol. Chem.* *282*, 14616–14625.

- 
- Nieminen, A.I., Eskelinen, V.M., Haikala, H.M., Tervonen, T.A., Yan, Y., Partanen, J.I., and Klefström, J. (2013). Myc-induced AMPK-phospho p53 pathway activates Bak to sensitize mitochondrial apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E1839–E1848.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* *288*, 1053–1058.
- Ohtani, K., and Nevins, J.R. (1994). Functional properties of a Drosophila homolog of the E2F1 gene. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 1603–1612.
- Ohtani, K., Tsujimoto, A., Ikeda, M., and Nakamura, M. (1998). Regulation of cell growth-dependent expression of mammalian CDC6 gene by the cell cycle transcription factor E2F. *Oncogene* *17*, 1777–1785.
- O’Kane, S.L., Pound, R.J., Campbell, A., Chaudhuri, N., Lind, M.J., and Cawkwell, L. (2006). Expression of bcl-2 family members in malignant pleural mesothelioma. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* *45*, 449–453.
- Okorokov, A.L., and Orlova, E.V. (2009). Structural biology of the p53 tumour suppressor. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *19*, 197–202.
- 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.
- Pang, X., Zhang, J., Lopez, H., Wang, Y., Li, W., O’Neill, K.L., Evans, J.J.D., George, N.M., Long, J., Chen, Y., et al. (2014). The Carboxyl-terminal Tail of Noxa Protein Regulates the Stability of Noxa and Mcl-1. *J. Biol. Chem.* *289*, 17802–17811.
- Park, S.Y., Jeong, M.S., and Jang, S.B. (2012). In vitro binding properties of tumor suppressor p53 with PUMA and NOXA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *420*, 350–356.
- 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.
- Peter, B., Cerny-Reiterer, S., Hadzijusufovic, E., Schuch, K., Stefanzi, G., Eisenwort, G., Gleixner, K.V., Hoermann, G., Mayerhofer, M., Kundi, M., et al. (2014). The pan-Bcl-2 blocker obatoclax promotes the expression of Puma, Noxa, and Bim mRNA and induces apoptosis in neoplastic mast cells. *J. Leukoc. Biol.* *95*, 95–104.
- 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.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* *29*, e45.
- Pietrzak, M., and Puzianowska-Kuznicka, M. (2008). p53-dependent repression of the human MCL-1 gene encoding an anti-apoptotic member of the BCL-2 family: the role of Sp1 and of basic transcription factor binding sites in the MCL-1 promoter. *Biol. Chem.* *389*, 383–393.
- Pietsch, E.C., Leu, J.I.-J., Frank, A., Dumont, P., George, D.L., and Murphy, M.E. (2007). The tetramerization domain of p53 is required for efficient BAK oligomerization. *Cancer Biol. Ther.* *6*, 1576–1583.

- 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.
- Placzek, W.J., Wei, J., Kitada, S., Zhai, D., Reed, J.C., and Pellecchia, M. (2010). A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell Death Dis.* *1*, e40.
- Polager, S., and Ginsberg, D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 738–748.
- Raemy, E., and Martinou, J.-C. (2014). Involvement of cardiolipin in tBID-induced activation of BAX during apoptosis. *Chem. Phys. Lipids* *179*, 70–74.
- Ramírez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M.B., and Gutierrez, C. (1999). The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nucleic Acids Res.* *27*, 3527–3533.
- Rashmi, R., Pillai, S.G., Vijayalingam, S., Ryerse, J., and Chinnadurai, G. (2008). BH3-only protein BIK induces caspase-independent cell death with autophagic features in Bcl-2 null cells. *Oncogene* *27*, 1366–1375.
- Reichel, R., Kovesdi, I., and Nevins, J.R. (1987). Developmental control of a promoter-specific factor that is also regulated by the E1A gene product. *Cell* *48*, 501–506.
- 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.
- Renault, T.T., Grandier-Vazeille, X., Arokium, H., Velours, G., Camougrand, N., Priault, M., Teijido, O., Dejean, L.M., and Manon, S. (2012). The cytosolic domain of human Tom22 modulates human Bax mitochondrial translocation and conformation in yeast. *FEBS Lett.* *586*, 116–121.
- Restle, A., Färber, M., Baumann, C., Böhringer, M., Scheidtmann, K.H., Müller-Tidow, C., and Wiesmüller, L. (2008). Dissecting the role of p53 phosphorylation in homologous recombination provides new clues for gain-of-function mutants. *Nucleic Acids Res.* *36*, 5362–5375.
- Rinaldo, C., Prodosmo, A., Mancini, F., Iacovelli, S., Sacchi, A., Moretti, F., and Soddu, S. (2007). MDM2-regulated degradation of HIPK2 prevents p53Ser46 phosphorylation and DNA damage-induced apoptosis. *Mol. Cell* *25*, 739–750.
- Roger, L., Jullien, L., Gire, V., and Roux, P. (2010). Gain of oncogenic function of p53 mutants regulates E-cadherin expression uncoupled from cell invasion in colon cancer cells. *J. Cell Sci.* *123*, 1295–1305.
- Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Debatis, M.E., Jones, S., and Kowalik, T.F. (2002). E2F1 induces phosphorylation of p53 that is coincident with p53 accumulation and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 5308–5318.
- Rooswinkel, R.W., van de Kooij, B., de Vries, E., Paauwe, M., Braster, R., Verheij, M., and Borst, J. (2014). Antiapoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. *Blood* *123*, 2806–2815.

- 
- Roucou, X., Montessuit, S., Antonsson, B., and Martinou, J.-C. (2002). Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem. J.* *368*, 915.
- 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.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C., and Vousden, K.H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 332–337.
- 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.
- Saha, M.N., Qiu, L., and Chang, H. (2013). Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* *6*, 23.
- 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.
- Sakurikar, N., Eichhorn, J.M., and Chambers, T.C. (2012). Cyclin-dependent kinase-1 (Cdk1)/cyclin B1 dictates cell fate after mitotic arrest via phosphoregulation of antiapoptotic Bcl-2 proteins. *J. Biol. Chem.* *287*, 39193–39204.
- Sarosiek, K.A., Ni Chonghaile, T., and Letai, A. (2013). Mitochondria: gatekeepers of response to chemotherapy. *Trends Cell Biol.* *23*, 612–619.
- Sax, J.K., Fei, P., Murphy, M.E., Bernhard, E., Korsmeyer, S.J., and El-Deiry, W.S. (2002). BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat. Cell Biol.* *4*, 842–849.
- Schertel, C., and Conradt, B. (2007). *C. elegans* orthologs of components of the RB tumor suppressor complex have distinct pro-apoptotic functions. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 3691–3701.
- Scherz-Shouval, R., Weidberg, H., Gonen, C., Wilder, S., Elazar, Z., and Oren, M. (2010). p53-dependent regulation of autophagy protein LC3 supports cancer cell survival under prolonged starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 18511–18516.
- Schmale, H., and Bamberger, C. (1997). A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene* *15*, 1363–1367.
- Schoenwaelder, S.M., Jarman, K.E., Gardiner, E.E., Hua, M., Qiao, J., White, M.J., Josefsson, E.C., Alwis, I., Ono, A., Willcox, A., et al. (2011). Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopenia that undermines the hemostatic function of platelets. *Blood* *118*, 1663–1674.
- Schrantz, N., Blanchard, D.A., Auffredou, M.T., Sharma, S., Leca, G., and Vazquez, A. (1999). Role of caspases and possible involvement of retinoblastoma protein during TGFbeta-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *Oncogene* *18*, 3511–3519.
- Schuler, M., and Green, D.R. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* *29*, 684–688.
- Selvakumaran, M., Lin, H.K., Miyashita, T., Wang, H.G., Krajewski, S., Reed, J.C., Hoffman, B., and Liebermann, D. (1994). Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* *9*, 1791–1798.

- Senoo, M., Pinto, F., Crum, C.P., and McKeon, F. (2007). p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell* 129, 523–536.
- Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., and Andrews, D.W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 508–520.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325–334.
- Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T., and Tsujimoto, Y. (2000). Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 275, 12321–12325.
- Silva, J.L., Rangel, L.P., Costa, D.C.F., Cordeiro, Y., and De Moura Gallo, C.V. (2013). Expanding the prion concept to cancer biology: dominant-negative effect of aggregates of mutant p53 tumour suppressor. *Biosci. Rep.* 33.
- Smeenk, L., van Heeringen, S.J., Koepffel, M., Gilbert, B., Janssen-Megens, E., Stunnenberg, H.G., and Lohrum, M. (2011). Role of p53 serine 46 in p53 target gene regulation. *PloS One* 6, e17574.
- Song, H., and Xu, Y. (2007). Gain of function of p53 cancer mutants in disrupting critical DNA damage response pathways. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 1570–1573.
- Song, J.H., Kandasamy, K., Zemskova, M., Lin, Y.-W., and Kraft, A.S. (2011). The BH3 Mimetic ABT-737 Induces Cancer Cell Senescence. *Cancer Res.* 71, 506–515.
- Song, J.-Y., Ryu, S.-H., Cho, Y.M., Kim, Y.S., Lee, B.-M., Lee, S.-W., and Choi, J. (2013). Wip1 suppresses apoptotic cell death through direct dephosphorylation of BAX in response to  $\gamma$ -radiation. *Cell Death Dis.* 4, e744.
- Song, W., Huo, S., Lü, J., Liu, Z., Fang, X., Jin, X., and Yuan, M. (2009). Expression of p53 isoforms in renal cell carcinoma. *Chin. Med. J. (Engl.)* 122, 921–926.
- Sorrentino, G., Mioni, M., Giorgi, C., Ruggeri, N., Pinton, P., Moll, U., Mantovani, F., and Del Sal, G. (2013). The prolyl-isomerase Pin1 activates the mitochondrial death program of p53. *Cell Death Differ.* 20, 198–208.
- 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.
- Sperka, T., Wang, J., and Rudolph, K.L. (2012). DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 579–590.
- Srivastava, S., Wang, S., Tong, Y.A., Hao, Z.M., and Chang, E.H. (1993). Dominant negative effect of a germ-line mutant p53: a step fostering tumorigenesis. *Cancer Res.* 53, 4452–4455.
- Stambolsky, P., Tabach, Y., Fontemaggi, G., Weisz, L., Maor-Aloni, R., Siegfried, Z., Siegfried, Z., Shiff, I., Kogan, I., Shay, M., et al. (2010). Modulation of the vitamin D3 response by cancer-associated mutant p53. *Cancer Cell* 17, 273–285.

- Surget, S., Khoury, M.P., and Bourdon, J.-C. (2013). Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *OncoTargets Ther.* 7, 57–68.
- Suzuki, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645–654.
- Sykes, S.M., Mellert, H.S., Holbert, M.A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W.S., and McMahon, S.B. (2006). Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol. Cell* 24, 841–851.
- Sykes, S.M., Stanek, T.J., Frank, A., Murphy, M.E., and McMahon, S.B. (2009). Acetylation of the DNA binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53. *J. Biol. Chem.* 284, 20197–20205.
- Sylvester, A.M., Chen, D., Krasinski, K., and Andrés, V. (1998). Role of c-fos and E2F in the induction of cyclin A transcription and vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Clin. Invest.* 101, 940–948.
- Tagscherer, K.E., Fassel, A., Campos, B., Farhadi, M., Kraemer, A., Böck, B.C., Macher-Goeppinger, S., Radlwimmer, B., Wiestler, O.D., Herold-Mende, C., et al. (2008). Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 27, 6646–6656.
- Tait, 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.
- Takahashi, T., Nau, M.M., Chiba, I., Birrer, M.J., Rosenberg, R.K., Vinocour, M., Levitt, M., Pass, H., Gazdar, A.F., and Minna, J.D. (1989). p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246, 491–494.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* 119, 301–311.
- Tan, X., Martin, S.J., Green, D.R., and Wang, J.Y. (1997). Degradation of retinoblastoma protein in tumor necrosis factor- and CD95-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 272, 9613–9616.
- Tanaka, A., and Youle, R.J. (2008). A chemical inhibitor of DRP1 uncouples mitochondrial fission and apoptosis. *Mol. Cell* 29, 409–410.
- Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., et al. (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell Biol.* 10, 676–687.
- Taylor, W.R., and Stark, G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803–1815.
- Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cell. Signal.* 16, 139–144.

- Thorburn, J., Andrysiak, Z., Staskiewicz, L., Gump, J., Maycotte, P., Oberst, A., Green, D.R., Espinosa, J.M., and Thorburn, A. (2014). Autophagy Controls the Kinetics and Extent of Mitochondrial Apoptosis by Regulating PUMA Levels. *Cell Rep.* *7*, 45–52.
- Till, A., and Subramani, S. (2010). A balancing act for autophagin. *J. Clin. Invest.* *120*, 2273–2276.
- Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Youle, R.J., and Edlich, F. (2013). The C-terminal helix of Bcl-xL mediates Bax retrotranslocation from the mitochondria. *Cell Death Differ.* *20*, 333–342.
- 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.
- Trudel, S., Stewart, A.K., Li, Z., Shu, Y., Liang, S.-B., Trieu, Y., Reece, D., Paterson, J., Wang, D., and Wen, X.-Y. (2007). The Bcl-2 family protein inhibitor, ABT-737, has substantial antimyeloma activity and shows synergistic effect with dexamethasone and melphalan. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 621–629.
- 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.
- Tsujimoto, Y. (1989). Overexpression of the human BCL-2 gene product results in growth enhancement of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 1958–1962.
- Uchida, C., Miwa, S., Kitagawa, K., Hattori, T., Isobe, T., Otani, S., Oda, T., Sugimura, H., Kamijo, T., Ookawa, K., et al. (2005). Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J.* *24*, 160–169.
- Udayakumar, T., Shareef, M.M., Diaz, D.A., Ahmed, M.M., and Pollack, A. (2010). The E2F1/Rb and p53/MDM2 pathways in DNA repair and apoptosis: understanding the crosstalk to develop novel strategies for prostate cancer radiotherapy. *Semin. Radiat. Oncol.* *20*, 258–266.
- Ugarenko, M., Nudelman, A., Rephaeli, A., Kimura, K.-I., Phillips, D.R., and Cutts, S.M. (2010). ABT-737 overcomes Bcl-2 mediated resistance to doxorubicin-DNA adducts. *Biochem. Pharmacol.* *79*, 339–349.
- Vaseva, A.V., and Moll, U.M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochim. Biophys. Acta* *1787*, 414–420.
- Vaseva, A.V., Marchenko, N.D., and Moll, U.M. (2009a). The transcription-independent mitochondrial p53 program is a major contributor to nutlin-induced apoptosis in tumor cells. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 1711–1719.
- Vaseva, A.V., Marchenko, N.D., and Moll, U.M. (2009b). The transcription-independent mitochondrial p53 program is a major contributor to nutlin-induced apoptosis in tumor cells. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 1711–1719.
- Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* *335*, 440–442.
- Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., and Strasser, A. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* *302*, 1036–1038.

- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* *319*, 525–532.
- Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 594–604.
- Wang, E.Y., Gang, H., Aviv, Y., Dhingra, R., Margulets, V., and Kirshenbaum, L.A. (2013). p53 Mediates Autophagy and Cell Death by a Mechanism Contingent On Bnip3. *Hypertension* *62*, 70–77.
- Wang, J., Beauchemin, M., and Bertrand, R. (2014a). Phospho-Bcl-xL(Ser62) influences spindle assembly and chromosome segregation during mitosis. *Cell Cycle Georget. Tex* *13*, 1313–1326.
- Wang, J.-X., Jiao, J.-Q., Li, Q., Long, B., Wang, K., Liu, J.-P., Li, Y.-R., and Li, P.-F. (2011). miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat. Med.* *17*, 71–78.
- Wang, P., Lindsay, J., Owens, T.W., Mularczyk, E.J., Warwood, S., Foster, F., Streuli, C.H., Brennan, K., and Gilmore, A.P. (2014b). Phosphorylation of the proapoptotic BH3-only protein bid primes mitochondria for apoptosis during mitotic arrest. *Cell Rep.* *7*, 661–671.
- Wang, Q., Sun, S.-Y., Khuri, F., Curran, W.J., and Deng, X. (2010a). Mono- or double-site phosphorylation distinctly regulates the proapoptotic function of Bax. *PLoS One* *5*, e13393.
- Wang, S., Yang, D., and Lippman, M.E. (2003). Targeting Bcl-2 and Bcl-XL with nonpeptidic small-molecule antagonists. *Semin. Oncol.* *30*, 133–142.
- Wang, W., Cheng, X., Lu, J., Wei, J., Fu, G., Zhu, F., Jia, C., Zhou, L., Xie, H., and Zheng, S. (2010b). Mitofusin-2 is a novel direct target of p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *400*, 587–592.
- Wang, Z.-X., Yang, J.-S., Pan, X., Wang, J.-R., Li, J., Yin, Y.-M., and De, W. (2010c). Functional and biological analysis of Bcl-xL expression in human osteosarcoma. *Bone* *47*, 445–454.
- Warr, M.R., and Shore, G.C. (2008). Small-molecule Bcl-2 antagonists as targeted therapy in oncology. *Curr. Oncol. Tor. Ont* *15*, 256–261.
- Wasiak, S., Zunino, R., and McBride, H.M. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J. Cell Biol.* *177*, 439–450.
- 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.
- 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.
- Winklhofer, K.F. (2014). Parkin and mitochondrial quality control: toward assembling the puzzle. *Trends Cell Biol.* *24*, 332–341.
- Wu, Z., and Yu, Q. (2009). E2F1-mediated apoptosis as a target of cancer therapy. *Curr. Mol. Pharmacol.* *2*, 149–160.

- Wu, Y., Mehew, J.W., Heckman, C.A., Arcinas, M., and Boxer, L.M. (2001). Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 20, 240–251.
- Wu, Y., Lin, J.C., Piluso, L.G., Dhahbi, J.M., Bobadilla, S., Spindler, S.R., and Liu, X. (2014). Phosphorylation of p53 by TAF1 inactivates p53-dependent transcription in the DNA damage response. *Mol. Cell* 53, 63–74.
- Xu, Y. (2003). Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ.* 10, 400–403.
- Xu, H., Ye, H., Osman, N.E., Sadler, K., Won, E.-Y., Chi, S.-W., and Yoon, H.S. (2009). The MDM2-binding region in the transactivation domain of p53 also acts as a Bcl-X(L)-binding motif. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 12159–12168.
- Xu, J., Reumers, J., Couceiro, J.R., De Smet, F., Gallardo, R., Rudyak, S., Cornelis, A., Rozenski, J., Zwolinska, A., Marine, J.-C., et al. (2011). Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat. Chem. Biol.* 7, 285–295.
- 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.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., and McKeon, F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* 2, 305–316.
- Yang, H., Williams, B.O., Hinds, P.W., Shih, T.S., Jacks, T., Bronson, R.T., and Livingston, D.M. (2002). Tumor suppression by a severely truncated species of retinoblastoma protein. *Mol. Cell Biol.* 22, 3103–3110.
- Yang, J., Sun, M., Zhang, A., Lv, C., De, W., and Wang, Z. (2011). Adenovirus-mediated siRNA targeting Bcl-xL inhibits proliferation, reduces invasion and enhances radiosensitivity of human colorectal cancer cells. *World J. Surg. Oncol.* 9, 117.
- Yao, H., Mi, S., Gong, W., Lin, J., Xu, N., Perrett, S., Xia, B., Wang, J., and Feng, Y. (2013). Anti-apoptosis proteins Mcl-1 and Bcl-xL have different p53-binding profiles. *Biochemistry (Mosc.)* 52, 6324–6334.
- Yecies, D., Carlson, N.E., Deng, J., and Letai, A. (2010). Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood* 115, 3304–3313.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol. Cell* 7, 673–682.
- 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.
- Yu, X., Muñoz-Alarcón, A., Ajayi, A., Webling, K.E., Steinhof, A., Langel, Ü., and Ström, A.-L. (2013). Inhibition of autophagy via p53-mediated disruption of ULK1 in a SCA7 polyglutamine disease model. *J. Mol. Neurosci.* MN 50, 586–599.
- Yu, X., Narayanan, S., Vazquez, A., and Carpizo, D.R. (2014). Small molecule compounds targeting the p53 pathway: are we finally making progress? *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 19, 1055–1068.

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

Zhang, C., Lin, M., Wu, R., Wang, X., Yang, B., Levine, A.J., Hu, W., and Feng, Z. (2011). Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16259–16264.

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

Zheng, N., Fraenkel, E., Pabo, C.O., and Pavletich, N.P. (1999). Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP. *Genes Dev.* 13, 666–674.

## A. Lignées cellulaires et traitements

Les différentes lignées isogéniques HCT116, issues du cancer colorectal, ont été fournies par le Professeur Vogelstein (John Hopkins University, Baltimore). Elles sont cultivées en conditions adhérentes en monocouche en milieu complet Mc Coy's 5A avec glutamine (Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal et 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine (Invitrogen), à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Les lignées U251, issue du glioblastome, Cal 51 et MDA-MB-231, issues du cancer du sein, ont été obtenues à l'ATCC. Elles sont cultivées en monocouche dans un milieu complet DMEM (Gibco) supplémenté de 5% de sérum de veau fœtal, 100 unités/mL de glutamine (Invitrogen) et 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine (Invitrogen), à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. La lignée de cancer du sein MCF7 issue de l'ATCC est cultivée en monocouche adhérente en milieu complet RPMI (Gibco) supplémenté de 5% de sérum de veau fœtal, 100 unités/mL de glutamine (Invitrogen) et 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine (Invitrogen). Sauf indication, les différents traitements sont réalisés dans les milieux complets et aux concentrations suivantes : 2µM ABT-737 (Abbott), 2µM WEHI-539 (APExBio), 10µM Nutlin3a (Sigma), 50µM étoposide (Sigma), 40µM pifithrine-α (Sigma), 10µM α-Amanitine (Sigma), 10µM Q-VD-OPh (R&D system), 50µM Chloroquine (Sigma).

## B. Transfection siRNA / plasmides et Infections

Les siRNA sont transfectés en utilisant le HiPerfect® (Qiagen) à une concentration de 20 pmole. Le mélange siRNA et Hiperfect® est préparé en milieu OptiMEM (Gibco) et ajouté sur les cellules en milieu frais sur la nuit. L'extinction est vérifiée après 48h.

siRNA	Référence	Fournisseur
Bax	HSC.RNAI.N138761.10.1	IDT
Noxa	AC224U4	Ambion
Parkin	sc-42158	Santa Cruz
Puma	ON-TARGETplus smart pool t-004380-00-0005	Thermo Scientific
p21	sc-29427	Santa Cruz
scr (contrôle)	sc-44230	Santa Cruz

En absence d'indication, les plasmides sont transfectés en utilisant la Lipofectamine2000™ (Invitrogen). Les mélanges d'ADN et de Lipofectamine2000™ sont réalisés selon les instructions du fabricant, en milieu OptiMEM (Gibco), puis ajoutés aux cellules, en milieu frais pendant 6h avant rinçage pour les HCT116, ou en OptiMEM sur la nuit pour les MCF7. Lorsque c'est notifié, l'agent de transfection JetPrime® (Polyplus-transfection) a été utilisé, selon les indications du fabricant. L'expression de protéine exogène est contrôlée après 24h. Les plasmides transfectés sont les suivants :

<b>Plasmide</b>	<b>Origine (laboratoire/référence)</b>
pcDNA3	Invitrogen V790-20
pcDNA3- flag-p53	Addgene #10838
pcDNA3-Noxa	O. Genestre
p53 R175H	G. Kroemer (insertion du p53muté dans le pcDNA3-flag-p53 via Cla1/Xho1)
p53ΔNES	G. Kroemer (idem)
p53ΔNLS	G. Kroemer (idem)
p53 R273H	G. Kroemer (idem)
pCMV-βGalactosidase	L. Duprez
prom-vide Luci	Affymetrix #LR0000
prom-p53 Luci	Affymetrix #LR0057
LZRS	SW. Tait
LZRS-Parkin	SW. Tait

Les extinctions de protéines par shRNA sont réalisées à partir de particules lentivirales produites au laboratoire. Les cellules sont infectées à une MOI de 3 (~3 particules infectieuses par cellule), puis rincées abondamment après 24h. La mortalité des cellules infectées avec un shRNA dirigé contre Mcl-1 et/ou Bcl-xL est évaluée 48h plus tard, éventuellement après traitement. Les cellules infectées avec un shRNA dirigé contre p53 sont passées 48h après le rinçage, en milieu complet Mc Coy's 5A avec glutamine (Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal, 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine (Invitrogen), et 1µg/mL de puromycine pour sélection. Les particules virales sont produites à partir des plasmides suivants :

<b>Plasmide Lentivecteur</b>	<b>Origine/Séquence</b>
pLKO1-scr (puro)	Addgene # 8453
pLKO1-p53 (puro)	Addgene # 25636
pFG12-scr (GFP)	GTGACCAGCGAATACCTGT (gène LacZ bactérien)
pFG12-Bcl-xL (GFP)	AGGATACAGCTGGAGTCAG
pFG12-Mcl-1 (GFP)	GAATGCCAGTGACCTGTGT

## C. Analyse de la mortalité

La mortalité a été analysée par comptage en bleu trypan, sauf indication contraire. Les cellules sont rincées au PBS et trypsinisée, puis reprises en PBS/bleu de trypan (50/50), avant numération directe des cellules vivantes et mortes, dont la membrane lésée est perméable au colorant bleu, sur lame de comptage (Kova® Glasstic Hycor). Un minimum de 150 cellules sont comptées pour évaluer le pourcentage de mortalité à chaque répliquât.

## D. Anticorps

Les anticorps primaires et secondaires suivants sont utilisés dans les conditions indiquées par les fabricants. Le réactif de détection des IgG natifs (Pierce) s'utilise de la même façon qu'un anticorps secondaire, lors d'un western-blot après immuno-précipitation.

Anticorps	Origine / Propriétés	Référence	Fournisseur
Actine	anticorps monoclonal de souris	MAB1501R	Millipore
Bax	anticorps polyclonal de lapin	A3533	Dako
Bax 6A7	anticorps monoclonal de souris	ab5714	Abcam
Bcl-xL	anticorps polyclonal de lapin	1018-1	Epiitomics
Caspase-3 active	anticorps monoclonal de lapin	559565	BD Pharmingen
Flag	anticorps monoclonal de souris	F1804	Sigma
LC3	anticorps polyclonal de lapin	4108	Cell Signaling
Mcl-1	anticorps polyclonal de lapin	sc819	Santa Cruz
Noxa	anticorps monoclonal de souris	ALX-804-408	Enzo Life Sciences
p21	anticorps monoclonal de lapin	2947	Cell Signaling
p53	anticorps monoclonal de souris	554294	BD Pharmingen
p53-pS15	anticorps polyclonal de lapin	9284	Cell Signaling
p62	anticorps monoclonal de souris	sc28359	Santa Cruz
Parkin	anticorps monoclonal de souris	sc32282	Santa Cruz
Puma	anticorps monoclonal de lapin	12450	Cell Signaling
Tubuline - $\beta$	anticorps monoclonal de souris	T0198	Sigma
souris HRP	anticorps de chèvre couplé à la peroxydase	115-001	Jackson ImmunoR
lapin HRP	anticorps de chèvre couplé à la peroxydase	111-001	Jackson ImmunoR
souris alexafluor 488	anticorps de chèvre couplé alexafluor 488nm	A11001	Invitrogen
lapin alexafluor 488	anticorps de chèvre couplé alexafluor 488nm	A11008	Invitrogen
souris APC	anticorps de chèvre couplé allophycocyanine	115-135-164	Jackson ImmunoR
Clean-blot IP HRP	réactif détection IgG natif couplé peroxydase	21230	Pierce

## **E. Western-Blot**

Les lysats protéiques pour analyses western-blot sont obtenus en additionnant aux cellules trypsinées du tampon CHIP (SDS 1%, EDTA 10nM, Tris-HCl pH 8,1 50mM, inhibiteurs de phosphatases et protéases Pierce), et en soniquant jusqu'à 3 fois 15min sur glace. Les protéines obtenues sont isolées après dénaturation par électrophorèse sur gel SDS/polyacrylamide, et transférées sur membrane polyvinylidifluorène activée par transfert liquide. Les protéines d'intérêt sont détectées via un complexe anticorps primaire/anticorps secondaire couplé à la HRP (Horse Radish Peroxydase), mis en évidence par l'ajout de substrat de la HRP donnant un produit chemoluminescent (kit Clarity™ western ECL Biorad). L'acquisition numérique est réalisée avec un appareil Chemidoc™ Biorad.

## **F. Co-immunoprécipitation**

Lorsque c'est précisé, les cellules sont fixées au PFA (paraformaldéhyde) avant la lyse, pour stabiliser les complexes protéiques. Dans ce cas, les cellules sont trypsinées, et rincées au PBS, avant d'être reprise dans 500µL de PBS, et 500µL de PBS 0,8% PFA préparé extemporanément. Après 15min d'agitation à température ambiante, l'ajout de 125µL de PBS-Glycine 1M permet de stopper la réaction. Après 5 minutes d'agitation, les cellules sont centrifugées, puis lysées de façon classique.

Les cellules sont lysées en tampon doux 1% Chaps + inhibiteurs protéases et phosphatases, 2h sur glace, voir jusqu'à 2 fois 15min de sonication sur glace (en particulier pour les cellules fixées). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 15min à 13 000g, et 500µg de protéines sont utilisés pour l'immunoprécipitation, en utilisant 1µg d'anticorps indiqué, précipité par les billes magnétiques couplées aux protéines A/G (PureProteome™ Millipore) selon les indications du fabricant; les immuno-précipitations contre Bax total et 6A7 sont réalisées par le protocole direct, alors que les autres immuno-précipitations sont réalisées par le protocole indirect. L'élution est réalisée en tampon de dépôt, par chauffage 5min à 95°C avant western-blot. La révélation se fait en utilisant le clean-blot IP reagent (Pierce) lorsque les isotypes des anticorps primaires sont compatibles.

## **G. Extractions mitochondriales**

Les extractions mitochondriales ont été réalisées en utilisant le kit Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells Pierce (Thermo Scientifique), selon les instructions fournies par le fabricant.

## **H. Pontages covalents**

Afin d'observer l'oligomérisation de Bax dans les différentes lignées, nous réalisons des pontages covalents au DSS (disuccinimidyl suberate). Après trypsination, les cellules subissent une lyse douce 2h sur glace en tampon Chaps 1% + inhibiteurs de phosphatases et protéases. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 15min à 13 000g, et 100µg de lysat protéiques sont incubés 30min sous agitation avec 5mM de DSS en tampon Hepes à 20mM. La réaction est arrêtée par l'ajout de Tris-HCl pH 7,5 à 50mM 15min sous agitation, avant dénaturation et dépôt pour western-blot.

## **I. Immuno-cytochimie**

Les cellules sont cultivées sur lamelle de verre ou lame IBIDI (Biovalley) pré-incubées à la polylysine D (Sigma). Lorsque c'est précisé, 150nM de MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen) sont ajoutés au milieu 15min avant la récupération des cellules et la fixation en PBS-PFA 1%. Après fixation, les cellules sont rincées au PBS, et perméabilisées pendant 10min en PBS-SDS 0,1% préparé extemporanément. Les cellules sont rincées et saturées en PBS-BSA 5%, puis incubées sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire indiqué en PBS-BSA 1%. Après rinçage PBS, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire correspondant en PBS-BSA 1%, pendant 2h à 37°C. Les cellules sont rincées au PBS, puis séchées et montées en ProtLong® Antifade avec DAPI entre lame et lamelle. Les observations sont réalisées avec un objectif x63 (ouverture numérique 1,4) monté sur un appareil Zeiss Axiovert 200M avec module ApoTome.

## J. BRET

Le BRET – Pour Bioluminescence Resonance Energy Transfert – est basé sur le transfert d'énergie entre une protéine donneuse fusionnée à la luciférase, et une protéine acceptrice fusionnée à la eYFP. En prenant en charge son substrat la coelenterazine, la luciférase émet une lumière bleue à 475nm. Si les protéines donneuses et acceptrices interagissent, la eYFP se trouve à proximité de la luciférase (<10nm), et est excitée par la lumière émise et réémet une lumière à 530nm. Le ratio BRET permet d'évaluer l'efficacité du transfert d'énergie, soustrait du ratio bruit de fond obtenu dans des conditions similaires en absence de protéine acceptrice.

$$\text{ratio BRET} = \frac{\text{Emission à } \lambda \text{ 530nm}}{\text{Emission à } \lambda \text{ 475nm}} - \frac{\text{Emission à } \lambda \text{ 530nm (bruit de fond)}}{\text{Emission à } \lambda \text{ 475nm (bruit de fond)}}$$

Pour évaluer les propriétés d'un complexe protéique en cellules entières, les cellules sont transfectées par une concentration constante de plasmide d'expression de la protéine donneuse fusionnée à la luciférase, et une concentration croissante de la protéine acceptrice fusionnée à la eYFP. Après 24h, les cellules sont trypsinées et transférées en plaques 96 puits blanche. Après un minimum de 16h d'incubation ou un éventuel traitement, les cellules sont rincées au PBS puis incubées avec 5µM de coelantérazine H (Uptima) pour la lecture de luminescence/fluorescence au luminomètre Mithras LP940. Les courbes de saturation tracées représentent le ratio BRET en fonction de la quantité totale de eYFP sur la luciférase. Elles permettent notamment de déterminer la spécificité du signal, qui doit être saturable, et de calculer le BRET<sub>max</sub>, ratio obtenu à la saturation qui dépend de l'efficacité du transfert maximal (orientation du dipôle, conformation du complexe), et BRET<sub>50</sub>, soit le ratio d'eYFP sur luciférase nécessaire pour obtenir la moitié du signal maximal qui représente l'affinité relative du couple de protéines d'intérêt. Les données présentées sont proviennent d'une expérience représentative de 3 réplicats.

Pour évaluer la dissociation d'un complexe protéique en réponse à une drogue, nous réalisons des doses réponses sur le signal BRET. Les cellules sont transfectées par des quantités fixes de plasmides donneurs et accepteurs, en se plaçant dans les conditions du BRET<sub>50</sub>. Après 24h, Après 24h, les cellules sont trypsinées et transférées en plaques 96 puits blanches. Elles sont ensuite traitées 6h avec des concentrations

croissantes de molécule étudiée, avant incubation avec 5 $\mu$ M de coelantérazine H pour la lecture.

## **K. Activités luciférases**

Les cellules sont transfectées avec un plasmide d'expression de la luciférase sous contrôle d'un promoteur minimal vide ou portant 5 éléments de réponse consensus synthétiques à p53 (p53RE), en parallèle d'un plasmide d'expression de la  $\beta$ -galactosidase en contrôle de transfection. Après traitement, les cellules sont lysées en tampon de lyse passive (PLB 1x Promega) sous forte agitation entre 15 et 30 min. L'activité de la luciférase produite est mesurée au luminomètre en utilisant le kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) selon les instructions du fabricant. La mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase est réalisée comme contrôle de l'efficacité de transfection, en mélangeant 50 $\mu$ L de lysat avec 50 $\mu$ L d'assay reporteur 2x (Promega) contenant le substrat de la galactosidase, clivé en un produit coloré. La réaction est arrêtée par l'ajout de carbonate de sodium 1M dès l'apparition de la coloration et l'absorbance est lue à 420nm. Les résultats sont présentés en activité de la luciférase sous contrôle du promoteur p53RE relative à l'activité luciférase sous contrôle du promoteur vide, rapporté pour chaque condition à l'activité  $\beta$ -galactosidase comme contrôle de transfection.

## **L. PCR quantitative**

Pour la PCR quantitative, les ARN totaux sont extraits des cellules par un kit Nucleospin® RNA (Macherey-Nagel). La rétro-transcription est effectuée à partir de 500ng d'ARNm avec le kit Maxima First strand cDNA Synthesis kit for RT-qPCR (Fisher Scientifique). Le mélange réactionnel composé selon les indications du fabricant est incubé 10min à 25°C, puis 15min à 50°C et enfin 5min à 85°C. La PCR quantitative est réalisée avec un kit EuroBioGreen qPCR Mix Lo-ROX (Eurobio). La PCR est réalisée en mélangeant 5 $\mu$ L de qPCR Master Mix, 1 $\mu$ L d'amorces sens et antisens à 1,5 $\mu$ M (150nM final) et 4 $\mu$ L d'ADNc dilué au 1/25 (soit 4ng d'ARN rétro-transcrit), et en incubant le mélange dans l'appareil Stratagene Mx3005P (Agilent), pendant 2min à 95°C pour activer la polymérase, puis pendant 40 cycles 5sec à 95°C et 20sec à 60°C. L'acquisition

des données se fait à la fin de l'étape d'hybridation/élongation à 60°C. Les qPCR sont réalisés sur les gènes d'intérêt, 3 gènes de références permettant la normalisation, ainsi qu'un contrôle de contamination et de formation de dimère d'amorce en eau et en contrôle négatif de rétro-transcription. Les données sont analysées par comparaison des Cq par la méthode de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Les amorces utilisées pour la PCR quantitative sont les suivantes :

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
Bax	GCAACTTCAACTGGGGCCGGG	GATCCAGCCCAACAGCCGCTC
Puma	GGAACAGTGGGCCCGGAGA	GTGCCGCTGCTGCTCCTCTT
Noxa	GCTGGAAGTCGAGTGTGCTA	CCTGAGCAGAAGAGTTTGGA
ActB	AGAAAATCTGGCACCACACC	CAGAGGCGTACAGGGATAGC
RPLP0	AACCCAGCTCTGGAGAAACT	CCCCTGGAGATTTTAGTGGT
RPS18	ATCCCTGAAAAGTTCCAGCA	CCCTCTGGTGAGGTCAATG

## M. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à partir de 3 expériences indépendantes sur le logiciel Prism. En absence de précision il s'agit d'un test ANOVA two-ways suivi d'un test Bonferroni (\* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,005).

# Thèse de Doctorat

Janic LE PEN

**Implication des voies de suppression tumorale p53 et E2F1 dans l'induction de la mort cellulaire en réponse à l'inhibition des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2**

**Implication of tumor suppression pathways p53 and pRb/E2F1 in cell death trigger by inhibition of anti-apoptotic members of Bcl-2 family**

## Résumé

Le BH3-mimétique ABT-737 est un analogue fonctionnel de l'ABT-263 (Navitoclax), un agent anticancéreux inhibant efficacement certains membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. La réponse apoptotique induite par l'ABT-737 est déterminée a priori par l'existence des complexes entre les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et les homologues anti-apoptotiques, que ce composé inhibe (Bcl-2, Bcl-xL,...) ou non (Mcl-1...).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'implication des voies de suppression tumorale p53 et pRb E2F1 dans l'apoptose induite par l'ABT-737. Nous avons démontré que le suppresseur de tumeur p53 est un acteur majeur de la mort induite par l'inhibition conjointe de Bcl-2, Bcl-xL, mais aussi de Mcl-1. Cette fonction de p53 est liée à sa capacité de déclencher l'activation complète de Bax par des mécanismes indépendants de la transcription. Nous avons par ailleurs démontré que dans un contexte muté pour p53, la voie pRb/E2F1 contrecarre la résistance cellulaire à l'ABT-737. Nous avons observé qu'à la suite d'un traitement à l'ABT-737, une activation sub-létale des caspases entraîne le clivage de pRb. Le complexe du fragment clivé p68Rb avec E2F1 contribue à l'amplification de l'activation des caspases et la mort cellulaire via la transactivation de Noxa, qui inhibe Mcl-1 principal frein à l'ABT-737.

Nos données suggèrent que les voies de suppression tumorales p53 et E2F1 favorisent la sensibilité des cellules cancéreuses à l'ABT-737. L'utilisation, en clinique, de combinaisons composées de l'ABT-263 et de molécule réactivant ces voies, telle que la Nutlin-3a, pourrait s'avérer particulièrement prometteuse.

## Mots clés

Apoptose, E2F1, pRb, p53, famille Bcl-2

## Abstract

The BH3-mimetic ABT-737 is a functional analogue of ABT-263 (Navitoclax), an anticancer agent potentially inhibiting some Bcl-2 homologues. Apoptotic response induced by ABT-737 is determined a priori by the existence of complexes between pro-apoptotic Bcl-2 family members and Bcl-2 homologues that this compound disrupts (Bcl-2, Bcl-xL...) or not (Mcl-1...). However, other parameters are also involved in the treatment response

In this study, we investigate the implication of tumor suppression pathway p53 and pRb/E2F1 in apoptosis induced by ABT-737. Our results indicate that p53 is required for efficient apoptosis in response to the inhibition of Bcl-2, Bcl-xL, and also Mcl-1. Moreover, we showed that the apoptotic function of p53 is linked to its ability to trigger complete Bax activation by transcription independent mechanisms. We also demonstrate that the pRB/E2F1 pathway constitutes an efficient way to overcome cellular resistance to ABT-737, in cells with dysfunctional p53. We observe that following ABT-737 treatment, a sublethal activation of caspases can lead to cleavage of pRb. The cleaved fragment p68Rb forms a complex with E2F1 that transactivates Noxa that inhibit Mcl-1, resulting in amplification of caspases activation and cell death. Our data suggest that tumor suppression pathway p53 and E2F1 may allow to sensitive cancer cells to ABT-737. Thus, the use of drug that reactivates those pathway, as Nutlin-3a, may have clinical utility in treatment of patient when combined with orally bioavailable compound ABT-263.

## Key Words

Apoptosis, E2F1, pRb, p53, Bcl-2 family