

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude de l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose induite par l'étoposide ou le paclitaxel dans les cellules tumorales HepG2 et A549

Genin, Marie

Award date:
2010

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Etude de l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose induite par l'étoposide ou le
paclitaxel dans les cellules tumorales HepG2 et A549**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Marie GENIN

Janvier 2010

Etude de l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose induite par l'étoposide ou le paclitaxel dans les cellules tumorales HepG2 et A549

GENIN Marie

Résumé :

A l'heure actuelle, le cancer est une des premières causes de mortalité. Or, il a été montré que l'efficacité des chimiothérapies, qui constituent le traitement de premier choix pour la majorité des cancers, peut être influencée par certains facteurs environnementaux tumoraux tels que l'hypoxie. En effet, dans certains cas, l'hypoxie est responsable d'une résistance à la mort cellulaire induite par ces traitements. Cet effet inhibiteur que possède l'hypoxie n'est pas applicable à tous les types cellulaires. Dans les cellules de carcinome hépatique HepG2, l'hypoxie inhibe l'apoptose induite par l'étoposide ou le paclitaxel, alors que dans les cellules de carcinome pulmonaire A549, elle n'a aucun effet. Afin de comprendre l'effet différentiel de l'hypoxie dans ces deux lignées cellulaires, nous avons étudié l'expression d'un grand nombre de gènes liés à l'apoptose suite à l'incubation de ces cellules en normoxie ou en hypoxie, en présence ou non d'étoposide ou de paclitaxel. Parmi les gènes dont l'expression a été étudiée, deux ont particulièrement retenu notre attention, il s'agit des gènes codant pour les protéines BH3-only, Noxa et Bim. En effet, leur expression en ARNm et protéique correspond aux profils d'apoptose et de mort cellulaire mesurés dans les cellules A549 et HepG2. Malgré leur profil d'expression intéressant, ni Noxa, ni Bim ne sont nécessaires à l'apoptose induite par l'étoposide dans les cellules HepG2. En effet, leur invalidation à l'aide de siRNA spécifiques ne diminue pas la cytotoxicité de l'étoposide en normoxie. Alors que l'invalidation de Noxa n'a pas d'effet sur la protection apportée par l'hypoxie vis-à-vis de l'apoptose induite par l'étoposide, l'inhibition de l'expression de Bim diminue celle-ci. En effet, l'invalidation de Bim en hypoxie en présence d'étoposide augmente la cytotoxicité de cet agent chimiothérapeutique. Bim semble donc posséder un effet anti-apoptotique en hypoxie en présence d'étoposide dans les cellules HepG2. Celui-ci pourrait expliquer, au moins partiellement, l'effet protecteur de l'hypoxie dans les cellules de carcinome hépatique HepG2 en présence de molécules chimiothérapeutiques.

Abréviations

Abréviation	Nom complet
14-3-3	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide
18S	Eukaryotic 18S rRNA
23 kDa	Ribosomal highly basic 23-kDa
2-OG	2-oxoglutarate
4EBP1 (2 or 3)	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (2 or 3)
4ET	eukaryotic translation initiation factor 4E nuclear import factor 1
53BP1	P53 binding protein 1
A1	BCL2-related protein A1 (BCL2A1)
Ab	Antibody
ABC	ATP-binding cassette
ACTB	Actine B
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adenosine diphosphate
AIF	Apoptosis-inducing factor
AKT	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AMP	Adenosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
AND	Acide désoxyribonucléique
ANT	Adenine nucleotide transporter
AP-1	Activator protein 1 (Jun oncogene)
APAF-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
APS	Ammonium persulphate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ARNT	Aryl hydrocarbon nuclear translocator
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia Rad3 related
BAD	BCL2-associated agonist of cell death
BAK	BCL2-antagonist/ killer 1
BAX	BCL2-associated X protein
BBC3	BCL2 binding component 3 (Puma)
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCL-W	BCL2-like 2
BCL-XL	BCL2-like 1
BH	Bcl-2 homology
bHLH	Basic helix-loop helix
BID	BH3 interacting domain death agonist
BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)

BIM	BCL2-like 11 (BCL2L11)
BIMEL	Bim extra-long
BIML	Bim long
BIMS	Bim short
BiP (HSPA5)	Heat shock 70kDa protein 5
BIRC	Baculoviral IAP repeat-containing
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 like
BOK	BCL2-related ovarian killer
BRCA1	Breast cancer susceptibility gene 1
BSA	Bovine serum albumin
CAD	Transactivation domain C-terminal (TAD-C)
CAD	Caspase-activated DNase
CARD	Caspase recruitment domain
CASPASE	Cysteine-dependent aspartate-specific protease
CBP	CREB-binding protein
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHK1/2	Checkpoint kinase ½
c-MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogenes homolog (avian)
Ct	Threshold cycle
Cul2	Cullin 2
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DEDD2	Death effector domain containing 2
DISC	Death-inducing signalling complex
DLC1	Dynein light chain 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Diméthyl sulfoxide
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
dNTP	Désoxyribonucléotides triphosphate
DR5	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
EEF2	Eukaryotic translation elongation factor 2
EEF2K	Eukaryotic elongation factor-2 kinase
eiF2	Eukaryotic translation initiation factor 2
eiF2B	Eukaryotic translation initiation factor 2B
EIF2α	Eukaryotic translation initiation factor 2α
EIF4A	Eukaryotic translation initiation factor 4A
EIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
EIF4F	Eukaryotic translation initiation factor 4F
EIF4G	Eukaryotic translation initiation factor 4G
eiF5	Eukaryotic translation initiation factor 5
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERAD	Endoplasmic reticulum associated degradation
ERK 1/2	Extracellular signal regulated kinase ½

FADD	Fas- associated death domain
FAS	TNF receptor superfamily, member 6
FAS-L	Fas ligand
FIH1	Factor inhibiting HIF-1
FOXO	Forkhead box O
GADD34	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A (PPP1R15A)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase
GDP	Guanosine diphosphate
Glut-4	Glucose transporter 4
GTP	Guanosine triphosphate
H2AX	H2A histone family, member X
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIF	Hypoxia-inducible factor
HIP1	Huntingtin interacting protein 1
HKG	Housekeeping gene
HRE	Hypoxia response element
HRP	Horseradish peroxydase
HTR-2/OMI	HtrA serine peptidase 2
IAP	Inhibitor of apoptosis
ICAD	Inhibitor of CAD
IGF-2	Insuline growth factor 2
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
IRE1	Inositol requiring enzyme 1
IRES	Internal ribosome entry site
JNK	Jun N-terminal kinase
kDa	Kilo Dalton
Km	Constante de Michaelis
LDH-A	Lactate deshydrogenase A
LDS	Lithium Dodecyl Sulfate
LKB1	Serine/threonine kinase 11
LRDD	Leucine-rich repeats and death domain containing
MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MDM2	Mouse double minute 2
MEM	Modified Eagle's Medium
MES	2-(n-morpholino)-ethanesulfonic acid
Met-tRNA	Methionyl-tRNA
MRP	Multidrug resistance related protein
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NAD	Transactivation domain N-terminal (TAD-N)
NAD+	Nicotinamide adenine dinucleotide (forme oxydée)
NALP1	NLR family, pyrin domain containing 1 (NLRP1)
NES	Nuclear export signal
NFκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NLS	Nuclear localization sequence
NOXA	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMAIP1)
NT sp	Non Targeting smart pool

NT1	Non Targeting 1
ODD	Oxygen-dependent degradation domain
ORF	Open reading frame
p300	E1A binding protein p300
p53	Tumor protein p53
p70S6K	Ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1
PARP-1	Poly-ADP-ribose-polymerase-1
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDH	Pyruvate deshydrogenase
PDI	Protein disulfide isomerase
PDK1	Pyruvate deshydrogenase kinase-1
PDK1 (PDPK1)	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
PERK	PKR-like ER protein kinase
PFA	Paraformaldéhyde
PFK1	Phospho-fructokinase 1
PFK2	Phospho-fructokinase 2
PHD	Prolyl hydroxylase
PI3K	Phosphoinositode-3 kinase
PIB	Phosphatase Inhibitor Cocktail
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PIPES	1,4-Piperazinediethanesulfonic acid
PML	Promyelocytic leukemia
PTP	Permeability transition pore
PUMA	BCL2 binding component 3 (BBC3)
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
pVHL	Von Hippel-Lindau protein
PYCARD	PYD and CARD domain containing
Rbx1	Ring-box 1
rcf	Relative centrifugal force
RE	Reticulum endoplasmic
REDD1	Regulated in development and DNA damage responses 1
RF	RISC-free
RHEB	Ras homolog enriched in brain
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rotation par minute
S6 (SK6)	Ribosomal protein S6
SAPK	Stress-activated protein kinase (JNK)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SIDA	Syndrom d'immunodéficience acquise humaine
siRNA	Small interfering RNA
SMAC/DIABLO	Diablo homolog (Drosophila) or Mitochondrial Smac protein
TAD	Transactivation domain
TAD-C	Transactivation domain C-terminal
TAD-N	Transactivation domain N-terminal
tBID	Truncated Bid

TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	Tris Buffered Saline Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGF β	Transforming growth factor β
TLDA	TaqMan low density array
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TNF- α	Tumor necrosis factor α
Tom20	Translocase of outer membrane 20
TRADD	TNF- α associated death domain
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane
TSC1	Tuberous sclerosis complex 1
TSC2	Tuberous sclerosis complex 2
UPR	Unfolded protein response
UTR	Untranslated region
UV	Ultra-violet
VDAC	Voltage-dependent anion channel
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel-Lindau gene
XBP1	X-box binding protein 1

Table des matières

<u>I. Introduction</u>	1
<i>Avant- propos</i>	1
<i>1) L'hypoxie</i>	1
1.1) Définition et causes de l'hypoxie	1
1.2) Réponses systémiques et cellulaires à l'hypoxie	2
1.3) HIF : régulateur transcriptionnel clé en hypoxie	3
1.3.1) Le facteur de transcription HIF-1	3
1.3.2) Dégradation de HIF-1 en normoxie et stabilisation en hypoxie	3
1.3.3) Les réponses cellulaires induites par HIF-1	5
1.4) Régulation traductionnelle en hypoxie	6
1.4.1) Activation de la voie UPR	6
1.4.2) Inhibition de mTOR	7
<i>2) L'apoptose</i>	8
2.1) Définition de l'apoptose	8
2.2) Les caspases : protéases de la voie apoptotique	9
2.3) La voie extrinsèque de l'apoptose	10
2.4) La voie intrinsèque de l'apoptose	11
2.4.1) Mécanisme général de la voie d'apoptose mitochondriale	11
2.4.2) Les protéines de la famille Bcl-2	12
2.4.3) Régulation de la perméabilité mitochondriale par les protéines Bcl-2	14
2.4.4) L'apoptose induite par des dommages à l'ADN : importance de la protéine p53	15
<i>3) Cancer et hypoxie</i>	16
3.1) Le cancer	16
3.2) Les chimiothérapies	17
3.3) Hypoxie et apoptose dans le cancer	18
3.3.1) L'hypoxie : cause de mort cellulaire par apoptose	18
3.3.2) L'hypoxie : cause de résistance aux chimiothérapies	18
<i>4) Objectifs</i>	20
<u>II. Matériel et méthodes</u>	21
<i>1) Culture cellulaire</i>	21
<i>2) Incubation (en hypoxie avec des agents chimiothérapeutiques)</i>	21
<i>3) Dosage de la concentration en protéines</i>	21
3.1) Par la méthode de Bradford	22
3.2) Par la méthode de Pierce	22
<i>4) Mesure de l'activité des caspases-3 et -7</i>	22
4.1) Principe	22
4.2) Protocole	23
<i>5) Mesure de cytotoxicité via un dosage d'activité de la lactate déshydrogénase</i>	23
5.1) Principe	23
5.2) Protocole	24
<i>6) Mesure de la fragmentation de l'ADN génomique</i>	24
6.1) Principe	24
6.2) Protocole	25
<i>7) PCR en temps réel</i>	26

7.1) Principe	26
7.2) Protocole	26
7.2.1) Extraction d'ARN par la méthode « TRI Reagent Solution »	26
7.2.2) Rétro-transcription « kit Roche »	27
7.2.3) PCR en temps réel	27
8) Analyse d'expression génique à l'aide de cartes microfluidiques	28
8.1) Principe	28
8.2) Protocole	28
8.2.1) Extraction d'ARN et dosage à l'aide du Bioanalyzer Agilent	28
8.2.2) Rétro-transcription avec amorces aléatoires à l'aide du « High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit »	29
8.2.3) Cartes microfluidiques	29
9) Extraction protéique totale	29
9.1) Extraction protéique totale classique	29
9.2) Avec tampon de lyse DLA	29
10) Western Blot	30
10.1) Principe	30
10.2) Protocole	30
10.2.1) Western Bot Mini-gel SDS PAGE	30
10.2.2) Western Blot NuPage	31
11) Immunofluorescence	32
11.1) Principe	32
11.2) Protocole	32
12) Transfection avec des siRNA	32
12.1) Principe	32
12.2) Protocole	33

III. Résultats 34

1) Etude de l'effet différentiel de l'hypoxie sur la mort cellulaire induite par l'étoposide ou le paclitaxel	34
1.1) Mesure de l'apoptose	34
1.2) Mesure de la mort cellulaire	35
1.3) Effet des molécules chimiothérapeutiques sur le réseau microtubulaire	35
1.4) Conclusion	36
2) Effet de l'hypoxie sur les variations d'expression génique induites par l'étoposide ou le paclitaxel	36
2.1) Analyse de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose par TLDA	36
2.2) Validation des profils d'expression mesurés par cartes microfluidiques	38
2.3) Recherche de gènes présentant un profil d'expression intéressant parmi les 93 gènes analysés	39
2.4) Validation de l'expression en ARNm des 10 gènes candidats sélectionnés	39
2.5) Etude de l'expression protéique des différents candidats	43
3) Etude de l'impact de l'inactivation de Noxa ou de Bim sur la protection apportée par l'hypoxie vis-à-vis de l'apoptose induite par l'étoposide ou le paclitaxel dans les cellules HepG2	46
3.1) Etude de l'impact de l'inactivation de Noxa sur la mortalité cellulaire	47
3.1.1) Mises au point du protocole de transfection	47

3.1.2) Etude de l'impact de l'invalidation de Noxa sur la protection apportée par l'hypoxie vis-à-vis de l'apoptose induite par l'étoposide ou le paclitaxel dans les cellules HepG2	48
3.2) Etude de l'impact de l'invalidation de Bim sur la mortalité cellulaire	50
3.2.1) Mises au point du protocole de transfection	50
3.2.2) Etude de l'impact de l'invalidation de Bim sur la protection apportée par l'hypoxie vis-à-vis de l'apoptose induite par l'étoposide ou le paclitaxel dans les cellules HepG2	51
3.3) Etude de l'impact de l'invalidation de p53 sur l'abondance de Noxa et de Bim.....	53

IV. Discussion, perspectives et conclusion 55

V. Bibliographie 66

VI. Annexes.....1

I. Introduction

Avant- propos

A l'heure actuelle, le cancer est, avec les maladies cardiovasculaires, une des premières causes de mortalité. En effet, malgré les avancées scientifiques et médicales énormes faites ces dernières années dans le domaine de la cancérologie, seuls 50 % des cancers peuvent être guéris. Il est donc indispensable de poursuivre et d'approfondir encore davantage les recherches dans ce domaine, afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués, et de cette manière, pouvoir interférer avec ceux-ci.

Les thérapies les plus utilisées aujourd'hui pour arrêter le développement tumoral sont les chimiothérapies. Ces molécules, en inhibant le cycle cellulaire, vont cibler particulièrement les cellules en division rapide, et donc permettre une certaine sélectivité envers les cellules cancéreuses. Cette sélectivité n'est malheureusement pas complète, comme l'illustrent les nombreux effets secondaires. Un autre problème majeur de ce type de traitement est le développement de résistances. Celles-ci sont le plus souvent associées à la sélection de cellules tumorales capables, de part la présence de mutations au niveau d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs, de résister à la mort cellulaire par apoptose induite par les chimiothérapies. De plus, ces résistances peuvent également être associées à certains facteurs environnementaux des tumeurs ; l'hypoxie en est un exemple.

Au cours de ce travail, nous essayerons donc de comprendre les mécanismes de résistance induits par l'hypoxie, provoquant une diminution de l'efficacité de l'étoposide et du paclitaxel, deux molécules chimiothérapeutiques couramment utilisées en clinique. Plus exactement, nous chercherons à appréhender les différences existant entre deux lignées tumorales distinctes, les cellules de carcinome hépatique HepG2 et les cellules de carcinome pulmonaire A549.

Afin de permettre au lecteur, initié ou non, d'aborder de façon plus aisée le sujet, ce travail commence par une introduction reprenant les concepts d'hypoxie et d'apoptose, qui sont, dans un premier temps, expliqués de manière générale. Ensuite, ceux-ci sont mis en rapport avec la pathologie qui nous préoccupe, le cancer, dans le but de comprendre quelles peuvent être leurs implications mutuelles et leurs conséquences sur l'efficacité des chimiothérapies.

1) L'hypoxie

1.1) Définition et causes de l'hypoxie

L'hypoxie peut être décrite de différentes manières selon le point de vue avec lequel elle est abordée. Les physiologistes et cliniciens la définissent comme un état de disponibilité limitée en oxygène, ou comme une diminution de la pression partielle en oxygène en dessous d'un seuil limite, freinant ou supprimant la fonction des organes, des tissus ou des cellules. Les biochimistes quant à eux la décrivent comme une limitation, par manque d'O₂, du transport des électrons dans la chaîne mitochondriale de transporteurs d'électrons (Höckel et al., 2001).

Le paramètre le plus important pour qu'une cellule soit viable et assure ses fonctions correctement est son contenu en ATP, lequel doit être suffisant pour permettre à la cellule d'assurer ses besoins énergétiques. Or, la principale voie de synthèse de l'ATP est la phosphorylation oxydative. Au cours de celle-ci, le transport d'électrons, provenant de l'oxydation de molécules énergétiques, vers l'oxygène est couplé à la synthèse d'ATP. En conséquence, une diminution de la disponibilité en oxygène entraîne une inhibition de la

chaîne respiratoire mitochondriale et donc l'incapacité de produire de l'ATP par cette voie. Or, si la production d'ATP ne permet plus de répondre aux besoins énergétiques nécessaires aux équilibres osmotique et ionique, la mort cellulaire peut survenir. En effet, les principaux effets d'une réduction majeure de la production d'ATP sont 1) l'effondrement des gradients en K^+ et Na^+ , 2) la dépolarisation membranaire, 3) l'augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} suite à l'ouverture de canaux calciques, 4) le gonflement de la cellule, 5) la diminution du pH cytosolique, qui résulte en une acidose intracellulaire et finalement, 6) la perte de l'intégrité de la membrane plasmique (figure 1.1) (Michiels, 2004 ; Höckel et al., 2001).

L'hypoxie est une caractéristique courante au sein des tumeurs solides. Celle-ci résulte d'un déséquilibre entre l'apport d' O_2 et sa consommation. Elle peut être causée par différents facteurs dont les plus fréquents sont liés à la perfusion de la tumeur, à la diffusion de l'oxygène ou à de l'anémie. L'hypoxie liée la perfusion est causée par les anomalies vasculaires présentes au niveau des vaisseaux sanguins tumoraux (figure 1.2). Ces anomalies sont à la fois structurales et fonctionnelles. En effet, le réseau vasculaire est souvent désorganisé : il présente des dilatations, les vaisseaux ont des formes allongées et sont tortueux, le recouvrement endothélial est incomplet, le flux n'est pas régulé et une stase intermittente peut avoir lieu. L'hypoxie liée à des problèmes de diffusion est la conséquence d'une prolifération cellulaire tumorale trop rapide par rapport au développement des nouveaux vaisseaux sanguins. Les cellules tumorales se retrouvent alors au-delà de la limite de diffusion de l'oxygène, qui est d'environ 150 μm . Enfin, l'hypoxie anémique est causée par une réduction de la capacité du sang à transporter l'oxygène. Celle-ci peut être causée par la chimiothérapie ou par la maladie elle-même (Vaupel & Harrison, 2004).

1.2) Réponses systémiques et cellulaires à l'hypoxie

La capacité à maintenir une homéostasie en oxygène est indispensable à la survie de toutes les espèces de vertébrés. En conséquence, les systèmes physiologiques ont évolué pour assurer une oxygénation optimale de toutes les cellules de l'organisme. Des cellules chémoréceptrices spécialisées sont capables de percevoir le taux d'oxygène, et en fonction de celui-ci, de réguler les rythmes cardiaque et respiratoire. De plus, toutes les cellules nucléées sont également à même de percevoir la concentration en oxygène et de répondre à celle-ci si nécessaire, soit via l'activation de protéines préexistantes, soit via la régulation de l'expression de gènes (Michiels, 2004).

Lorsque la disponibilité en oxygène est compromise, différents systèmes chémosensoriels vont agir simultanément afin de moduler la ventilation pulmonaire et la circulation sanguine, dans le but d'optimiser l'approvisionnement en oxygène des tissus. Ces réponses dépendent à la fois de cellules chémoréceptrices spécialisées, présentes au niveau des corps carotidiens (circulation artérielle) et des corps neuroépithéliaux (voies aériennes), et de la réponse directe à l'hypoxie des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins (Michiels, 2004).

Au niveau cellulaire, l'hypoxie augmente l'efficacité des voies productrices d'énergie, à la fois en activant la voie glycolytique et en réduisant les processus consommateurs d'énergie. Une hiérarchie existe dans cette réduction. Les synthèses de protéines, d'ADN et d'ARN sont les premières inhibées, et cela dans le but de permettre aux pompes Na^+/K^+ et au cycle du Ca^{++} de rester fonctionnels le plus longtemps possible (Buttgereit & Brand, 1995). L'inhibition de la traduction en hypoxie sera décrite de manière détaillée au point 1.4. L'activation de la glycolyse se met en place rapidement (après quelques minutes d'exposition à l'hypoxie), grâce à la régulation allostérique de l'enzyme phospho-fructokinase 1 (PFK1).

Celle-ci est régulée négativement par l'ATP et positivement par l'ADP, l'AMP, mais surtout par le fructose-2,6-biphosphate. Celui-ci est synthétisé par l'enzyme PFK2, activée par phosphorylation par AMPK (AMP-activated protein kinase) après quelques minutes d'hypoxie (Hue et al., 1987 ; Marsin et al., 2000). AMPK stimule également la translocation du transporteur de glucose Glut-4 vers la membrane plasmique, afin d'augmenter l'entrée de glucose dans la cellule (Hardie et al., 2001). Au sein de la cellule, l'enzyme AMPK est le principal senseur des variations énergétiques. Une fois activée par liaison de l'AMP, elle est capable d'induire les voies cataboliques synthétisant l'ATP, tout en éteignant les voies anaboliques qui en consomment (Kemp et al., 1999) (figure 1.3). Les enzymes PFK1 et PFK2 sont toutes deux également régulées d'un point de vue transcriptionnel par le facteur de transcription HIF (hypoxia-inducible factor), qui est activé en hypoxie et dont la régulation et les fonctions seront décrites ci-dessous.

1.3) HIF : régulateur transcriptionnel clé en hypoxie

1.3.1) Le facteur de transcription HIF-1

Afin de maintenir une homéostasie en oxygène, les eucaryotes supérieurs ont développé des mécanismes permettant d'augmenter la prise d'O₂ et sa distribution dans l'organisme. Ces mécanismes passent, pour la plupart, par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF, lequel permet d'induire l'expression de gènes facilitant l'adaptation et la survie des cellules lors du passage de la normoxie (2-9 % O₂ dans la majorité des tissus de mammifères) à l'hypoxie (~1 % O₂) (Ke et al., 2006, Bertout et al., 2008).

Le facteur de transcription HIF est un hétérodimère composé de deux sous-unités distinctes, la sous-unité α stabilisée uniquement en conditions d'hypoxie et la sous-unité β présente constitutivement. Dans le génome humain, trois gènes distincts codent pour des sous-unités α du facteur HIF: HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α . Alors que HIF-1 α est une protéine ubiquiste, HIF-2 α est exprimé principalement aux niveaux pulmonaire, endothélial et de la carotide. Les trois isoformes possèdent 48 % d'identité au niveau de leur séquence en acides aminés et partagent également certaines propriétés structurales et biochimiques. L'expression de certains gènes est régulée à la fois par HIF-1 α et HIF-2 α , cependant les ensembles de gènes dont l'expression est régulée par l'une ou par l'autre sous-unité comportent malgré tout des différences. Quant à HIF-3 α , qui est exprimé dans de nombreux tissus, il est peu décrit et ne sera pas abordé ici. La sous-unité β , également appelée ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator), est également encodée par 3 gènes distincts, chacun permettant la synthèse d'une isoforme particulière. La liaison de HIF-1 α à HIF-1 β est la forme la plus courante de HIF et sera la seule considérée dans la suite de ce travail (Ke et al., 2006 ; Hu et al., 2003).

A leur extrémité amino-terminale, HIF-1 α et HIF-1 β contiennent tous les deux un domaine bHLH (basic helix-loop helix) et un domaine PAS (Per-ARNT-Sim) qui interviennent respectivement dans la liaison à l'ADN et dans la dimérisation. A l'extrémité carboxy-terminale de HIF-1 α , sont présents deux domaines transactivateurs nommés TAD-N ou NAD et TAD-C ou CAD, séparés par un domaine inhibiteur de la transcription. HIF-1 β quant à lui ne comporte qu'un seul domaine transactivateur nommé TAD à son extrémité carboxy-terminale. HIF-1 α comporte également un domaine responsable de sa dégradation en normoxie par le protéasome nommé ODD (oxygen-dependent degradation domain) (figure 1.4) (Gothie & Puysségur, 2002).

1.3.2) Dégradation de HIF-1 en normoxie et stabilisation en hypoxie

Afin de permettre une induction très rapide en cas d'hypoxie, HIF-1 α est transcrit et traduit constitutivement. Cependant, un mécanisme finement régulé assure sa dégradation lorsque la

pression en oxygène est suffisante. Pour ce faire, en présence d'oxygène, HIF-1 α est polyubiquitinylé et dégradé par la voie protéasomale, ce qui permet de maintenir son abondance protéique à un niveau très faible. Cette polyubiquitinylation est réalisée par une ubiquitine ligase dont la protéine pVHL (protéine de von Hippel-Lindau) fait partie. C'est elle qui assure la reconnaissance de HIF-1 α par le complexe protéique. Cependant, pour que la liaison de pVHL à HIF-1 α puisse avoir lieu, HIF-1 α doit être préalablement hydroxylé sur deux résidus prolines conservés situés dans son domaine ODD (P402 et P564). Cette hydroxylation, dépendante de l'oxygène, est réalisée par des prolyl hydroxylases ou PHD. C'est donc par l'intermédiaire de celles-ci que se réalise l'« oxygen sensing » (figure 1.5).

Ces prolyl hydroxylases font partie d'une famille de dioxygénases qui utilisent de l'oxygène et du 2-oxoglutarate (2-OG) comme substrats, en présence de fer et d'ascorbate comme cofacteurs. Au cours de la réaction, la scission de l'O₂ est couplée à l'hydroxylation de HIF-1 α et à la décarboxylation oxydative du 2-OG en succinate et CO₂. Le principal facteur régulant l'activité de ces PHD est l'oxygène, qui est nécessaire à la réaction d'hydroxylation. Grâce à un K_m pour l'oxygène toujours supérieur aux pressions intracellulaires en O₂, l'activité des PHD peut être modulée en fonction de la disponibilité en oxygène. D'autres facteurs tels que les ROS (reactive oxygen species) et les analogues du 2-OG (fumarate, succinate,...) ont également une action inhibitrice et sont capables de réguler l'activité des PHD. La disponibilité en fer et en ascorbate, cofacteurs de la réaction d'hydroxylation, peut également influencer l'activité de ces enzymes (Fong & Takeda, 2008 ; Kaelin & Ratcliffe, 2008).

La protéine pVHL est codée par un gène (*VHL*) suppresseur de tumeur. Les individus atteints de la maladie de von Hippel-Lindau sont généralement hétérozygotes pour la mutation du gène *VHL*. Lorsque l'allèle sauvage restant est perdu ou muté, ceux-ci vont alors développer rapidement un grand nombre de cancers. Cette capacité à former des tumeurs provient de l'incapacité des protéines pVHL mutées à former des complexes stables avec les protéines élongine B, élongine C, Cul2 et Rbx1. Ensemble, ces protéines composent l'E3-ubiquitine ligase ciblant HIF-1 α vers le protéasome en conditions de normoxie. Au sein de ce complexe, pVHL joue le rôle de reconnaissance du substrat, qui ne peut donc plus avoir lieu lorsque celle-ci est mutée. HIF-1 α va donc s'accumuler et induire l'expression des gènes cibles de HIF-1 de manière constitutive en normoxie (Kaelin, 2005).

FIH1 (factor inhibiting HIF-1), comme les PHD, est une dioxygénase dépendante du Fe(II) et du 2-oxoglutarate. En présence d'oxygène, elle est responsable de l'hydroxylation d'un résidu asparagine conservé, situé en position 803 du domaine transactivateur TAD-C de HIF-1 α . Cette hydroxylation empêche le recrutement des coactivateurs transcriptionnels p300 et CBP et donc la transcription de gènes dont l'expression en est dépendante. FIH1 étant active à des concentrations en oxygène plus basses que les enzymes PHD, elle permet de diminuer l'activité des protéines HIF-1 qui auraient échappé à la dégradation en hypoxie modérée. Donc, lorsque la pression en oxygène est trop faible pour activer les PHD mais suffisante pour l'activité de FIH1, seule l'expression des gènes dont l'expression est uniquement dépendante du domaine transactivateur N-TAD sera activée. La conséquence étant une activation différentielle des gènes cibles de HIF-1 tout au long du gradient de diffusion de l'oxygène entourant les vaisseaux sanguins. Outre ces hydroxylations, d'autres modifications post-traductionnelles de HIF-1 α (acétylation, phosphorylation,...) sont également décrites et modulent la stabilité et l'activité de cette sous-unité (Kaelin, 2005 ; Magagnin et al., 2006 ; Lee et al., 2004).

1.3.3) Les réponses cellulaires induites par HIF-1

Une fois la sous-unité HIF-1 α stabilisée en hypoxie, celle-ci s'accumule et est transférée au niveau nucléaire grâce à sa séquence d'adressage nucléaire (NLS) (Kallio et al., 1998). Elle s'associe alors à HIF-1 β afin de former un facteur de transcription fonctionnel. Celui-ci va, au niveau de séquences promotrices et activatrices de gènes cibles, se lier à une séquence HRE (hypoxia response element), et augmenter leur expression.

Grâce à des études d'expression génique, il a pu être établi que l'ensemble des gènes dont l'expression est induite en hypoxie est extrêmement hétérogène. Cette hétérogénéité peut être en partie expliquée par une différence au niveau du type cellulaire, ainsi que d'intensité et de durée de l'hypoxie. L'activité de HIF-1 étant induite dans presque tous les types cellulaires, ce facteur de transcription ne peut à lui seul, expliquer la différence d'expression liée au type cellulaire. Celle-ci proviendrait d'interactions fonctionnelles entre celui-ci et divers autres facteurs de transcription (Denko et al., 2003 ; Wenger et al., 2005 ; Kaluz et al., 2008). Le nombre de gènes cibles de HIF-1 induits en conditions hypoxiques varie selon le type cellulaire de plus de 200 (Wenger et al., 2005) à 1-5 % des gènes du génome (Semenza, 2003). Cependant, tous ne sont pas régulés directement par l'intermédiaire d'une séquence HRE. D'autres facteurs de transcription induits en hypoxie peuvent également participer à l'expression du pool de gènes induits en hypoxie (Denko et al., 2003).

Parmi les gènes cibles de HIF-1 dont l'expression est induite en hypoxie, on retrouve des gènes impliqués dans divers événements tels que l'érythropoïèse et le métabolisme du fer, l'angiogenèse, le métabolisme (du glucose), la régulation du pH, la survie et la mort cellulaire, l'adhérence, le remodelage de la matrice extracellulaire, la migration et la formation de métastases (figures 1.6 et 1.7). En hypoxie, HIF-1 est responsable de l'expression de gènes tels que le VEGF (vascular endothelial growth factor) et l'angiopoïétine-2. Ceux-ci, en induisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse), vont permettre aux cellules tumorales de retrouver un environnement où oxygène et nutriments sont en suffisance pour permettre la croissance tumorale (Ferrara et al., 2005). Un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire, spécialement celui du glucose, sont également induits par HIF-1. En effet, en hypoxie, la phosphorylation oxydative étant inhibée, la cellule doit se contenter de la glycolyse comme voie principale de synthèse de l'ATP. Or, vu que celle-ci produit moins d'ATP par molécule de glucose que ne le fait la phosphorylation oxydative, la cellule va compenser en augmentant à la fois l'incorporation de glucose et le flux à travers la voie glycolytique. Cela est rendu possible grâce à une augmentation de l'expression, induite par HIF-1, de gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport du glucose ainsi que dans la voie glycolytique (exemples : PFK1, PFK2,...). Le pyruvate qui est formé au terme de la glycolyse est écarté de la voie respiratoire par transformation en lactate. Celle-ci est stimulée par l'induction par HIF-1 de la LDH-A (lactate deshydrogenase A) responsable de la catalyse de cette réaction, et de la PDK1 (pyruvate deshydrogenase kinase 1) qui inhibe la PDH (pyruvate deshydrogenase) responsable de la transformation du pyruvate en acétyl-CoA (Brahimi-Horn et al., 2007). Cette production accrue de lactate va cependant avoir pour effet néfaste une diminution du pH extracellulaire, autrement dit une acidose. Malgré cela, le pH interne va être maintenu dans des limites stables grâce à la surexpression et à l'activation d'un certain nombre de transporteurs membranaires impliqués dans l'homéostasie du pH (Swietach et al., 2007). L'hypoxie initie donc une cascade d'événements permettant à la cellule de s'adapter et de continuer à proliférer. Cependant, si le manque en oxygène devient trop sévère, la mort cellulaire peut néanmoins être induite, comme la zone de nécrose présente au centre de certaines tumeurs en témoigne. Cette capacité de l'hypoxie à induire la mort cellulaire sera décrite en détails plus tard.

1.4) Régulation traductionnelle en hypoxie

Un autre mécanisme intervenant dans l'adaptation cellulaire aux conditions hypoxiques est une inhibition rapide et soutenue de la traduction des ARNm (Wouters et al, 2005). Il a été observé que déjà après 1 heure d'hypoxie sévère, le taux de synthèse protéique est réduit de 60-70 %. Après ré-oxygénation, celui-ci revient rapidement à un niveau basal (Kraggerud et al., 1995). Cette réduction dans la synthèse protéique se produit via un mécanisme dépendant de l'oxygène (indépendant de HIF-1) qui résulte en une inhibition de l'étape d'initiation de la traduction des ARNm. Il semble que cette inhibition de la traduction affecte les cellules tumorales de deux façons différentes. Tout d'abord, étant donné que la synthèse protéique est un processus hautement coûteux en énergie, une inhibition de la traduction des ARNm stimule la survie cellulaire via une conservation de l'énergie pour des processus plus essentiels. Deuxièmement, le contrôle de la traduction des ARNm est un moyen supplémentaire de contrôler l'expression protéique. Le contrôle de la traduction serait donc un moyen rapide pour modifier le protéome cellulaire (Wouters et al, 2005). L'inhibition de la traduction fait intervenir deux voies de signalisation principales, l'activation de la voie UPR (unfolded protein response) et l'inhibition de la signalisation via mTOR.

1.4.1) Activation de la voie UPR

Le réticulum endoplasmique (RE) est le lieu de synthèse et de maturation protéique pour les protéines membranaires et les protéines destinées à la voie sécrétoire. En cas de stress au niveau du RE affectant l'habilité ou la capacité à maturer les protéines, des protéines non ou mal repliées vont s'accumuler et activer un programme du nom de « unfolded protein response » ou UPR, dont le but est de restaurer l'homéostasie au niveau du RE, et si cela n'est pas possible, d'induire la mort cellulaire (figure 1.8) (Wouters & Koritzinsky, 2008). Parmi les conditions capables d'activer la voie UPR, on retrouve en plus des changements dans la glycosylation, le statut redox, la disponibilité en sucre et la charge en protéines sécrétoires, l'hypoxie (Zhang & Kaufman, 2006). L'activation par l'hypoxie des senseurs de stress au niveau du RE suggère fortement qu'un manque en oxygène perturbe l'homéostasie du RE (Koumenis, 2002 ; Romero-Ramirez, 2004). L'oxygène pourrait en effet intervenir dans diverses étapes de la maturation protéique telles que les différentes étapes de modifications des oligosaccharides, la formation de ponts disulfures, l'isomérisation, les contrôles de qualité et l'exportation. De plus, l'hypoxie est également associée à certains stress pouvant provoquer l'activation de la voie UPR tels que le manque en glucose et en acides aminés, ainsi que le stress oxydatif (Zhang & Kaufman, 2006).

La voie UPR est initiée par 3 senseurs de stress différents au niveau du RE, il s'agit des protéines PERK (PKR-like ER protein kinase), IRE1 (inositol requiring enzyme 1) et ATF6 (activating transcription factor 6). En conditions normales, ces protéines membranaires sont inhibées par la liaison au niveau de leur domaine luminal d'une chaperonne du nom de BiP (ou HSPA5, heat shock 70kDa protein 5). Lorsque des protéines mal repliées s'accumulent, BiP est libérée afin de promouvoir le repliement protéique. En conséquence, chacun des 3 senseurs va activer une partie distincte de la voie UPR, amenant à une diminution globale de la traduction protéique, ainsi qu'à l'activation transcriptionnelle de gènes cibles (Bertolotti et al., 2000 ; Liu et al., 2003).

Lors de son activation, PERK est activée par autophosphorylation, et est alors responsable de la phosphorylation et de l'inhibition de eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α), qui avec le GTP et le Met-tRNA fait partie du complexe ternaire de la traduction. Lors de l'initiation de la traduction, eIF5 stimule l'hydrolyse du GTP lié à eIF2, en GDP. Celle-ci est en effet nécessaire pour la libération des différents facteurs d'initiation de la traduction du

ribosome. Lors d'une nouvelle traduction, pour qu'un nouveau ribosome puisse être chargé au niveau de l'ARNm, il est nécessaire que le GDP lié à eIF2 α soit remplacé par du GTP. Cet échange est catalysé par le facteur d'initiation eIF2B. Or, si eIF2 α est phosphorylé au niveau de la ser51, comme c'est le cas lors de l'activation de PERK, cet échange est rendu impossible et eIF2B reste lié au complexe eIF2 qui est inactif (Koumenis & Wouters, 2006). La phosphorylation de eIF2, qui résulte en une inhibition générale de la traduction, permet néanmoins l'augmentation spécifique de la traduction de certains ARNm, comme c'est le cas pour le facteur de transcription ATF4. Au niveau de la séquence 5' UTR (untranslated region) de celui-ci deux ORF (open reading frame) sont présentes, ce qui empêche une traduction efficace en conditions normales. En effet, seule une initiation au niveau de la première ORF permet la synthèse d'une protéine fonctionnelle. Lorsque la disponibilité en eIF2 α non-phosphorylé diminue, la probabilité d'initiation au niveau de la seconde ORF se retrouve diminuée également, ce qui augmente les chances d'initiation au niveau de la première et donc la synthèse d'une protéine fonctionnelle (Vattem et al., 2004 ; Lu et al., 2004). ATF4 est un facteur de transcription important, surexprimé dans certains cancers (Ameri et al., 2004), et qui semble être nécessaire dans la tolérance à l'hypoxie, notamment par rapport au stress oxydatif (Bi et al., 2005 ; Harding et al., 2003).

L'hypoxie semble également activer les deux autres voies de la réponse UPR. En effet, lors de stress au niveau du RE, mais également en hypoxie, ATF6 est activé et clivé en un fragment de plus petite taille, qui est libéré du RE. Cette forme clivée d'ATF6 transloque alors dans le noyau où elle agit en tant que facteur de transcription (Wouters et al., 2005). Enfin, en ce qui concerne la voie initiée par IRE1, il a été montré également que celle-ci est activée de manière importante en hypoxie. Quand il est activé, IRE1 possède une activité de nucléase qui permet le clivage de 26 bases au niveau des transcrits codant pour XBP1 (x-box binding protein 1), ce qui permet la synthèse d'un facteur de transcription beaucoup plus puissant, comparé à celui obtenu à partir du transcrit non-épissé. XBP1 permet l'expression de toute une série de transcrits possédant, au niveau de leur promoteur, un élément de réponse au stress du RE. Parmi ces gènes, on retrouve BiP et PDI (protein disulfide isomerase), qui sont également induits en hypoxie (Romero-Ramirez et al., 2004).

1.4.2) Inhibition de mTOR

L'hypoxie peut empêcher l'initiation de la traduction protéique de deux façons différentes, en interférant avec la formation des complexes ternaires eIF2/GTP/Met-tRNA, comme cela a été expliqué ci-dessus, mais également en empêchant le recrutement du ribosome sur l'ARNm via une inhibition du facteur d'initiation eIF4F. En effet, la plupart des traductions protéiques sont dépendantes de la présence d'une coiffe à l'extrémité 5' des ARNm et à la mise en place au niveau de celle-ci d'un facteur initiateur du nom de eIF4F. Celui-ci est composé d'une protéine liant la coiffe eIF4E, d'une protéine « échafaudage » eIF4G et d'une RNA helicase eIF4A. La formation de ce facteur d'initiation est fortement soumise à régulation. En effet, l'assemblage de eIF4F est inhibé par un ensemble de protéines liant eIF4E que sont les protéines 4E-BP1, 2 et 3. Ces protéines réalisent leur action inhibitrice en se liant à eIF4E et donc en empêchant celle de eIF4G. En conditions normales de croissance, les protéines inhibitrices 4E-BP sont inhibées par phosphorylation par la protéine mTOR (mammalian target of rapamycin). Celle-ci est également responsable, dans les mêmes conditions, de la phosphorylation de la kinase SK6 (S6 kinase), impliquée dans la traduction des ARNm codant pour des éléments de la machinerie traductionnelle. La protéine mTOR est située en aval de différentes voies notamment impliquées dans la perception des nutriments (Raptor), des facteurs de croissance (PI3K (phosphoinositide-3 kinase)) et du statut énergétique (AMPK). Ces différentes voies convergent vers le complexe protéique TSC1/ TSC2 (tuberous sclerosis

complex) qui est directement responsable, une fois activé, de l'inhibition de mTOR. En cas de stress énergétique ou de manque en nutriments ou en facteurs de croissance, mTOR est inhibée. La traduction dépendante de la coiffe ne peut donc plus se réaliser. L'hypoxie en tant que facteur de stress est capable de jouer sur l'activité de mTOR et cela de plusieurs manières. Parmi celles-ci, on retrouve l'activation d'AMPK et l'expression, induite par HIF, de REDD1, lesquelles sont capable d'activer TSC1/TSC2 et donc d'inhiber mTOR et la traduction protéique. Malgré cette inhibition générale, certaines protéines sont néanmoins traduites de manière sélective, grâce à la présence d'une séquence IRES (internal ribosome entry site) au niveau de leur UTR. Celle-ci permet une traduction indépendante de la coiffe. Parmi les gènes qui possèdent une séquence IRES, on peut citer par exemple le VEGF, HIF-1 α ou encore la protéine chaperonne BiP. En termes de cinétique d'inhibition, il semble que l'inhibition par l'hypoxie de mTOR et donc l'hypo-phosphorylation des protéines 4E-BP surviennent principalement lors d'expositions à des conditions hypoxiques longues, après l'inhibition de eIF2 par PERK qui survient beaucoup plus rapidement (figure 1.9) (Wouters et al., 2005 ; Wouters & Koritzinsky, 2008).

2) L'apoptose

2.1) Définition de l'apoptose

Afin de permettre le développement et le maintien des systèmes biologiques multicellulaires, une interaction et un dialogue entre les cellules les composant sont indispensables. Au cours du développement, certaines cellules sont produites en excès, et subissent alors ce qu'on appelle une « mort cellulaire programmée » ou apoptose. Celle-ci, en plus de se dérouler de façon normale au cours du développement et du vieillissement dans le but d'assurer une homéostasie tissulaire, constitue également un mécanisme de défense. Elle intervient en effet au cours des réactions immunitaires, ou lorsqu'une cellule est endommagée par une maladie ou un agent nocif pour éliminer cette cellule potentiellement dangereuse pour l'organisme. L'apoptose peut être induite par une grande variété de stimuli et de conditions, à la fois physiologiques et pathologiques. Cependant, toutes les cellules ne vont pas nécessairement mourir en réponse au même stimulus. Des défauts au sein du processus apoptotique peuvent entraîner cancers, maladies auto-immunes et propagation d'infections virales. A l'inverse, désordres neurodégénératifs, SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) et maladies ischémiques peuvent être causés ou aggravés par une apoptose excessive (Gewies, 2003).

D'un point de vue morphologique, l'apoptose possède un certain nombre de caractéristiques qui de façon générale sont toujours présentes, et utilisées comme marqueurs de ce type de mort cellulaire. Au sein d'une population, l'apoptose peut néanmoins se dérouler de façon asynchrone, cela étant principalement dû à des variations dans la durée de la phase d'initiation. Au cours de celle-ci, un stimulus pro-apoptotique est intégré et active la machinerie apoptotique. La phase d'initiation est suivie par les phases d'intégration et d'exécution. C'est uniquement à partir de cette dernière phase que les marqueurs morphologiques deviennent apparents. Ces marqueurs morphologiques sont dans un premier temps le rétrécissement de la cellule et du noyau, ainsi que la condensation de la chromatine (pycnose) en différentes masses fortement délimitées et situées contre l'enveloppe nucléaire. Plus tard, le noyau va se condenser, puis finir par se fragmenter (caryorexie). Les cellules se détachent alors progressivement du tissu environnant et des extensions apparaissent au niveau de leur membrane. C'est à partir de ces extensions que la cellule va bourgeonner en structures compactes, entourées d'une membrane, du nom de corps apoptotiques. Ceux-ci contiennent du cytosol, de la chromatine, et des organites dont l'intégrité est souvent préservée. Les corps

apoptotiques, une fois libérés, vont être rapidement phagocytés par des cellules environnantes telles que des macrophages et des cellules parenchymateuses. Etant donné qu'en aucun cas l'intégrité membranaire n'est altérée, et que jamais le contenu du cytosol ne se retrouve dans le tissu environnant, ce processus va se dérouler sans induire d'inflammation. Ces caractéristiques morphologiques sont la conséquence d'événements moléculaires et biochimiques se déroulant au sein de la cellule en apoptose. Parmi ceux-ci, le plus important est l'activation d'enzymes protéolytiques, intervenant directement ou indirectement dans le clivage de l'ADN (au niveau des régions inter-nucléosomales), ainsi que celui de multiples substrats protéiques spécifiques nécessaires à l'intégrité et à la forme du cytoplasme et des organelles (Gewies, 2003 ; Elmore, 2007 ; Saraste & Pulkki, 2000).

L'apoptose est souvent comparée à un second type de mort cellulaire qu'est la nécrose (figure 1.10). En effet, ces deux types de mort possèdent malgré des différences importantes, certaines caractéristiques communes. Au cours de la nécrose, après le gonflement cellulaire et la disruption progressive des différents organites, l'intégrité de la membrane plasmique est perdue et le contenu du cytoplasme déversé dans le milieu environnant. Cette libération induit des dommages aux cellules situées à proximité ainsi que l'initiation d'une forte inflammation (Gewies, 2003). Face à un stimulus pro-apoptotique, la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose va dépendre essentiellement de la nature et de l'intensité du stimulus pro-apoptotique, du contenu énergétique, du type de tissu, de son stade de développement, et du milieu physiologique. L'ensemble de ces éléments déterminera finalement si oui ou non la mort cellulaire impliquera l'activation d'enzymes protéolytiques spécifiques du nom de caspases, lesquelles sont centrales dans le processus de mort cellulaire par apoptose (Saraste & Pulkki, 2000).

2.2) Les caspases : protéases de la voie apoptotique

Lors d'une mort cellulaire par apoptose, une famille spécifique de protéases est directement impliquée, il s'agit des caspases (cysteine-dependent aspartate-specific proteases). Comme leur nom l'indique, leur activité catalytique dépend d'un résidu cystéine, situé dans une partie hautement conservée de leur site actif. De plus, elles clivent spécifiquement leur substrat après un résidu aspartate, les 4 résidus situés côté N-terminal de celui-ci intervenant dans la spécificité de substrat. Chez les mammifères, 14 caspases différentes ont été identifiées et décrites. Parmi celles-ci, les caspases -1, -4, -5, -11 et -12 sont impliquées dans la maturation protéolytique de cytokines pro-inflammatoires telles que la pro-IL-1 β et la pro-IL-8. Par contre, les caspases -2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10 interviennent dans la voie apoptotique, et seront les seules décrites par la suite (figure 1.11).

Les caspases sont synthétisées sous forme de procaspases ou zymogènes (figure 1.12). Elles sont alors composées d'un prodomaine, d'une grande et d'une petite sous-unités, pouvant être séparées par un peptide linker lequel possède alors un résidu aspartate à chacune de ses extrémités. Lors de leur activation, un clivage protéolytique est réalisé entre la grande et la petite sous-unités, qui deviennent alors indépendantes. Le plus souvent, le prodomaine est également clivé, mais ce n'est pas toujours le cas. Les caspases actives sont présentes sous forme d'un hétéro-tétramère, composé de deux grandes et deux petites sous-unités.

Les procaspases peuvent être classées en deux groupes distincts selon leur site d'action au sein de la cascade apoptotique, celui des procaspases initiatrices (procaspases-2, -8, -9 et -10), et celui des procaspases effectrices (procaspases-3, -6 et -7). Les procaspases initiatrices, contrairement aux effectrices, possèdent un long prodomaine au niveau duquel est (sont) situé(s) un (ou deux) module(s) permettant leur interaction avec des protéines activatrices.

Deux types de modules peuvent être présents (figure 1.11), le module DED (death effector domain) qu'on retrouve chez les procaspases-8 et -10 et le module CARD (caspase recruitment domain) présent chez les procaspases-2 et -9. Cette différence est corrélée au type de voie à laquelle ces caspases appartiennent. En effet, les procaspases-8 et -10 sont activées en réponse à une stimulation de la voie extrinsèque de l'apoptose, alors que les procaspases-2 et -9 le sont suite à l'activation de la voie intrinsèque mitochondriale. Ces deux voies seront décrites respectivement aux points 2.3 et 2.4.

L'activation des procaspases initiateuses est différente de celle des effectrices. Alors que ces dernières sont clivées par des caspases initiateuses activées, situées en amont, les caspases initiateuses n'ayant pas de protéases « au-dessus » d'elles, doivent répondre au signal activateur d'une autre manière. Cette activation va se faire grâce à leur recrutement au niveau de plateformes d'activation oligomériques (DISC, death-inducing signaling complex ; apoptosome ; ...) qui s'assemblent en réponse à un stimulus apoptotique (figure 1.13). Grâce à cela, la concentration locale en caspases se retrouve augmentée, ce qui permet l'activation mutuelle des différentes procaspases dont l'activité protéasique intrinsèque est suffisante pour le clivage dans ces conditions. L'activation de la caspase-9, en plus de nécessiter une augmentation de la concentration locale en caspases, requiert également de l'ATP, ainsi que la présence d'une protéine cofacteur, Apaf-1, et du cytochrome c.

Une fois les caspases activées, celles-ci vont déclencher, via le clivage d'un grand nombre de substrats cellulaires, la phase d'exécution de l'apoptose. La plupart de ces substrats peuvent être répartis en deux catégories, tout d'abord les régulateurs de l'apoptose qui sont soit activés, soit inhibés par clivage, puis les protéines de structure ou présentes constitutivement dont le clivage est nécessaire pour le désassemblage de la cellule. Une des premières protéines clivées par les caspases est la protéine PARP-1 (poly-(ADP-ribose)-polymerase), qui est une protéine nucléaire impliquée dans la réparation de l'ADN. Une autre protéine rapidement clivée par les caspases actives est ICAD (inhibitor of CAD). Celle-ci est responsable de l'inhibition d'une DNase nucléaire du nom de CAD (caspase-activated DNase), qui une fois libérée, est alors capable de transloquer dans le noyau, où elle est responsable du clivage inter-nucléosomal de l'ADN. Le clivage des lamines nucléaires provoque une rétraction du noyau, et celui de certaines protéines du cytosquelette (fodrine, actine,...) entraîne un réarrangement total de la cellule. Les caspases actives vont également cliver des protéines telles que des kinases, des régulateurs du cycle cellulaire, des facteurs de transcription, ou encore des protéines de signalisation. Elles sont également responsables du clivage de certaines protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-xl, et pro-apoptotiques comme Bid et Bax. Toutes les quatre font partie de la famille Bcl-2 dont les membres ont une importance capitale dans la régulation de l'apoptose (Hengartner, 2000 ; Nunez et al., 1998 ; Pop & Salvesen, 2009 ; Vermeulen et al., 2005 ; Zimmermann et al., 2001).

2.3) La voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque de l'apoptose est activée par la liaison d'un ligand, une cytokine (par exemple FasL, TNF- α (tumor necrosis factor α), TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand)), sur un récepteur de la famille des récepteurs TNF, appelés communément les récepteurs de mort. Au sein de cette famille, on retrouve notamment les récepteurs TNFR1, Fas (CD95), ainsi que le récepteur TRAIL. Ces récepteurs sont présents initialement sous forme de trimères pré-associés, association qui est renforcée et stabilisée suite à la liaison d'un ligand. Ceux-ci possèdent au niveau de leur domaine intracellulaire, un domaine d'interaction du nom de domaine de mort ou DD (death domain). Ceux-ci sont essentiels afin

de transmettre le signal de la membrane vers les voies de signalisation intracellulaires. En effet, ces domaines permettent, une fois le récepteur activé, le recrutement de protéines adaptatrices via une interaction homotypique des domaines DD, présents également sur ces protéines. Une des principales protéines adaptatrices recrutées est la protéine FADD (Fas-associated death domain). Celle-ci interagit soit directement avec le récepteur de mort via son DD (lors de la liaison de FasL sur FasR), soit de façon indirecte par l'intermédiaire de la protéine TRADD (TNFR- α associated death domain) (lors de la liaison de TNF α sur TNFR1). FADD, en plus de son DD, possède un second domaine d'interaction protéique, le domaine DED (death effector domain). Celui-ci permet le recrutement au niveau du récepteur de la procaspase-8 (ou -10) et donc la formation du complexe DISC. Une fois formé, le complexe DISC stimule l'activation auto-catalytique des caspases initiateuses comme cela a été expliqué au point 2.2. Cependant, en fonction du type cellulaire, la formation des complexes DISC et donc l'activation des caspases-8 (-10) peuvent ou non être suffisantes pour induire l'apoptose. Dans les cellules dites de type I (thymocytes, lymphocytes T,...), un grand nombre de caspases-8 (-10) sont activées, lesquelles sont capables à elles seules d'activer des caspases effectrices telles que la caspase-3 et donc d'induire *in fine* l'apoptose. Par contre, dans les cellules dites de type II (hépatocytes,...), peu de complexes DISC sont formés en présence de signaux pro-apoptotiques et donc, trop peu de caspases-8 (et -10) sont activées pour induire l'apoptose. Celle-ci requiert alors l'intervention d'une protéine du nom de Bid, qui une fois clivée par la caspase-8 en tBid, se lie au niveau de la membrane mitochondriale externe dont elle stimule la perméabilisation, provoquant ainsi la libération de facteurs pro-apoptotiques (figure 1.14) (Gewies, 2003 ; Peter & Krammer, 2003 ; Khosravi-Far & Esposti ; 2004).

2.4) La voie intrinsèque de l'apoptose

2.4.1) Mécanisme général de la voie d'apoptose mitochondriale

En plus d'intervenir dans la voie extrinsèque d'apoptose et d'amplifier celle-ci, la mitochondrie joue un rôle central dans l'intégration et la propagation de divers signaux de mort non-médiés par des récepteurs, tels que des dommages à l'ADN, des stress oxydatifs, un manque en facteurs de croissance, hormones ou cytokines, ainsi que des signaux induits par des drogues chimiothérapeutiques (Gewies, 2003).

Ces différentes conditions stimulatrices d'apoptose induisent le plus souvent une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$), ainsi qu'une augmentation de la perméabilité membranaire aux solutés de faible poids moléculaire. Il s'ensuit la libération de protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire dans le cytosol. Parmi les protéines libérées, on retrouve le cytochrome c, la protéine activatrice d'apoptose AIF (apoptosis-inducing factor), l'endonucléase G, la protéine CAD, ainsi que les protéines Smac/Diablo et Htr-2/Omi. Cependant, cette explication « classique » de l'ouverture du pore PTP (permeability transition pore) ne permet pas d'expliquer pourquoi, dans certains cas, le gonflement mitochondrial n'a pas lieu, et pourquoi parfois le $\Delta\psi_m$ n'est pas perdu avant la libération du cytochrome c dans le cytosol (Gewies, 2003 ; Henry-Mowatt et al., 2004).

Une fois le cytochrome c libéré dans le cytosol, celui-ci va permettre la mise en place d'un complexe protéique du nom d'apoptosome. Celui-ci, en plus de molécules de cytochrome c, contient des protéines Apaf-1, du dATP/ATP servant de cofacteur, et enfin des procaspases-9 qui seront activées une fois recrutées. En présence de dATP/ATP, le cytochrome c et la protéine Apaf-1 vont s'associer afin de former une structure heptamérique circulaire appelée apoptosome. Les protéines Apaf-1 possédant un domaine d'interaction CARD, elles vont pouvoir interagir avec les prodomaines de caspases-9 encore inactives. Comme expliqué

précédemment, le rapprochement de plusieurs procaspases-9 va permettre leur auto-activation. Une fois activées, les caspases-9, toujours au sein de l'apoptosome, vont permettre l'activation par clivage protéolytique de procaspases effectrices (les procaspases-3, -6 et -7) qui vont déclencher, une fois activées, la voie d'exécution de l'apoptose (Bao & Shi, 2007).

Les protéines Smac/Diablo et HtrA2/Omi, libérées de l'espace intermembranaire mitochondrial en même temps que le cytochrome c, stimulent l'apoptose en inhibant les protéines IAP (inhibitor of apoptosis protein). Ces dernières, via leur liaison au niveau de caspases actives, sont responsables d'une régulation négative de l'apoptose. Les protéines AIF, endonucléase G et CAD, trois nucléases, sont libérées quant à elles de la mitochondrie plus tardivement. Une fois libérées, AIF et l'endonucléase G transloquent au niveau nucléaire où elles sont responsables de clivages de l'ADN. Alors qu'AIF et l'endonucléase G sont indépendantes des caspases, CAD nécessite, pour être active, le clivage par la caspase-3 de son inhibiteur ICAD (figure 1.15).

2.4.2) Les protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 (figure 1.16) sont des protéines clés dans la régulation la voie intrinsèque mitochondriale d'apoptose. Elles peuvent être réparties en 3 groupes distincts en fonction, tout d'abord, de leur action pro- ou anti-apoptotique, et ensuite, de leurs caractéristiques structurales. Etant donné que les protéines pro- et anti-apoptotiques sont capables d'homo- et d'hétérodimériser les unes avec les autres, il semble que le rapport de leur abondance respective détermine la susceptibilité d'une cellule à un stimulus apoptotique (Adams & Cory, 1998 ; Adams & Cory, 2001 ; Giam et al., 2008).

Le premier groupe renferme des protéines telles que Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w ou encore Mcl-1 et A1, qui exercent toutes une action anti-apoptotique. En effet, lorsqu'elles sont surexprimées, elles empêchent la libération du cytochrome c et donc l'initiation de l'apoptose. Toutes possèdent une structure tridimensionnelle similaire. Elles sont composées de 4 domaines conservés, les domaines BH1, BH2, BH3 et BH4. Les trois premiers domaines permettent la formation d'une boucle hydrophobe à la surface de la protéine. C'est via celle-ci que se fera l'interaction avec le domaine BH3 de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, les protéines des différents groupes étant en effet capables d'hétérodimériser.

Les protéines Bax, Bak et Bok composent le deuxième groupe de protéines de la famille Bcl-2. Toutes les trois sont des protéines pro-apoptotiques. D'un point de vue structural, elles sont composées des trois premiers domaines BH, et ont donc une structure 3D très similaire à celle des protéines anti-apoptotiques de type Bcl-2. Il a été montré que Bax et Bak sont essentielles pour l'induction de dommages au niveau des mitochondries et pour la libération du cytochrome c dans le cytoplasme. Celle-ci n'est en effet pas observée lorsque ces deux protéines ne sont pas exprimées (Lindsten et al., 2000). Bax et Bak sont donc les effecteurs principaux de la voie intrinsèque d'apoptose. Une fois activées, ces protéines stimulent la perméabilisation mitochondriale et la libération dans le cytosol des protéines pro-apoptotiques, amenant à l'activation des caspases. Il semble également qu'*in vivo* leur action soit, dans la plupart des cas, redondante. Malgré cela, leur localisation subcellulaire au sein de cellules normales diffère. Bak est une protéine membranaire présente dans la membrane mitochondriale externe, alors que Bax est principalement cytosolique avant d'être activée. Cela s'explique par le fait qu'en conditions normales, son domaine d'ancrage membranaire, présent à l'extrémité C-terminale, est enfermé dans une poche hydrophobe. Une étape supplémentaire d'activation est donc nécessaire pour permettre sa libération et la translocation de Bax dans la mitochondrie où a lieu son oligomérisation. L'activation de Bax pourrait être

causée par une augmentation transitoire du pH ou par la protéine Bid, décrite précédemment comme le lien entre les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. Bok, la troisième protéine de ce groupe, n'a encore été que peu étudiée. Il n'a donc pas encore été clairement défini si celle-ci pourrait ou non compenser l'absence de Bax ou Bak dans certains types cellulaires.

Le troisième groupe est également composé de protéines pro-apoptotiques, mais qui structurellement sont très différentes des protéines des deux premiers groupes. En effet, celles-ci ne possèdent, parmi les domaines BH, que le troisième ; c'est pourquoi elles portent le nom de protéines BH3-only. Les plus connues parmi celles-ci sont Bad, Bid, Bik, Bim, Puma et Noxa. Lorsque ces protéines sont surexprimées, l'apoptose est induite à condition que les protéines Bax ou Bak soient présentes. Les protéines BH3-only agissent donc, au sein de la cascade apoptotique, en amont des protéines Bax et Bak.

Individuellement, ces différentes protéines sont activées par des stimuli apoptotiques distincts. Par exemple, l'expression de Puma et Noxa, gènes cibles de p53, est augmentée en cas de dommages à l'ADN. Bim par contre, est activée en cas de stress UV, de privation en cytokines ou d'une concentration trop élevée en calcium (Puthalakath & Stasser, 2002 ; Coultas & Stasser, 2003). Cette activation se réalise de deux manières. Tout d'abord, via une augmentation d'expression. En effet, le promoteur de Bim est régulé par différents facteurs de transcription dépendants de stress, tels que certains facteurs de transcription des familles FOXO et AP-1 (Hübner et al, 2008). Le second mécanisme de régulation de Bim est la modification covalente par phosphorylation de certaines de ses isoformes. Les transcrits du gène Bim, lors de leur maturation, subissent en effet un épissage alternatif qui permet, lors de la traduction, la synthèse de trois isoformes distinctes, BimEL, BimL et BimS (figure 1.17). Seules les deux premières isoformes subissent des phosphorylations. En cas de stress, la kinase JNK (Jun N-terminal kinase) est responsable de la phosphorylation de BimL (Thr 56) et de Bim EL (Thr 112). Celle-ci stimule leur libération du réseau microtubulaire où elles sont séquestrées par l'intermédiaire de la protéine DLC1 (dynein light chain 1). BimEL, qui est l'isoforme majoritaire, est régulée également en condition normale. En effet, en présence de facteurs de croissance, la kinase ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2) est activée et phosphoryle BimEL au niveau de plusieurs de ses résidus, principalement des sérines. Ces phosphorylations ont pour effet de diriger Bim vers la dégradation protéasomale. Une deuxième protéine BH3-only à être régulée post-traductionnellement est la protéine Bid. Celle-ci est clivée par la caspase-8 en tBid lors de l'activation de la voie intrinsèque d'apoptose, et est alors capable de s'insérer dans la membrane mitochondriale externe. Enfin, Bad, qui, en présence de facteurs de croissance, est phosphorylée et séquestrée par la protéine 14-3-3, s'accumule sous forme déphosphorylée ou est déphosphorylée activement lorsque ceux-ci manquent (figure 1.18) (Hübner et al., 2008 ; Puthalakath & Stasser, 2002 ; Ewings et al., 2007).

Une fois activées, les protéines BH3-only entraînent une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, soit via l'inhibition de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl2, soit via l'activation de protéines pro-apoptotiques de cette famille comme Bax et Bak. Alors que Bim, Bid et Puma sont capables de se lier fortement, via leur domaine BH3, à toutes les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sans exception, les autres ont un répertoire plus limité. Bad par exemple lie une fois activée, uniquement les protéines Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w. A l'opposé, Noxa est capable d'inhiber uniquement Mcl-1 et A1. Deux théories différentes ont été proposées pour expliquer l'activation des protéines Bax et Bak par les protéines BH3-only en réponse à un stimulus pro-apoptotique (figure 1.19). La première est la théorie de l'activation directe. Selon celle-ci, certaines protéines BH3-only nommées « effectrices » sont

capables d'interagir directement avec Bax et Bak et d'activer celles-ci (figure 1.20). Parmi ces effectrices, on retrouve Bim, Bid et Puma. Les autres sont nommées « sensibilisatrices ». En effet, dans une cellule saine, l'action des effectrices est inhibée, celles-ci étant pour la plupart séquestrées par des protéines anti-apoptotiques de type Bcl-2. Certaines comme Bim et Bad, sont retenues également au niveau d'éléments du cytosquelette comme c'est le cas pour Bim, ou encore par d'autres protéines telles que la protéine 14-3-3 responsable de la séquestration de Bad. Lorsqu'un stimulus pro-apoptotique est présent, les sensibilisatrices sont activées, lient les protéines anti-apoptotiques, ce qui libère les effectrices qui peuvent alors activer Bax et Bak. La seconde théorie est celle de l'activation indirecte. Selon celle-ci, les protéines Bax et Bak sont maintenues inactives via une interaction avec des protéines anti-apoptotiques, et les protéines BH3-only activent celles-ci en neutralisant ces dernières. Il n'y a donc aucun contact direct entre Bax et Bak et les protéines BH3-only (Hengartner, 2000 ; Giam et al., 2008).

2.4.3) Régulation de la perméabilité mitochondriale par les protéines Bcl-2

Dans la voie intrinsèque de l'apoptose, une partie encore fort soumise à controverse est le mécanisme de libération du cytochrome c de la mitochondrie. Malgré cela, il est néanmoins évident que les protéines de la famille Bcl-2, spécialement Bax et Bak, jouent un rôle essentiel dans celle-ci. Cependant, pour ce faire, Bax et Bak doivent être présentes au niveau de la membrane mitochondriale, premier obstacle pour Bax qui doit donc transloquer à partir du cytoplasme où elle est présente en conditions basales. La protéine Bak a également besoin, malgré le fait qu'elle soit présente en membrane mitochondriale, d'être activée pour pouvoir augmenter la perméabilité mitochondriale.

Une fois les protéines Bax et Bak activées, celles-ci vont alors pouvoir agir sur la perméabilité mitochondriale. Plusieurs hypothèses différentes concernant l'implication des protéines Bcl-2 dans la libération du cytochrome c ont été proposées, mais aucune n'a encore été approuvée définitivement (figure 1.21) (Hengartner, 2000 ; Adams & Cory, 2001 ; Chipuk & Green, 2008).

La première hypothèse est la formation, par les protéines Bax et Bak, de canaux facilitant le transport protéique. En effet, il a été montré que ces deux protéines sont capables, après avoir subi un changement conformationnel, de s'insérer en membrane où une oligomérisation a lieu, amenant à la formation de canaux (Reed et al., 1997 ; Dewson et al., 2008). Cependant, il n'a pas encore pu être défini si ceux-ci sont de taille suffisante pour permettre le passage de protéines.

La deuxième hypothèse est qu'au lieu de former des pores par eux-mêmes, Bax et Bak pourraient stabiliser ou perturber des canaux préexistants, rendant alors possible le passage de protéines au travers de ceux-ci. Les canaux avec lesquels ces protéines seraient capables d'interagir, interviennent en situation normale dans le transport d'ADP/ATP et de petites molécules. Ils forment ce qui a été appelé le pore PTP (permeability transition pore), présent aux endroits de contacts entre membranes mitochondriales interne et externe. Ses principaux composants seraient le canal ionique voltage dépendant VDAC (voltage-dependent anion channel), situé dans la membrane mitochondriale externe, le transporteur d'ADP/ATP du nom d'ANT (adenine nucleotide transporter), situé dans la membrane mitochondriale interne, ainsi que la cyclophiline D, qui est une protéine matricielle. Plusieurs études ont montré que des protéines de la famille Bcl-2 sont capables d'interagir avec certains des composants de ce PTP. En effet, des protéines telles que Bax et Bak, mais également Bcl-xL sont capables de lier VDAC, et de réguler celui-ci de manière positive pour Bax et Bak et négative pour Bcl-xL. La liaison des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 induirait un changement conformationnel de VDAC, dont la taille deviendrait alors suffisante pour le passage de

protéines, ce qui n'est pas le cas en situation normale (Shimizu et al, 1999). L'interaction de Bax avec ANT a également été démontrée, cependant, pour avoir lieu, celle-ci nécessiterait une disruption préalable de la membrane mitochondriale externe (Marzo et al, 1998).

Selon la troisième et dernière hypothèse, Bax et Bak seraient capables d'induire une rupture de la membrane mitochondriale externe, suite à laquelle les protéines de l'espace intermembranaire seraient alors libérées dans le cytosol.

Quelle que soit l'hypothèse, les membres de la famille Bcl-2 seraient donc capables de contrôler l'homéostasie de la mitochondrie. L'homéostasie pourrait être influencée par ceux-ci, soit directement (via la création d'un canal ionique, cf. hypothèse 1), soit indirectement via la modulation d'autres protéines mitochondriales telles que le canal VDAC.

2.4.4) L'apoptose induite par des dommages à l'ADN : importance de la protéine p53

En cas de dommages à l'ADN, différentes réponses cellulaires peuvent être induites. Parmi ces réponses, la première est un arrêt du cycle cellulaire, afin de permettre, si c'est possible, une réparation des dommages avant que les mutations ne se perpétuent. Cependant, si les dommages sont trop importants, ceux-ci vont induire la mort de la cellule par apoptose, toujours dans le but d'éviter la propagation de chromosomes endommagés. La protéine clé, essentielle à ces réponses est la protéine p53, souvent appelée gardien du génome. Elle joue en effet un rôle critique dans la prévention du développement tumoral. Environ la moitié des cancers comporte des mutations au niveau de p53. De plus, un grand nombre de tumeurs dans lesquelles p53 est non-mutée, sont néanmoins déficientes dans leur capacité à activer p53 (Enoch & Norbury, 1995 ; Ryan et al., 2001).

En cas de dommages à l'ADN, ceux-ci sont perçus par des senseurs, les protéines de la famille ATR (ataxia telangiectasia Rad3 related)/ATM (ataxia telangiectasia mutated), ainsi que la kinase DNA-PK (DNA-dependent protein kinase). En cas de blocage de la fourche de réplication ou de dommages induits par des UV, le senseur ATR est activé. Par contre, lorsqu'il s'agit de cassures doubles brins, causées par exemple par des chimiothérapies, ATM ainsi que DNA-PK sont recrutées et activées. Cette activation permet la phosphorylation par ces kinases de l'histone H2AX, qui devient alors capable de recruter, au niveau de l'ADN endommagé, différents médiateurs qui seront à leur tour phosphorylés. Ces médiateurs, parmi lesquels on retrouve 53BP1 (p53 binding protein 1), BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1) et MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1), vont permettre l'activation d'un « transducer » comme Chk2 (checkpoint kinase 2). Lorsque la perception des dommages se fait via ATR, les différents médiateurs recrutés activent en général un autre « transducer », Chk1. Ces kinases sont responsables de l'activation de différentes protéines effectrices dont p53. Elles peuvent phosphoryler p53 sur différents résidus entraînant sa stabilisation, en empêchant son interaction avec MDM2 (mouse double minute 2), ainsi qu'une augmentation de son activité. En conditions normales, p53 est reconnue par MDM2 qui va, via une polyubiquitination, diriger p53 vers la voie de dégradation protéasomale (figure 1.22) (Roos & Kaina, 2006 ; Norbury & Zhivotovsky, 2004 ; Yang et al., 2003).

L'activation de p53 peut induire différentes réponses, telles que la différenciation, la sénescence, l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN, mais également l'apoptose. Ces différents effets sont principalement réalisés via l'activation ou la répression de différents gènes par p53, qui est un facteur de transcription. Parmi les gènes cibles de p53, on retrouve un grand nombre de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'apoptose, comme c'est le cas notamment pour les protéines de la famille Bcl-2 Bax, Noxa et Puma, ou encore les récepteurs de mort de la voie extrinsèque Fas et DR5. Etant donné que l'activité transcriptionnelle de p53 dépend de sa localisation nucléaire, celle-ci va donc être régulée.

Alors que l'importation implique un transport actif de p53 via le réseau microtubulaire et la présence d'une séquence NLS (nuclear localisation sequence), l'exportation nécessite en plus d'une séquence NES (nuclear export sequence), l'intervention de MDM2. Tout comme p53, MDM2 est capable de passer du cytosol au noyau, où via une mono-ubiquitinylation de p53, elle stimule son exportation et sa dégradation subséquente dans le cytosol (figure 1.23) (Ryan et al, 2001).

Malgré l'importance de son activité transcriptionnelle, p53 peut induire certains de ces effets, notamment l'apoptose, indépendamment de l'activation ou de la répression de l'expression de gènes cibles. Par exemple, p53 est capable d'agir directement, en réponse à un signal de stress, sur la mitochondrie. Il a été montré qu'une fois activée, p53 transloque au niveau de la membrane mitochondriale externe où elle interagit avec des membres anti- (Bcl-2, Bcl-xL,...) et pro-apoptotiques (Bax) de la famille Bcl-2, et cela dans le but de modifier la perméabilité mitochondriale et donc la libération de facteurs pro-apoptotiques (figure 1.24) (Marchenko & Moll, 2007 ; Vaseva & Moll, 2009).

3) Cancer et hypoxie

3.1) Le cancer

Dans les pays développés, le cancer est une des principales causes de mortalité. Le mot cancer désigne une tumeur, c'est-à-dire une prolifération cellulaire anormale, anarchique, inutile, qui ne répond plus aux mécanismes de contrôle. Contrairement aux tumeurs bénignes qui reconstruisent l'architecture du tissu dont elles dérivent, les tumeurs malignes ne font que « tenter de ressembler » à celui-ci, elles en font des caricatures pouvant être plus ou moins ressemblantes. D'un point de vue morphologique, la tumeur maligne est une tumeur sans capsule, mal limitée, qui s'infiltré dans le tissu environnant en détruisant celui-ci. Une autre caractéristique essentielle des tumeurs malignes est leur capacité à se disséminer au sein de l'organisme, à former des métastases. Cependant, avant d'atteindre le stade de métastases, qui est le stade terminal de l'histoire naturelle des cancers, un certain nombre d'étapes doivent être franchies pour permettre tout d'abord la transformation d'une cellule normale, sa prolifération primaire, et ensuite l'acquisition par le clone tumoral ainsi produit d'un phénotype malin. La transformation maligne qui provoquera, si elle arrive à terme, l'obtention d'une tumeur maligne ou cancer, est un processus multi-étapes. Au fur et à mesure de la transformation cancéreuse, différents dommages, aux niveaux génétique et épigénétique, vont s'accumuler. Ils seront responsables de l'apparition progressive de six altérations majeures de la physiologie cellulaire qui, ensemble, permettront le développement d'une tumeur maligne. Ces altérations, qui sont partagées par la majorité des tumeurs, sont une autosuffisance en facteurs de croissance, une insensibilité aux facteurs inhibiteurs de croissance, une résistance à l'apoptose, un potentiel réplicatif illimité, une angiogenèse active, et une capacité d'invasion tissulaire et de métastases (Hanahan et al., 2000).

De plus en plus, des facteurs propres au microenvironnement tumoral sont reconnus comme ayant une importance dans la tumorigenèse, la résistance aux thérapies et la formation de métastases. C'est le cas notamment de l'hypoxie. Il a été montré que les cellules tumorales situées dans des zones hypoxiques sont plus résistantes aux radiothérapies que ne le sont les cellules tumorales prolifératives, situées à proximité des vaisseaux sanguins. Cette résistance s'explique par une diminution de la quantité de ROS, nécessaires pour l'induction des dommages à l'ADN. De plus, ces cellules semblent également plus résistantes aux chimiothérapies (Cosse et al., 2008).

3.2) Les chimiothérapies

Une des principales thérapies utilisées à l'heure actuelle pour le traitement de cancers est la chimiothérapie. Elle consiste en l'utilisation de composés chimiques, dont la majorité agit en induisant un arrêt de la division cellulaire, qui est généralement suivi d'une mort par apoptose. Etant donné que les chimiothérapies affectent le cycle cellulaire, les cellules en division rapide, comme par exemple les cellules tumorales, seront principalement touchées. Néanmoins ce type de traitement n'est pas totalement spécifique étant donné que d'autres cellules de l'organisme, telles que les cellules épithéliales, se divisent également régulièrement et sont donc également touchées, engendrant les effets non-désirés bien connus de ces thérapies. Les chimiothérapies actuelles peuvent être classées en différentes catégories selon leur mode d'action : les agents alkylants, les antimétabolites (ex. : analogues nucléosidiques), les agents du fuseau ou antimitotiques, les inhibiteurs de topoisomérases, ... Deux molécules chimiothérapeutiques seront particulièrement abordées au cours de ce travail, il s'agit du paclitaxel, un inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules du fuseau mitotique, et de l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II.

Le paclitaxel, également appelé taxol, induit, suite à sa liaison au niveau d'hétérodimères de tubuline, une suppression de la dynamique microtubulaire. La conséquence de cette stabilisation est un arrêt du cycle cellulaire en mitose, considéré comme étant la cause de la mort par apoptose des cellules traitées avec cet agent chimiothérapeutique. De plus, le paclitaxel est également responsable de l'induction de différentes voies de signalisation intracellulaires, ainsi que de l'expression de certains gènes, qui vont contribuer à l'induction de l'apoptose. En effet, le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique, l'activation aberrante de kinases dépendantes de cycline et la kinase JNK (Jun N-terminal kinase)/SAPK (stress-activated protein kinase), sont impliqués dans la mort cellulaire induite par le paclitaxel. Parmi les gènes différemment exprimés en présence de paclitaxel, on retrouve certains gènes de la famille Bcl-2 tels que Bcl-xL qui est régulé négativement et Bax et Bak qui sont surexprimés. De plus, en présence de paclitaxel, Bcl-2 est multi-phosphorylé. Le rôle pro- ou anti-apoptotique de ces phosphorylations reste controversé ; néanmoins, il semble que celles-ci augmenteraient plutôt son activité anti-apoptotique (Blagosklonny et al., 1999 ; Wang et al., 2000 ; Deng et al., 2004).

L'étoposide est un inhibiteur de la topoisomérase II. Cette enzyme, contrôlant la topologie de l'ADN, est indispensable lors de la réplication. Elle permet en effet le passage d'une double hélice d'ADN intacte à travers une cassure double brin transitoire. Au cours de ce processus, un complexe intermédiaire est formé ; au sein de celui-ci, chaque sous-unité de la topoisomérase II (enzyme homodimérique) lie une des deux extrémités protrudentes de la cassure double brin venant d'être créée (figure 1.25). L'étoposide agit en stabilisant ce complexe intermédiaire et inhibe donc la capacité de l'enzyme à religuer l'ADN clivé. Etant donné que chaque molécule d'étoposide stabilise uniquement une seule cassure simple brin, des cassures simples ou doubles brins vont être générées en fonction du rapport étoposide : topoisomérase. Ces dommages induisent l'activation des protéines senseurs de dommages de l'ADN ATM/ATR, responsables de l'activation par phosphorylation de p53, puis, si les dommages sont importants, de la mort cellulaire via la voie intrinsèque mitochondriale d'apoptose (voir 2.5) (Montecucco et al., 2007 ; Karpnich et al., 2002).

3.3) Hypoxie et apoptose dans le cancer

3.3.1) L'hypoxie : cause de mort cellulaire par apoptose

Bien que l'hypoxie induise une série de réponses permettant à la cellule de s'adapter et de maintenir un certain niveau énergétique, il arrive que celle-ci soit trop sévère ou trop longue et induise la mort cellulaire par apoptose (Greijer et al., 2004). L'induction de l'apoptose par l'hypoxie se réalise via la voie mitochondriale intrinsèque. Le moyen le plus direct pour l'hypoxie d'induire la perméabilité mitochondriale est l'inhibition de la chaîne de transporteurs d'électrons. En effet, le manque d'oxygène provoque une inhibition du transport de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, et donc une diminution du potentiel mitochondrial. Celle-ci est responsable de l'activation des protéines Bax et Bak qui vont amener à la perméabilisation et à la libération de facteurs tels que le cytochrome c dans le cytosol (Saikumar et al., 1998). De plus, la formation en hypoxie de ROS contribue également à l'induction de l'apoptose. Enfin, l'hypoxie est également capable, dans certains types cellulaires, d'activer la kinase de stress JNK/SAPK (Kunz et al., 2001), laquelle induit l'apoptose notamment suite à l'activation de différentes protéines de la famille Bcl-2 telles que Bim, Bad, Bid, et à l'inactivation de Bcl-2 (Dhanasekaran et al., 2008).

Le facteur de transcription HIF-1 a également son importance dans la mort cellulaire induite en hypoxie qu'il peut induire via deux mécanismes. Tout d'abord, HIF-1 est capable de stabiliser la protéine p53 via une interaction avec l'E3-ubiquitine ligase MDM2, responsable en condition normale de la dégradation de p53 (Chen et al., 2003). HIF-1 peut également se lier directement à p53 elle-même (Hansson et al., 2002). En hypoxie, la stabilisation de p53 se fait en parallèle avec l'accumulation de HIF-1 α , et est strictement dépendante de la présence de celle-ci. Elle n'est en effet pas observée dans les cellules déficientes pour HIF-1 α . Cependant, cette stabilisation n'est pas dépendante de l'activité de transactivation de HIF-1 puisque elle est toujours observée chez des cellules déficientes pour ARNT. La liaison de HIF-1 α à p53, en plus de stabiliser cette dernière, entraîne une inhibition de l'activité transactivatrice de HIF-1. Cette inhibition peut s'expliquer par une compétition entre p53 et HIF-1 pour les coactivateurs p300 et CBP, mais également par une dégradation de HIF-1 α dépendante de MDM2. Ensuite, HIF-1, en induisant l'expression spécifique de gènes pro-apoptotiques comme Bnip3 peut également amener à l'apoptose (figure 1.26) (Greijer et al., 2004 ; Piret et al., 2002 ; Fels & Koumenis, 2005).

3.3.2) L'hypoxie : cause de résistance aux chimiothérapies

Bien que l'hypoxie soit capable dans certains cas d'induire la mort par apoptose des cellules tumorales, plusieurs facteurs, qui lui sont directement ou indirectement associés, contribuent à une diminution générale de l'efficacité des agents chimiothérapeutiques *in vivo* (Cosse et al., 2007). Tout d'abord, certaines drogues nécessitent une oxygénation optimale pour un maximum d'efficacité. C'est le cas notamment des agents alkylants, lesquels transfèrent au cours de la réplication de l'ADN un groupement CH₃ sur certaines bases de l'ADN, ce qui a pour effet de causer des dommages au niveau de celui-ci et d'arrêter sa synthèse. La cause de cette diminution d'efficacité pourrait être une production accrue en hypoxie de substances nucléophiles telles que le glutathion, qui entreraient en compétition avec l'ADN pour l'alkylation (Vaupel et al., 2001). Ensuite, l'hypoxie, en induisant un ralentissement du cycle cellulaire (Amellem & Peterson, 1991), affecte les molécules chimiothérapeutiques agissant à des moments bien précis du cycle. Par exemple, les agents alkylants et les antimétabolites agissent principalement au cours de la phase de synthèse de l'ADN (Rang et al., 1999). Ce ralentissement peut être en partie expliqué par une suppression de la prolifération cellulaire dépendante de HIF-1. Celui-ci va inhiber la protéine c-Myc, qui joue un rôle central dans le

passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire (Koshiji et al., 2004). De plus, l'hypoxie, en augmentant l'activité de certaines enzymes de réparation de l'ADN, diminue de cette manière également l'efficacité des agents induisant des dommages au niveau de l'ADN (Walker et al., 1994).

Si les cellules hypoxiques sont plus résistantes à l'effet des chimiothérapies que les cellules normales prolifératives, c'est également en raison de leur localisation au sein des tumeurs. En effet, les cellules hypoxiques viables étant situées à une distance de 50 à 250 μm des vaisseaux sanguins, les agents chimiothérapeutiques doivent pour les atteindre, pénétrer plusieurs couches cellulaires. De plus, à cause de la circulation sanguine chaotique, résultat de la néo-angiogenèse tumorale, la perfusion générale de la tumeur est diminuée ; ce qui amplifie les difficultés de distribution des molécules thérapeutiques aux cellules hypoxiques (Shannon et al., 2003).

Enfin, l'hypoxie est responsable de changements au sein du protéome et dans l'expression de certains gènes. Le facteur de transcription HIF-1, parmi ses gènes cibles, possède en effet un certain nombre de gènes anti-apoptotiques, c'est le cas notamment pour Bcl-2, Mcl-1, les protéines inhibitrices de l'apoptose IAP qui vont interférer avec l'activation des procaspases-9 et -3, ainsi que le facteur de transcription NF κ B (Zhou et al., 2006). L'activité anti-apoptotique de NF κ B s'explique principalement par la régulation de l'expression de nombreuses protéines anti-apoptotiques capables d'inhiber à la fois la voie extrinsèque et la voie intrinsèque d'apoptose (Shen et al., 2009). De plus, parmi les gènes cibles de HIF-1, on retrouve également des gènes codant pour différents facteurs de croissance (VEGF, IGF2 (insulin growth factor 2), TGF β (transforming growth factor β)) qui vont permettre de stimuler la prolifération et la survie. Le VEGF (vascular endothelial growth factor), produit et libéré par les cellules hypoxiques malignes, est capable d'induire l'angiogenèse, une augmentation de la perméabilité vasculaire, une augmentation de la libération paracrine et autocrine d'autres facteurs de croissance, la formation de métastases, l'inhibition de l'apoptose, et la chimiorésistance (Yasuda, 2008). Suite à la liaison du VEGF sur son récepteur, différentes voies intracellulaires sont induites, notamment la voie PI3K/Akt (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) capable d'inhiber la protéine pro-apoptotique BH3-only Bad (Ferrara et al., 2003 ; Alvarez-Tejado et al., 2001). Cette induction de gènes anti-apoptotiques peut être également indépendante de HIF-1, c'est le cas notamment pour NF κ B et IAP-2. En plus de gènes anti-apoptotiques, l'hypoxie peut également induire l'expression de protéines responsables de la résistance à certaines drogues. En effet, différentes études ont montré qu'en hypoxie, des transporteurs de la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) tels que la glycoprotéine-P et certaines protéines MRP (multidrug resistance related proteins) sont surexprimés, et induisent l'efflux de drogues anticancéreuses du cytosol vers le milieu extracellulaire, entraînant la résistance à certaines drogues telles que le paclitaxel (Yasuda, 2008). Enfin, les métallothionéines, petites protéines intracellulaires capables de chélater différents métaux lourds, sont également surexprimées en hypoxie, et capables d'induire une résistance à certaines molécules thérapeutiques telles que la cisplatine.

L'hypoxie, et plus spécifiquement HIF-1 α , semblent donc posséder des effets pro- et anti-apoptotiques. En conséquent, le devenir d'une cellule hypoxique va dépendre en grande partie de l'intensité et de la durée de la privation en oxygène. Lors d'une hypoxie sévère ou de longue durée, p53 est stabilisée par liaison de HIF-1 α , entraînant la mort des cellules. Par contre en cas d'hypoxie modérée, HIF-1 α suite à sa dimérisation avec ARNT va pouvoir activer la transcription de ses gènes cibles, et ainsi favoriser la survie. Il a été montré que la liaison de HIF-1 α à ses deux partenaires potentiels, que sont p53 et ARNT, semble dépendre de sa phosphorylation. En effet, lorsque HIF-1 α est phosphorylé, celui-ci lie ARNT, alors qu'en absence de cette phosphorylation, la liaison de HIF-1 α se fait à p53 (figure 1.27) (Piret

et al., 2002 ; Suzuki et al., 2001). Un troisième facteur capable d'influencer le devenir d'une cellule en hypoxie, est la présence ou non de nutriments. En effet, cytokines et facteurs de croissance, en activant la voie PI3K/Akt, stimulent la survie via une inhibition la protéine BH3-only Bad, et une induction du facteur de transcription NFκB (Alvarez-Tejado et al., 2001).

4) Objectifs

A l'heure actuelle, le cancer est une des premières causes de mortalité. Or, il a été montré que l'efficacité des chimiothérapies, qui constituent le traitement de premier choix pour la majorité des cancers, peut être influencée par certains facteurs environnementaux tumoraux tels que l'hypoxie. En effet, dans certains cas, l'hypoxie est responsable d'une résistance à la mort cellulaire induite par ces traitements.

In vitro, il a été montré que cet effet inhibiteur que possède l'hypoxie sur l'effet des chimiothérapies n'est pas applicable à tous les types cellulaires. En effet, l'hypoxie influence de façon différente la mort cellulaire induite par l'agent chimiothérapeutique étoposide entre différentes lignées de cellules tumorales. Dans les cellules de carcinome hépatique HepG2, l'hypoxie inhibe l'apoptose induite par l'étoposide, alors que, dans les cellules de carcinome pulmonaire A549, elle n'a aucun effet (Cosse et al., 2007).

L'objectif de ce mémoire sera donc d'essayer d'identifier des différences entre ces deux types cellulaires, les cellules HepG2 et les cellules A549, permettant d'expliquer l'effet différentiel de l'hypoxie sur l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques. L'effet de deux agents chimiothérapeutiques sera testé, celui de l'étoposide et celui du paclitaxel. Ces deux drogues ont été décrites en détails dans la partie 3.2.

L'approche qui a été utilisée est l'identification, au moyen de cartes microfluidiques, de différents gènes candidats, dont le profil d'expression pourrait expliquer les différences d'effet des agents chimiothérapeutiques en présence ou en absence d'oxygène selon le type cellulaire utilisé. Les profils d'expression en ARNm ainsi obtenus ont tout d'abord été vérifiés par une approche classique, la PCR en temps réel, mais également au niveau protéique par Western blot afin de vérifier que l'expression en ARNm était bien corrélée à l'abondance protéique. Des protéines, dont l'abondance varie en fonction des différentes conditions de manière à expliquer potentiellement les effets de l'hypoxie sur l'apoptose, ont alors été sélectionnées. L'expression de ces gènes candidats a ensuite été inhibée, grâce à la transfection de siRNA spécifiques des transcrits de ces gènes. De cette manière, il sera possible de vérifier leur implication dans l'effet protecteur de l'hypoxie sur l'effet des agents chimiothérapeutiques, observé dans les cellules HepG2, et absent dans les cellules A549. Les résultats obtenus permettront donc d'avancer dans la compréhension des mécanismes de résistance aux chimiothérapies, qui se développent malheureusement trop souvent, et de peut-être un jour pouvoir interférer de manière efficace avec ceux-ci.

II. Matériel et méthodes

1) Culture cellulaire

Les cellules de carcinome hépatique HepG2 et de carcinome pulmonaire A549 sont cultivées dans des boîtes de culture en polystyrène de 75 cm² (T75). Les cellules HepG2 sont cultivées dans du milieu DMEM et les cellules A549 dans du milieu MEM, chacun contenant 10 % de sérum de veau fœtal. Le volume de milieu ajouté dans les boîtes dépend de la durée entre deux repiquages, il est par exemple de 15 ml quand les cellules sont repiquées, comme c'est le plus souvent le cas, tous les 2 jours. Les cellules sont cultivées sous une atmosphère à 5 % de CO₂, à une température de 37 °C. Lors du repiquage, le milieu de culture est décanté puis les cellules sont rincées à l'aide de 4 ml de PBS afin d'éliminer toute trace de sérum. Celui-ci doit en effet être éliminé pour permettre l'action de la trypsine dont il inhiberait l'action. Deux millilitres de trypsine-EDTA sont alors ajoutés et permettent, via des clivages protéiques et la chélation par l'EDTA des ions calcium nécessaires aux intégrines, un détachement des cellules du support. Pour permettre l'action de la trypsine, les boîtes sont alors incubées quelques minutes à 37 °C dans une étuve sèche. Une fois les cellules détachées, 5 ml de milieu de culture avec sérum sont alors ajoutés pour inhiber l'action de la trypsine. L'ensemble de la suspension cellulaire est ensuite récupéré dans un tube de 10 ml stérile, qui sera centrifugé durant 5 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans un volume adéquat de milieu, celui-ci variant généralement de 5 à 7 ml. La suspension cellulaire est alors répartie selon les besoins dans de nouvelles T75 et du milieu de culture est ajouté pour atteindre un volume de 15 ml si les cellules sont repiquées tous les deux jours (tableau 2.1).

2) Incubation (en hypoxie avec des agents chimiothérapeutiques)

Les incubations en hypoxie durent généralement 16 heures, à l'exception de celles réalisées préalablement à des mesures de fragmentation de l'ADN ou de cytotoxicité qui nécessitent respectivement une incubation de 24 et 40 heures. Lors de ces incubations, et afin de maintenir le pH dans des limites physiologiques, le milieu de culture habituel est remplacé par du milieu CO₂-indépendant supplémenté en L-glutamine mais sans sérum. La régulation du pH est en effet rendue impossible via le système tampon de type bicarbonate de sodium qui est présent dans les milieux de culture standards. Celui-ci nécessite en effet une teneur régulée en CO₂ de 5-10 %. Or cette teneur ne peut être maintenue, les cellules étant incubées dans des incubateurs en chambre chaude (37 °C). Ces incubateurs permettent une incubation des cellules soit dans une atmosphère normale (normoxie), soit dans une atmosphère contenant 99 % d'azote et 1 % d'oxygène (hypoxie). Les cellules HepG2 et A549, en plus d'être incubées en normoxie ou en hypoxie, sont mises en présence ou non d'un agent chimiothérapeutique dilué dans le milieu CO₂-indépendant. L'étoposide est utilisé à une concentration finale de 50 µM pour les cellules HepG2 et A549, le paclitaxel à une concentration finale de 10 µM pour les cellules HepG2 uniquement (tableau 2.2).

3) Dosage de la concentration en protéines

Le dosage de la concentration en protéines est réalisé après chaque extraction protéique quelle que soit son type, et cela afin de connaître la concentration associée à chaque extrait et donc de permettre l'introduction d'une même quantité de protéines pour chaque extrait pour les mesures réalisées ensuite.

3.1) Par la méthode de Bradford

Le dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford est basé sur le changement de couleur d'un colorant, le bleu de Coomassie, en réponse à diverses concentrations en protéines. Sa liaison, principalement à des acides aminés basiques et aromatiques, entraîne une modification de son absorbance qui passe de 465 à 595 nm, longueur d'onde où s'effectuent donc les mesures par spectrophotométrie.

Selon le type d'extraction, le dosage est soit réalisé en tubes (extraction protéique totale classique, avec tampon de lyse DLA,...), soit en plaque 96 puits (extraction pour dosage de l'activité caspase). Quelle que soit la méthode choisie, une droite d'étalonnage réalisée à l'aide de quantités connues de BSA est réalisée. L'équation associée à celle-ci permettra de calculer la concentration en protéines des différents échantillons en fonction de l'absorbance. La concentration obtenue devra encore être divisée par le volume d'échantillon ajouté pour obtenir une valeur en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Le blanc nécessaire à cette droite d'étalonnage BSA est réalisé à l'aide d'eau distillée. Par contre, c'est l'absorbance d'un blanc échantillon, réalisé au moyen du tampon de lyse utilisé lors de l'extraction, qui est soustraite aux valeurs d'absorbance des échantillons. Lorsque le dosage est réalisé en tubes, 1 ml de solution de Bradford filtrée diluée 5 x est ajouté préalablement dans les différents tubes. Ensuite, dans chacun de ces tubes, sont ajoutés soit un des volumes de BSA 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ nécessaires à la droite d'étalonnage (0 à 10 μg), soit du tampon de lyse (2,5 μl), soit 2,5 μl d'un des échantillons (mesurés en double). Ces différents ajouts se font de 30 secondes en 30 secondes. Au minimum 5 minutes après l'ajout, l'absorbance à 595 nm est mesurée par spectrophotométrie de 30 secondes en 30 secondes. Lorsque le dosage est réalisé en plaque 96 puits, 1 μl d'extrait protéique est dilué dans 120 μl d'eau distillée, et des triplicats sont réalisés pour chaque échantillon. Il en est de même pour le tampon de lyse. Pour la courbe standard BSA, 7 x 3 puits (triplicats) sont consacrés aux différentes dilutions de la BSA (0, 0,5, 1, 2, 3, 4 et 5 μg) réalisées dans un volume total de 120 μl . Un volume de solution de Bradford diluée 2x de 80 μl est ajouté dans chacun des puits. Au minimum 5 minutes après l'ajout, la lecture d'absorbance est réalisée (tableau 2.3).

3.2) Par la méthode de Pierce

Le dosage protéique par la méthode de Pierce est basé sur le même principe que celui par méthode de Bradford, c'est-à-dire le changement d'absorbance d'un colorant suite à sa liaison à des protéines. Dans le cas du dosage à l'aide du colorant Pierce, qui se réalise en plaque 96 puits, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 660 nm. Tout comme pour le Bradford, une courbe d'étalonnage à l'aide de BSA doit être réalisée, avec des quantités de BSA allant de 0,5 à 5 μg diluées dans un volume total de 10 μl . Concernant le tampon de lyse et les échantillons, 1 μl est ajouté par puits auquel s'ajoutent 9 μl d'eau distillée. Chacune des mesures est réalisée en triple. 150 μl de solution de Pierce sont ensuite ajoutés par puits et cela le plus rapidement possible à l'aide d'une pipette multi-channel. La plaque 96 puits est agitée quelques instants, avant que la lecture d'absorbance à 660 nm ne se réalise et cela au moins 5 minutes après l'ajout de la solution de Pierce. La concentration en protéines est déterminée sur base de l'absorbance de la même manière que lors du dosage par la méthode de Bradford (tableau 2.4).

4) Mesure de l'activité des caspases-3 et -7

4.1) Principe

Les caspases-3 et -7 sont deux caspases effectrices qui sont responsables, durant le processus de mort par apoptose, du clivage d'un grand nombre de substrats cellulaires. Afin d'évaluer

l'activité de ces deux enzymes, nous avons incubé les différents extraits cellulaires avec un substrat synthétique spécifique des caspases-3 et -7, la molécule Ac(N-acetyl)-DEVD-AFC(7-amino-4-trifluorométhylcoumarin). Cette spécificité s'explique par la présence de la séquence térapeptidique DEVD, connue pour être située en amont du site de clivage par les caspases-3 et -7 de l'enzyme de réparation de l'ADN PARP (Poly ADP ribose polymérase). Le clivage par les caspases-3 et -7 actives qui se réalise donc entre D et AFC, provoque la libération de la molécule fluorescente AFC dont la fluorescence sera alors mesurée.

4.2) Protocole

Les cellules sont tout d'abord repiquées au jour 1 dans des boîtes de culture en polystyrène de 25 cm² (T25) à une densité de 1.000.000 de cellules par T25. Au jour 2, elles sont incubées durant 16 heures dans les différentes conditions étudiées à savoir en normoxie ou hypoxie, en présence ou non d'étoposide (HepG2 et A549) ou de paclitaxel (HepG2). Après cette incubation, pour chaque boîte, le milieu de culture est recueilli dans un tube de 10 ml et centrifugé durant 5 minutes à 1200 rpm et 4 °C. Les cellules attachées à la boîte de culture sont alors raclées deux fois dans 200 µl de PBS froid et récupérées dans un eppendorf. Après la centrifugation du milieu de culture, le surnageant est éliminé, seules les cellules qui auparavant étaient en suspension et qui à présent sont dans le culot sont resuspendues dans 100 µl de PBS froid et ajoutées dans l'eppendorf contenant les cellules raclées. Les échantillons sont alors centrifugés 5 minutes à 130 rcf et 4 °C dans une centrifugeuse à godets basculants. Les culots ainsi formés sont ensuite resuspendus dans 50 µl de tampon de lyse. Après une incubation de 15 à 45 minutes à 4 °C sur roue, les lysats sont centrifugés 5 minutes à 13.000 rpm et 4 °C avant que les surnageants ne soient récupérés pour la suite de l'expérimentation. La concentration en protéines de ces différents extraits est déterminée par la méthode de Bradford, afin de déterminer le volume à prélever pour avoir 20 µg de protéines. Pour les différents échantillons, le volume en question sera alors complété par du tampon de lyse pour atteindre 100 µl auxquels seront ajoutés 50 µl de tampon de réaction et 1 µl de substrat Ac-DEVD-AFC, l'ajout de celui-ci se faisant de minute en minute dans les différents échantillons. Après 1 heure d'incubation à l'obscurité et à 37 °C, la fluorescence des groupements AFC libérés est mesurée (λ excitation = 400 nm, λ émission = 505 nm). Les valeurs de fluorescence obtenues sont normalisées par celle du blanc échantillon, qui comprend uniquement 100 µl de tampon de lyse en plus du tampon de réaction et du substrat (tableau 2.5).

5) Mesure de cytotoxicité via un dosage d'activité de la lactate déshydrogénase

5.1) Principe

Le dosage qui est utilisé pour mesurer la cytotoxicité des molécules étudiées, est un dosage colorimétrique basé sur la mesure d'activité de l'enzyme cytoplasmique lactate déshydrogénase (LDH). Celle-ci est libérée du cytoplasme de cellules endommagées dans le milieu extracellulaire lorsque leur membrane plasmique perd son intégrité. Au cours de ce dosage, un mélange réactionnel contenant du lactate, du NAD⁺, des sels de tétrazolium, et de la diaphorase (l'enzyme responsable de la conversion des sels de tétrazolium en formazan en présence de NADH+H⁺ comme cofacteur) est préparé et ajouté aux 3 fractions (cellules attachées, cellules détachées et corps apoptotiques, et milieu de culture) obtenues pour chaque condition de culture. En présence de LDH, des molécules de NADH+ H⁺ sont formées par oxydation du lactate en pyruvate. Ce cofacteur permet alors la synthèse, par la diaphorase, de formazan à partir de sels de tétrazolium, dont l'absorbance sera finalement mesurée et mise en

parallèle avec l'activité de la LDH (figure 2.1). Le rapport entre d'une part l'activité LDH dans les fractions milieu et les fractions cellules détachées et corps apoptotiques, et d'autre part l'activité LDH totale présente dans toutes les fractions confondues, permettra d'évaluer la mortalité cellulaire.

5.2) Protocole

Les cellules sont repiquées au jour 1 en plaque 24 puits à raison de 60.000 cellules par puits pour les cellules HepG2 et de 40.000 cellules par puits pour les cellules A549. Lorsque la mesure de la libération de la LDH est réalisée après incubation de cellules HepG2 transfectées avec des siRNA (cf. point 12), les cellules sont repiquées à une densité de 20.000 cellules par puits. Cette densité moindre lors du repiquage s'explique par le fait que la transfection rallonge de deux jours le protocole classique. Par plaque 24 puits, 3 puits sont en plus consacrés aux blancs et remplis de milieu de culture seul sans cellules. Le soir du jour 2, les cellules sont incubées dans les différentes conditions d'incubation décrites au point 2, et cela durant 40 heures. Après incubation, le milieu de culture de chaque puits est récupéré et centrifugé 5 minutes à 2000 rpm et 4 °C dans le but de sédimenter les cellules détachées et les corps apoptotiques présents. Les différents surnageants sont ensuite récupérés dans des eppendorfs « surnageant », et les culots resuspendus dans 250 µl de PBS contenant 10 % de Triton X-100 (eppendorfs « culot »). Deux cent cinquante microlitres de PBS avec 10 % de Triton X-100 sont également ajoutés dans les différents puits contenant les cellules toujours attachées au support. Celui-ci, grâce à ses propriétés détergentes, va permettre la lyse des cellules. Au moins 10 minutes après cet ajout, les solutions sont récupérées et collectées dans des eppendorfs « lysat ». Une fois ces différentes fractions obtenues, l'activité lactate déshydrogénase présente dans chacune de celles-ci est mesurée. Pour ce faire, 100 µl des fractions « culot », 100 µl des fractions « surnageant », et 5 µl des fractions « lysat » complétés par 95 µl de PBS Triton X-100 sont placés dans une plaque 96 puits. Afin de permettre une normalisation des valeurs qui seront obtenues, 100 µl de milieu seul (normoxie et hypoxie) ainsi que 100 µl de PBS Triton X-100 sont également déposés en triple. Le milieu seul représente le blanc pour les échantillons « surnageant » et le PBS Triton X-100 le blanc pour les échantillons « culot » et « lysat ». Enfin, 100 µl de mélange réactionnel sont ajoutés dans chacun des puits. La composition de celui-ci a été décrite dans la partie principe (point 5.1). L'absorbance est alors mesurée à 490 et 655 nm (longueur d'onde de référence) après différents temps d'incubation, et cela jusqu'à ce que la valeur d'absorbance la plus élevée de la plaque soit située entre 2 et 3 (tableau 2.6). Les résultats (absorbance 490 – absorbance 655 nm) sont alors utilisés pour calculer le pourcentage de cytotoxicité grâce à la formule suivante :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{(\text{culot} - \text{blanc}) + ((\text{surnageant} - \text{blanc}) \times 4)}{(\text{culot} - \text{blanc}) + ((\text{surnageant} - \text{blanc}) \times 4) + ((\text{lysat} - \text{blanc}) \times 20)} \times 100$$

6) Mesure de la fragmentation de l'ADN génomique

6.1) Principe

Au cours de la phase tardive de l'apoptose, l'ADN génomique est clivé par une endonucléase du nom de CAD. Celle-ci est activée suite au clivage par des caspases et principalement par la caspase-3 de la protéine ICAD responsable de son inhibition dans les cellules en bonne santé. Le clivage de l'ADN par l'endonucléase CAD se réalise au niveau des régions inter-nucléosomales, où l'ADN, non complexé avec des protéines histone, n'est pas protégé. Par conséquent, l'activation de CAD induit un enrichissement important en mono- et poly-

nucléosomes. L'étude de la fragmentation de l'ADN est donc utilisée pour évaluer l'apoptose, dans notre cas induite en réponse à une incubation en présence d'étoposide. Cette étude a été réalisée par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) qui est une technique biochimique utilisée pour détecter la présence d'un antigène, ici les nucléosomes, au sein d'un échantillon (lysate cellulaire). Pour ce faire, les puits d'une plaque 96 puits ont dans un premier temps été recouverts d'anticorps anti-histone. Ceux-ci permettent, lorsque les différents échantillons sont déposés, de retenir spécifiquement ces protéines associées aux nucléosomes, qui ne sont donc pas éluées suite aux lavages. Un second anticorps, couplé à une peroxydase et dirigé contre l'ADN simple et double brin, est ensuite ajouté. L'utilisation de deux anticorps différents, l'un dirigé contre les histones, l'autre contre l'ADN, permet la détection spécifique des nucléosomes. En effet, suite à l'ajout du substrat ABTS (2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate), seule l'activité des peroxydases immobilisées dans les complexes immuns (anticorps anti-histone/ histone/ anticorps anti-ADN) sera mesurée (figure 2.2).

6.2) Protocole

Les cellules HepG2 ont été repiquées en plaque 24 puits à une densité de 25.000 cellules par puits. Le lendemain, celles-ci ont été transfectées avec les siRNA ciblant Bim durant 24 heures, après quoi le milieu de transfection a été remplacé par du milieu complet (cf. point 12). Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été incubées durant 24 heures en normoxie ou en hypoxie en présence ou non d'étoposide (50 μ M). Après l'incubation, et pour chacune des conditions, trois puits seront utilisés pour le test ELISA et deux pour le dosage de la concentration en protéines. Celui-ci ne peut en effet être réalisé à partir des extraits préparés pour l'ELISA, le tampon utilisé étant incompatible avec le dosage. Pour le test ELISA, le milieu de culture des différents puits est tout d'abord prélevé et centrifugé 3 minutes à 4°C et 2.000 rpm afin de sédimenter les cellules détachées et les corps apoptotiques. Cent cinquante microlitres de tampon d'incubation sont alors ajoutés dans chacun des puits. Une fois la centrifugation terminée, le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 100 μ l de tampon d'incubation. L'homogénat est ensuite déposé dans le puits correspondant. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le contenu de chaque puits est homogénéisé, déposé dans un eppendorf et centrifugé 7 minutes à 13.000 rpm. Deux cent microlitres du surnageant sont alors récupérés dans un nouveau tube, stocké à -20 °C. Parallèlement à la préparation des extraits pour le test ELISA, les extraits utilisés pour le dosage des protéines sont préparés. Le milieu de culture des différents puits est tout d'abord prélevé, déposé dans un eppendorf et centrifugé 3 minutes à 4°C et à 2000 rpm. Cinquante microlitres de tampon de lyse sont ajoutés dans chacun des puits. Après la centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 50 μ l de tampon de lyse. L'homogénat obtenu est alors déposé dans le puits correspondant comme cela a été réalisé lors de la préparation des extraits pour l'ELISA. Après 30 minutes à température ambiante, le contenu des différents puits est homogénéisé et déposé dans un nouvel eppendorf. Après 5 minutes de centrifugation à 13.000 rpm, 70 μ l de surnageant est récupéré et stocké à -20 °C. C'est à partir de celui-ci que la mesure de la concentration en protéines, par la méthode de Pierce, a été réalisée. Une fois les différents extraits obtenus, l'ELISA en lui-même peut débuter. Dans un premier temps, 100 μ l d'une solution contenant des anticorps anti-histone sont ajoutés dans les différents puits. Après 1 heure, cette solution est éliminée et 200 μ l de tampon d'incubation sont ajoutés par puits. Trente minutes plus tard, cette solution est éliminée et les puits sont rincés 3x à l'aide de 250 μ l d'une solution de lavage. Les différents échantillons, dilués 10x dans du tampon d'incubation, sont alors déposés dans les puits, à raison de 100 μ l. Pour les blancs, 100 μ l de tampon d'incubation sont ajoutés à la place des échantillons. Après 90 minutes, les puits sont

décantés et rincés 3x à l'aide de 250 µl de solution de lavage afin d'éliminer tout ce qui ne serait pas lié spécifiquement aux anticorps anti-histone. Ensuite, 100 µl d'une solution contenant cette fois les anticorps anti-ADN sont déposés dans chacun des puits. Après 90 minutes, la solution est éliminée et les puits sont rincés 3x avec 250 µl de solution de lavage. Enfin, 100 µl d'une solution contenant le substrat de la peroxydase, couplée aux anticorps anti-ADN, sont ajoutés dans tous les puits. La plaque est alors déposée sur un agitateur à 250 rpm jusqu'à ce qu'un changement de couleur suffisant soit observé. La lecture de l'absorbance est réalisée à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre approximativement toutes les 2 minutes, cela jusqu'à ce que les valeurs maximales d'absorbance soient comprises entre 2 et 2,5. Cette densité optique, qui est proportionnelle à l'abondance des nucléosomes solubles générés au cours de l'apoptose, doit être normalisée par rapport à la quantité de protéines ajoutée dans chacun des puits de l'ELISA, afin que les résultats soient exprimés en unité de D.O. à 405 nm par µg de protéines. La quantité de protéines ajoutée dans chacun des puits de l'ELISA est déterminée sur base des résultats du dosage de la concentration en protéines par la méthode de Pierce (tableau 2.7).

7) PCR en temps réel

7.1) Principe

La PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel est la méthode la plus sensible à l'heure actuelle pour quantifier des ARNm et donc nous informer du niveau d'expression de gènes d'intérêt. Elle est basée sur la méthode classique de PCR, qui permet d'amplifier rapidement et de manière très importante une petite quantité d'ADN matrice, et cela en présence d'une polymérase thermo-réactive, d'amorces et de nucléotides. Elle est dite « en temps réel » car l'augmentation de la quantité d'ADN est suivie tout au long de la réaction. Pour que cette réaction puisse avoir lieu, il est tout d'abord nécessaire que l'ARN soit extrait puis rétro-transcrit en ADNc, à partir duquel va se faire l'amplification. Cette amplification, de part le fait que les réactifs sont au départ en excès, sera dans un premier temps exponentielle, puis à cause de la compétition entre renaturation et liaison des amorces, atteindra un plateau (figure 2.3). Elle sera mesurée par l'intermédiaire de la fluorescence émise, dans notre cas par la molécule fluorescente SYBR Green qui se lie aux doubles brins d'ADN au fur et à mesure que ceux-ci sont produits. C'est au cours de la phase exponentielle, dans la partie linéaire de celle-ci, que se fera la quantification de la quantité d'ADNc introduite au départ. A cet endroit sera établie une valeur seuil. Le nombre de cycle d'amplification nécessaire pour que la fluorescence dépasse cette valeur correspond au Ct (cycle threshold), qui est donc inversement proportionnel à la quantité d'ADNc introduite. C'est sur base de celui-ci que se fera la quantification. Néanmoins, avant de pouvoir associer Ct et abondance en ARNm, une normalisation doit être faite. Celle-ci se réalise en soustrayant les différentes valeurs de Ct du gène d'intérêt par les Ct d'un gène de référence (HKG, HouseKeeping Gene) dont l'expression est stable dans les différentes conditions étudiées.

7.2) Protocole

7.2.1) Extraction d'ARN par la méthode « TRI Reagent Solution »

Il est impératif que toute l'extraction se réalise dans des conditions RNase-free afin d'éviter toute dégradation de l'ARN. Les cellules sont repiquées en T25 à une densité de 1.000.000 cellules/T25 et incubées dans les différentes conditions étudiées. Après incubation, le milieu de culture est décanté et transféré dans des tubes de 10 ml, qui sont ensuite centrifugés 5 minutes à 1200 rpm et 4°C afin de sédimenter cellules et débris. Dans chaque T25 sont déposés 400 µl de TRI Reagent Solution. Cette solution contient principalement du phénol,

composé capable de dissoudre protéines et lipides, et un dénaturant protéique du nom de guanidine thiocyanate, qui en plus de faciliter la lyse cellulaire permet une inhibition immédiate des RNase par dénaturation de celles-ci. Ensuite, les cellules sont raclées et le lysat obtenu transféré dans un eppendorf. Un volume de 150 µl de ce lysat est utilisé pour resuspendre le culot, obtenu après avoir décanté par inversion le surnageant des tubes ayant été centrifugés. Le culot resuspendu est ensuite remis dans l'eppendorf correspondant. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, qui est nécessaire pour assurer une complète dissociation des complexes nucléoprotéiques, 80 µl de chloroforme sont ajoutés par eppendorf. Ceux-ci sont alors agités pendant 15 secondes avant une nouvelle incubation à température ambiante de 5 à 15 minutes. Une fois ce temps écoulé, les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 12.000 rcf et 4 °C afin de permettre une séparation entre la phase aqueuse contenant l'ARN et la phase organique contenant ADN et lipides dissous dans le chloroforme, ces deux phases étant séparées par une interphase contenant le phénol et les protéines précipitées. Seule la phase aqueuse supérieure est récupérée et transférée dans un nouvel eppendorf où sont ajoutés également 200 µl d'isopropanol. Le contenu des eppendorfs est alors homogénéisé par inversion et incubé 10 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé 10 minutes à 12.000 rcf et 4 °C. Cette centrifugation permet de sédimenter l'ARN précipité qui formera alors un culot au fond des eppendorfs. Le surnageant est décanté au maximum et le culot lavé avec 1 ml d'éthanol 75 %. Les échantillons sont alors vortexés à faible vitesse puis centrifugés 5 minutes à 7600 rcf et 4 °C. De nouveau, le surnageant est éliminé ; le culot quant à lui est laissé sécher à l'air libre pendant 10 à 15 minutes. Enfin 50 µl d'eau RNase-free chauffée préalablement à 55 °C, sont ajoutés par eppendorf et le tout est chauffé pendant 10 minutes à cette même température avant que les culots soient resuspendus. Le dosage de la concentration en ARN se réalise au moyen d'un spectrophotomètre en mesurant l'absorbance à 260 nm d'une solution d'ARN diluée 50 x. L'absorbance est également mesurée à 230 et 280 nm afin de s'assurer que les concentrations en protéines ($\text{abs } 260/\text{abs } 280 > 1,5$) et en sels ($\text{abs } 260/\text{abs } 230 > 2$) ne sont pas trop importantes (tableau 2.8).

7.2.2) Rétro-transcription « kit Roche »

Afin de synthétiser de l'ADNc à partir de l'ARN extrait, un kit spécifique de Roche est utilisé. Celui-ci contient l'ensemble des réactifs qui sont nécessaires à la rétro-transcription. Tout d'abord, 2 µg (lorsque c'est possible) d'ARN total sont dilués dans de l'eau distillée pour atteindre un volume de 12 µl auxquels est ajouté 1 µl d'oligo dT (amorces). Le mélange est alors chauffé pendant 10 minutes à 65 °C afin de permettre la dénaturation des structures secondaires potentielles présentes au niveau des ARN. Une fois les 10 minutes écoulées, les tubes sont spinés et immédiatement déposés sur glace. Toujours sur glace, 7 µl de mélange réactionnel contenant 4 µl de tampon, 0,5 µl de reverse transcriptase, 0,5 µl d'inhibiteur de ribonucléases, et 2 µl d'un mix de dNTP sont ajoutés par eppendorf. Ensuite, afin de permettre la polymérisation, le mélange est incubé 30 minutes à 55 °C. Enfin, la polymérase est inactivée par une incubation de 5 minutes à 85 °C, après laquelle les tubes sont placés sur glace pour arrêter la réaction (tableau 2.8). L'ADNc alors obtenu est stocké à - 20°C.

7.2.3) PCR en temps réel

Avant de remplir la plaque 96 puits qui sera utilisée pour la real-time PCR, il est nécessaire dans un premier temps de diluer les différents ADNc utilisés 100 x, et de préparer pour chaque gène (HKG + gènes d'intérêt) qui sera étudié un mix réactionnel. Celui-ci contient 5 µl d'eau distillée, 12,5 µl de SYBR Green et 2,5 µl du mix contenant les amorces chacune diluée 3x dans de l'eau distillée. Chaque échantillon est dosé en double. De plus, par gène étudié, deux puits sont consacrés aux blancs, où le mélange réactionnel est complété par de l'eau et non de l'ADNc. Une fois les différents mélanges préparés, la plaque peut être remplie. Dans chaque puits sont placés 20 µl de mix réactionnel auxquels sont ajoutés 5 µl d'ADNc dilué 100 x ou 5 µl d'eau milliQ pour les blancs. La plaque peut alors être scellée,

avant d'être centrifugée 1 minute 30 à 1000 rpm et placée dans la machine. La PCR débute par une première étape de dénaturation (95 °C, 10 minutes), qui est suivie par 40 cycles dénaturation (15 secondes, 95 °C)-hybridation des amorces et élongation (1 minute, 60 °C) (tableau 2.8). Une fois les résultats de Ct obtenus pour le housekeeping gene (23 kDa) et le ou les gènes d'intérêt, plusieurs calculs doivent être réalisés pour obtenir les différents « fold change » par rapport à une condition contrôle :

- $\Delta Ct = Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ HKG}$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ du gène dans une condition particulière} - \Delta Ct \text{ du gène dans la condition contrôle (normoxie seule)}$
- Fold change (niveau d'induction ou de répression du gène par rapport à la condition de référence) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

8) Analyse d'expression génique à l'aide de cartes microfluidiques

8.1) Principe

Les cartes microfluidiques, également appelées TLDA (TaqMan Low Density Array), possèdent 384 puits et permettent la réalisation simultanée de 384 réactions de PCR en temps réel (figure 2.4). Le chargement de 4 échantillons différents permet l'étude, pour chacun de ceux-ci, de l'expression de 96 gènes. Les TLDA utilisées étant des TLDA « apoptose », on retrouve parmi les 96 gènes dont l'expression est étudiée 93 gènes liés au processus apoptotique et 3 gènes pouvant servir de contrôles endogènes : 18S, ACTB et GAPDH. Ce qui différencie ces amplifications de celles décrites pour la PCR en temps réel classique est la façon dont celles-ci sont suivies. En effet, l'augmentation progressive de la fluorescence proviendra cette fois, non plus des molécules de SYBR Green qui se lient aux doubles brins d'ADN lorsqu'ils sont produits, mais de la libération de molécules fluorescentes se produisant en cours de polymérisation. En effet, dans chacun des puits, en plus des amorces permettant l'amplification d'un gène d'intérêt, se trouve une sonde TaqMan également spécifique de ce même gène. Sur cette sonde, sont présentes deux molécules fluorescentes, un rapporteur à l'extrémité 5', et un quencheur à l'extrémité 3'. Lorsqu'ils sont situés à proximité l'un de l'autre, le quencheur inhibe la fluorescence du rapporteur. Cependant, lorsque les amorces et la sonde s'hybrident au niveau de l'ADN et que la polymérisation a lieu, les nucléotides de la sonde vont être progressivement enlevés, libérant de ce fait le rapporteur du quencheur. Au fur et à mesure des amplifications, les rapporteurs libérés et donc l'intensité de la fluorescence, vont augmenter de façon exponentielle. L'estimation de la quantité d'ADNc à partir des valeurs de Ct, se réalise de la même manière que ce qui a été décrit pour la PCR en temps réel classique.

8.2) Protocole

8.2.1) Extraction d'ARN et dosage à l'aide du Bioanalyzer Agilent

Après incubation des cellules ayant été repiquées à une densité de 1.000.000 cellules / T25, l'extraction d'ARN totale est réalisée comme décrite dans le paragraphe 7.2.1. Ensuite, dans le but de vérifier l'intégrité des ARN extraits, chaque échantillon est analysé grâce aux puces Agilent RNA 6000 NANO série II et au Bioanalyzer Agilent 2100. Préalablement, 2 µl d'ARN sera dilué dans un tube PCR dans un volume défini d'eau milliQ, afin d'obtenir une concentration en ARN de 250 ng/µl. L'analyse est quant à elle réalisée conformément aux instructions du fabricant (tableau 2.9).

8.2.2) Rétro-transcription avec amorces aléatoires à l'aide du « High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit »

La synthèse de l'ADNc qui est introduit dans les cartes microfluidiques, requiert l'utilisation d'un protocole particulier afin que les résultats obtenus soient garantis. Dans ce but, le kit « High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » d'Applied Biosystems est utilisé. Dans des petits tubes PCR, pour chaque échantillon, 10 µl de mix réactionnel sont déposés. Celui-ci contient 2 µl de tampon, 0,8 µl d'un mix de dNTP, 2 µl de random primers, 1 µl de Multi-Scribe Reverse Transcriptase, 1 µl d'inhibiteur de RNase et 3,2 µl d'eau RNase free. Ensuite, 10 µl d'ARN contenant 2 µg sont ajoutés (tableau 2.10). Après homogénéisation, les tubes sont spinés et introduits dans le ThermoCycler dont la programmation est détaillée dans le tableau 2.9. L'ADNc ainsi obtenu est stocké à - 20 °C.

8.2.3) Cartes microfluidiques

Tout d'abord, pour chacun des échantillons, un mélange réactionnel est préparé. Celui-ci contient 2 µl d'ADNc (100 ng/µl), 98 µl d'eau DNase et RNase free et 100 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix. Ensuite, 100 µl de chacun des mix sont prélevés et chargés dans un des réservoirs de la carte microfluidique, chaque échantillon étant chargé dans deux pores consécutifs. La carte est alors centrifugée deux fois 1 minute à 1200 rpm, et cela dans le but d'amener les solutions des réservoirs vers les différents puits qui y sont associés. Après avoir vérifié le remplissage, la plaque est scellée et la partie supérieure contenant les réservoirs découpée. La plaque est alors placée dans l'appareil de PCR en temps réel. Le déroulement de la PCR ainsi que l'analyse des résultats sont identiques à ce qui a été décrit pour la PCR en temps réel classique. Les valeurs de Ct du housekeeping gene par lesquelles seront normalisées les Ct des différents gènes étudiés, sont celles du gène 18S. Celui-ci a été choisi parmi les 3 HKG présents sur la plaque (18S, ACTB et GAPDH) sur base de la constance de son expression, et de sa plus grande similarité d'expression par rapport à 23 kDa, qui est le housekeeping gene utilisé en PCR en temps réel classique.

9) Extraction protéique totale

9.1) Extraction protéique totale classique

Les cellules sont repiquées en T25 à une densité de 1.000.000 cellules/T25 et incubées dans les différentes conditions étudiées. Afin de minimiser toute dégradation potentielle des protéines, l'extraction doit se réaliser le plus possible sur glace. Après incubation, le milieu de culture de chaque boîte est récupéré et transféré dans des tubes de 10 ml qui sont centrifugés 5 minutes à 1200 rpm et 4 °C afin de sédimenter les cellules détachées et les autres débris cellulaires. Un volume de 200 µl de tampon de lyse, qui contient du Triton X-100 comme agent détergent pour lyser les cellules, est ensuite placé dans chaque T25 avant que les cellules ne soient raclées et la suspension transférée dans un eppendorf. Après centrifugation, le surnageant des tubes de 10 ml est éliminé et le culot resuspendu en utilisant une partie du lysat cellulaire obtenu précédemment. L'ensemble est ensuite retransféré dans l'eppendorf correspondant. Enfin, les eppendorfs sont centrifugés 5 minutes à 13.000 rpm et 4 °C et cette fois ce sont les surnageants contenant les protéines qui sont récupérés. Ceux-ci sont stockés à -70 °C, à l'exception de 10 µl stockés à -20 °C qui seront utilisés pour le dosage de la concentration en protéines (tableau 2.11).

9.2) Avec tampon de lyse DLA

Tout comme pour l'extraction classique, les cellules sont préalablement repiquées en T25 à une densité de 1.000.000 cellules/T25 et incubées durant 16 heures avant l'extraction. Par

contre, le tampon de lyse utilisé ici est différent. Dans ce cas-ci, il s'agit d'un tampon de lyse de type DLA dont la particularité est de contenir de l'urée, ce qui rend plus aisée l'extraction des protéines membranaires. Avant l'extraction, il sera nécessaire d'ajouter au tampon de lyse DLA stock 60 mM de DTT ainsi que du PIC et du PIB dilués 25x, qui permettent d'inhiber la dégradation des protéines. Le protocole d'extraction est presque identique à celui de l'extraction protéique totale classique. Cent microlitres de tampon DLA sont ajoutés par T25, et une étape d'agitation à 1000 rpm et 8 °C durant 30 minutes est nécessaire avant la centrifugation des eppendorfs à 13.000 rpm durant 10 minutes (tableau 2.12).

10) Western Blot

10.1) Principe

Le Western blot est une technique permettant la séparation de protéines selon leur poids moléculaire, leur détection et, de manière semi-quantitative, l'estimation de leur abondance. Les échantillons protéiques sont tout d'abord dénaturés à haute température et en présence d'un agent dénaturant, le SDS, qui confère également une charge négative à la protéine. Ces échantillons sont ensuite chargés sur un gel de polyacrylamide et la migration se réalise sous l'effet d'un courant électrique. Après migration, les protéines sont transférées du gel sur une membrane afin de permettre leur reconnaissance par des anticorps (figure 2.5). En effet, c'est grâce à un système anticorps primaire dirigé contre une protéine d'intérêt, anticorps secondaire reconnaissant la portion espèce-spécifique de l'anticorps primaire, que se fera la révélation de la protéine d'intérêt. L'anticorps secondaire utilisé est couplé à une peroxydase (HRP), qui permettra la révélation.

10.2) Protocole

10.2.1) Western Bot Mini-gel SDS PAGE

a) Préparation des échantillons

Pour chaque condition, un volume d'extrait protéique correspondant à 15 µg de protéines est ajouté dans un eppendorf. Ce volume est ensuite porté à 12 µl avec de l'eau distillée, auxquels seront ajoutés 3 µl de bleu de charge 5x. Les eppendorfs sont ensuite chauffés 5 minutes à 100 °C, puis spinés (tableau 2.13).

b) Electrophorèse Tris-Glycine

Une fois le montage des plaques réalisé, un gel séparateur de 12 % est préparé et coulé jusqu'à 0,5 cm en dessous du peigne. Il est ensuite recouvert par 0,5 ml d'isobutanol saturé en eau dans le but d'isoler le gel de l'oxygène qui inhiberait sa polymérisation. Après 1 heure de polymérisation à température ambiante, l'isobutanol est retiré et la surface du gel rincée abondamment à l'eau distillée, qui est ensuite complètement éliminée à l'aide d'un papier Whatman. Le gel concentrateur, qui aura été préparé préalablement, est ensuite coulé au dessus du gel séparateur et cela jusqu'au bord supérieur des plaques. Le peigne, qui permettra de former les puits de chargement, est ensuite placé. Après 30 minutes de polymérisation, le peigne peut être enlevé, le fond du support déclipé et les puits rincés avec du tampon d'électrophorèse 1x. Le gel est alors placé dans la cuve de migration, dans la partie centrale de laquelle est versé du tampon d'électrophorèse 1X de manière à recouvrir les puits. Les puits sont alors chargés : un puits contient 10 µl d'étalon de poids moléculaire et les autres puits chacun 13,5 µl des différents échantillons. Le reste du tampon d'électrophorèse 1x est alors versé dans la cuve, et les bulles d'air situées entre les deux plaques côté inférieur, sont retirées au moyen d'une seringue. La cuve peut enfin être fermée et les électrodes branchées

au générateur, lequel est réglé sur 200 Volts. La migration s'achève lorsque le front de migration a atteint le bas du gel (tableau 2.13).

c) Transfert sur membrane

Pour le transfert, une membrane de PVDF (dans la plupart des cas) ou de nitrocellulose (révélation caspase-3) est découpée selon la taille du gel (9x9 cm), de même que deux papiers Whatman. Avant de pouvoir être utilisées, les membranes ont besoin d'être réhydratées. Pour ce faire, la membrane de PVDF est trempée durant 1 minute dans du méthanol, puis au minimum 5 minutes dans du tampon de transfert. Par contre, pour la membrane de nitrocellulose, la réhydratation se fait uniquement dans le tampon de transfert. Lorsque l'électrophorèse est achevée, le gel est démoulé et le gel concentrateur découpé. Le gel ainsi que les papiers Whatman et les éponges, qui seront utilisés dans le montage, sont rincés dans du tampon de transfert avant utilisation. Les différents éléments peuvent alors être placés en sandwich dans l'appareil de transfert dans l'ordre suivant : film plastique, éponge, Whatman, membrane, gel, Whatman, éponge (figure 2.5). Le transfert est alors réalisé durant 2 heures à 1 mA/cm² de membrane ou toute la nuit à 35 mA (tableau 2.13).

d) Traitement de la membrane et révélation

Une fois le transfert achevé, la membrane est mise en présence de TBS-T + agent bloquant 2 % durant 1 heure afin de saturer tous les sites de liaison aspécifique des anticorps sur la membrane. L'incubation avec l'anticorps primaire (tableau 2.15) se déroule le plus souvent toute la nuit à 4 °C, à l'exception de l'incubation avec l'anticorps anti-tubuline- α et anti-actine- β utilisés pour le contrôle de charge, qui se fait durant 1 heure à température ambiante. Ensuite, la membrane est lavée 3 fois 15 minutes au TBS-T, puis incubée 1 heure avec l'anticorps secondaire (tableau 2.16). Celui-ci est couplé avec une peroxydase qui permettra la révélation. Les anticorps sont dilués dans du TBS-T + agent bloquant Amersham 2 %. Après incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane est de nouveau lavée 3 fois 15 minutes avec du TBS-T. Enfin, afin de révéler la position des protéines d'intérêt sur la membrane, celle-ci est mise en présence de 750 μ l de solution de révélation ECL durant 2 minutes. La révélation se fait soit en chambre noire en déposant un film radiographique sur la membrane pendant des temps variables, soit en utilisant une caméra spécifique capable d'enregistrer des signaux de chemiluminescence (tableau 2.13).

10.2.2) Western Blot NuPage

Afin de permettre une séparation adéquate et par la suite une mesure de l'abondance de protéines de petites tailles (Bim et Noxa par ex.), des gels précoulés NuPage Bis-Tris 4-12 % sont utilisés. Par rapport au protocole de Western blot classique, seules les parties concernant la préparation et la migration des échantillons sont modifiées et sont donc les seules à être décrites ci-dessous (tableau 2.14).

a) Préparation des échantillons

Pour chaque condition, un volume d'extrait protéique correspondant à 15 μ g de protéines est ajouté dans un eppendorf. Ce volume est ensuite porté à 15 μ l avec de l'eau distillée, auxquels seront ajoutés 5 μ l de bleu de charge spécifique pour NuPage. Les eppendorfs sont ensuite chauffés 10 minutes à 70 °C, puis spinés.

b) Migration des échantillons

Il est nécessaire, avant de placer le gel NuPage déballé dans la cuve de migration, de rincer les puits à l'aide de la solution de running n°1. Une fois le gel placé dans la cuve, les 200 ml de la solution de running n° 2 sont versés dans la partie centrale de celle-ci, et environ 600 ml de la solution n° 1 autour. Les puits sont alors chargés : un puits contient 7 μ l d'étalon de poids moléculaire et les autres chacun 18 μ l des différents échantillons. La cuve peut alors être fermée et les électrodes branchées au générateur, celui-ci étant réglé sur 200 Volts. La migration s'achève lorsque le front de migration a atteint le bas du gel.

11) Immunofluorescence

11.1) Principe

L'immunofluorescence est une technique de marquage permettant de localiser des protéines d'intérêt au sein d'une cellule et d'estimer leur abondance relative. Deux anticorps différents sont requis pour permettre cette visualisation : un anticorps primaire reconnaissant de manière spécifique la protéine d'intérêt et un anticorps secondaire reconnaissant le premier anticorps et couplé à un fluorochrome qui permet sa détection. Suite à une excitation par un laser, le fluorochrome va émettre de la fluorescence, laquelle permettra de détecter la protéine d'intérêt et cela grâce à un microscope confocal.

11.2) Protocole

Les cellules sont tout d'abord repiquées en plaque 24 puits sur des couvre objets en verre à une densité de 40.000 cellules/T25 pour les cellules HepG2 et de 20.000 cellules/T25 pour les cellules A549. Après incubation, le milieu de culture est décanté et 500 µl de paraformaldéhyde 4 % sont ajoutés par puits et cela durant précisément 10 minutes, afin de fixer les structures et constituants cellulaires dans l'état dans lequel ils étaient dans les cellules vivantes. Une fois les 10 minutes écoulées, 3 rinçages avec 1 ml de PBS sont réalisés avant que les cellules ne soient perméabilisées durant 5 minutes à l'aide de PBS Triton X-100. Cette perméabilisation est nécessaire pour permettre l'entrée par la suite des anticorps au sein des cellules. Les différents puits sont alors rincés 3 fois au minimum 5 minutes avec du PBS/BSA. Ensuite, une chambre humide est préparée en disposant dans une grande boîte de Pétri un papier Whatman fortement humidifié avec de l'eau distillée et sur lequel est déposée une feuille de parafilm. L'anticorps primaire (tableau 2.18) est dilué 100 fois dans du PBS/BSA et des gouttes de 30 µl sont déposées sur le parafilm. Sur ces gouttes, les couvre objets sont retournés durant deux heures à température ambiante, après avoir pris soin de fermer hermétiquement la chambre à l'aide de parafilm pour diminuer les risques d'évaporation. Les couvre objets sont ensuite remis dans les puits, cellules vers le haut, et les différents puits sont rincés 3 fois au PBS/BSA. Par la suite, les couvre objets sont de nouveau retournés sur des gouttes de 30 µl mais cette fois d'anticorps secondaire (tableau 2.19) dilué 1000 x dans du PBS/BSA. Après une heure d'incubation à température ambiante et dans l'obscurité pour éviter la dégradation du fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire, les couvre objets sont remis dans les puits, après avoir pris soin de remplacer le PBS/BSA par du PBS seul. Deux rinçages supplémentaires avec 1 ml de PBS sont ensuite réalisés. Après cela, les couvre objets sont de nouveau retournés sur un parafilm dans la chambre, sur des gouttes de 30 µl contenant du TOPRO3 dilué 80 fois dans de la RNase. L'incubation avec le TOPRO3, agent intercalant de l'ADN, dure 30 minutes dans l'obscurité. Enfin, les couvre objets sont replacés dans les puits, rincés 3 fois avec 1 ml de PBS et montés sur une lame porte objet à l'aide d'une goutte de Mowiol préchauffé à 57 °C (tableau 2.17).

12) Transfection avec des siRNA

12.1) Principe

La transfection consiste en l'introduction de matériel génique, ici de siRNA (small interfering RNA), au sein de cellules. Cette introduction peut se réaliser de différentes manières, celle que nous avons choisie étant la voie chimique. En effet, des lipides cationiques (Dharmafect-1) vont être utilisés pour neutraliser les charges négatives des siRNA, et permettre leur internalisation grâce à l'interaction des domaines hydrophobes des lipides cationiques avec la

membrane plasmique. Les siRNA sont des ARN doubles brins de 20-25 nucléotides qui, après séparation en simples brins, sont intégrés dans un complexe protéique du nom de RISC. Celui-ci va provoquer la dégradation par clivage des ARNm complémentaires aux siRNA, qui ne pourront donc être traduits en protéine. La transfection de siRNA est utilisée couramment pour permettre l'inhibition de l'expression de protéines d'intérêt.

12.2) Protocole

Le protocole, bien que similaire pour les trois siRNA utilisés comporte malgré tout deux différences. Celles-ci portent sur la densité cellulaire initiale et sur la durée séparant le changement de milieu, ayant lieu 24 heures après la transfection, et l'incubation. En ce qui concerne la transfection des cellules HepG2 avec les siRNA Bim, les cellules sont repiquées au jour 1 à une densité de 1.000.000 cellules/T25 pour les cellules qui seront transfectées, et à une densité de 500.000 cellules/T25 pour les cellules contrôles qui ne le seront pas. Cette différence de densité est réalisée dans le but d'atteindre, au début de l'incubation en présence des agents chimiothérapeutiques, une densité cellulaire similaire entre les cellules transfectées et non transfectées, la transfection étant toxique pour les cellules. Au jour 2, les cellules sont transfectées durant 24 heures, après quoi le milieu de transfection est remplacé par du milieu complet. Au soir du jour 4, les cellules sont incubées. Par contre, pour la transfection des cellules HepG2 avec les siRNA Noxa et p53, les cellules sont repiquées au jour 1 à une densité de 1.000.000 cellules/T25 à la fois pour les cellules transfectées et non transfectées. Au jour 2, la transfection a lieu. Au jour 3, le changement de milieu est réalisé 24 heures après la transfection et les cellules sont incubées le plus tard possible dans la journée afin de leur laisser le temps de récupérer. Le protocole de transfection en lui-même débute par la dilution des siRNA dans de l'OptiMEM. Le volume à atteindre, par T25, une fois le siRNA dilué, doit correspondre à 1/10 du volume final (4 ml) où le siRNA doit être à une concentration de 50 nM. Ensuite, le Dharmafect 1, qui est l'agent transfectant, est dilué 500 fois par rapport au volume final, et cela dans un volume correspondant au dixième de celui-ci également. Chacune des solutions est ensuite remuée légèrement. Cinq minutes plus tard, le siRNA dilué est placé dans l'agent transfectant dilué, l'ensemble étant homogénéisé doucement à la pipette. Vingt minutes plus tard, 8/10 de milieu habituel avec sérum c'est-à-dire 3,2 ml par T25 sont ajoutés. Les 4 ml sont ensuite placés sur les cellules. Pour les cellules non transfectées, 3,2 ml de milieu habituel et 0,8 ml d'OptiMEM sont ajoutés par T25. En parallèle à la transfection avec les siRNA Noxa, Bim et p53, des cellules HepG2 sont également non-transfectées ou transfectées avec des siRNA RISC-free servant de contrôle négatif. Celui-ci n'est pas reconnu par le complexe RISC et n'a donc aucun effet (tableau 2.20).

III. Résultats

En 2007, Cosse et al. ont montré que la mort cellulaire induite par l'étoposide était influencée de manière différente par l'hypoxie en fonction du type cellulaire. Dans les cellules de carcinome hépatique HepG2, l'hypoxie diminue l'apoptose induite par l'étoposide, alors qu'elle n'a aucune influence sur l'effet pro-apoptotique de cette molécule chimiothérapeutique dans les cellules de carcinome pulmonaire A549. L'étoposide est une molécule chimiothérapeutique utilisée couramment en clinique pour le traitement de cancers pulmonaires, prostatiques ou encore de lymphomes. Comme cela a été décrit dans l'introduction, cette molécule, en inhibant la topoisomérase II, induit la formation de cassures au niveau de l'ADN, et en conséquence, l'activation du facteur de transcription p53 qui induit alors l'apoptose.

Etant donné que ces résultats constituent le point de départ de ce mémoire, la première partie de ce travail a consisté en la confirmation de ceux-ci dans les deux mêmes lignées cellulaires, les cellules HepG2 et A549. Une molécule chimiothérapeutique supplémentaire a également été utilisée dans les cellules HepG2, il s'agit du paclitaxel. Dans la seconde partie, des cartes microfluidiques (ou TLDA - TaqMan Low Density Array) « apoptose » ont été utilisées afin d'identifier des gènes dont l'expression permettrait d'expliquer les différences de comportement de ces deux lignées cellulaires lorsqu'elles sont exposées à l'hypoxie. Enfin, après avoir vérifié les changements d'expression en ARNm et en protéine des différents candidats, des siRNA spécifiques ont été utilisés pour inhiber sélectivement l'expression de deux de ces gènes. Les conséquences de l'invalidation de l'expression de ces candidats sur l'apoptose et la mort cellulaire ont été étudiées afin d'évaluer si ces candidats sont réellement impliqués dans l'apoptose induite par l'étoposide ou le paclitaxel et si l'hypoxie exerce son effet protecteur dans les cellules HepG2 en modulant leur expression.

1) Etude de l'effet différentiel de l'hypoxie sur la mort cellulaire induite par l'étoposide ou le paclitaxel

Comme expliqué ci-dessus, étant donné que les résultats obtenus par Cosse et al. (2007) constituent le point de départ de ce travail, ceux-ci ont été vérifiés dans les deux mêmes lignées cellulaires, c'est-à-dire les cellules HepG2 et A549. Dans les cellules HepG2, une seconde molécule chimiothérapeutique, le paclitaxel, a été également utilisée. Son efficacité pour induire l'apoptose, ainsi que l'influence de l'hypoxie sur celle-ci ont été étudiées. Le paclitaxel, également appelé taxol, est prescrit en cas de cancers du sein et de l'ovaire, et agit en interférant avec le réseau microtubulaire. Deux types de mesures ont été effectués suite à l'incubation des cellules HepG2 et A549 en présence des agents chimiothérapeutiques en normoxie ou en hypoxie: une mesure de l'apoptose et une mesure de la mort cellulaire globale. L'apoptose a été quantifiée en suivant l'activité de protéases clé du processus apoptotique, les caspases-3 et -7. La mort cellulaire a, quant à elle, été évaluée en quantifiant la libération dans le milieu extracellulaire d'une enzyme cytoplasmique, la lactate déshydrogénase.

1.1) Mesure de l'apoptose

Afin de mesurer l'apoptose suite à l'incubation, durant 16 heures, des deux types cellulaires en normoxie (21 % O₂) ou en hypoxie (1 % O₂), en présence ou non d'étoposide (50 µM) ou de paclitaxel (10 µM) pour les cellules HepG2, en présence ou non d'étoposide (50 µM) pour

les cellules A549, l'activité des caspases-3 et -7 a été mesurée. Ces deux protéases sont des caspases effectrices importantes pour le processus apoptotique puisqu'elles provoquent le clivage de différents substrats cellulaires au cours de celui-ci. Leur activité est mesurée par l'intermédiaire de la fluorescence du fluorochrome AFC, libéré suite au clivage de la molécule Ac-DEVD-AFC par les caspases-3 et -7 (figure 3.1).

Dans les deux types cellulaires, l'étoposide induit une augmentation très hautement significative de l'activité des caspases-3 et -7 en normoxie. Le paclitaxel, par contre, n'augmente l'activité de ces caspases dans les cellules HepG2 en normoxie que très faiblement, mais néanmoins de façon significative. Dans les cellules A549, l'hypoxie seule n'a pas d'effet significatif, alors que dans les cellules HepG2, elle diminue de façon très significative l'activité basale des caspases-3 et -7 par rapport à la normoxie. Cet effet protecteur de l'hypoxie est beaucoup plus marqué lorsque l'activité des caspases est augmentée suite à l'incubation en présence d'étoposide. Dans les cellules HepG2, l'hypoxie possède donc un effet inhibiteur très hautement significatif sur l'activation des caspases-3 et -7. Cet effet protecteur n'est pas observé dans les cellules A549. Concernant l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose induite par le paclitaxel dans les cellules HepG2, il semble que, comme pour l'étoposide, l'hypoxie diminue l'activité des caspases-3 et -7, lesquelles ne sont cependant que très peu activées par cet agent chimiothérapeutique.

1.2) Mesure de la mort cellulaire

Afin de vérifier que l'induction de l'apoptose par l'étoposide engendre bien la mort cellulaire et afin de voir si le taxol provoque la mort des cellules HepG2, la mort cellulaire a été mesurée en suivant la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture. Contrairement à la mesure de l'activité des caspases, réalisée après 16 heures d'incubation, la libération de la LDH a été quantifiée après 40 heures d'incubation dans les différentes conditions étudiées. Cette augmentation du temps d'incubation est nécessaire étant donné que la libération de la LDH, au cours du processus apoptotique, est un phénomène beaucoup plus tardif que l'activation des caspases (figure 3.2).

Dans les cellules A549, les résultats obtenus en suivant la cytotoxicité sont comparables à ceux de l'activité des caspases-3 et -7. En effet, l'hypoxie seule n'a pas d'effet significatif sur la mort cellulaire et l'effet cytotoxique de l'étoposide n'est pas modifié entre une incubation en normoxie et en hypoxie. Pour les cellules HepG2, le profil de mort cellulaire, bien que très similaire à celui obtenu suite à la mesure de l'activité des caspases-3 et -7, comporte malgré tout une différence par rapport à celui-ci. La diminution, en hypoxie, de la mort cellulaire induite par l'étoposide en normoxie, bien que très significative, est inférieure à la diminution de l'activité des caspases-3 et -7 mesurée dans les mêmes conditions. En effet, alors que l'hypoxie prévenait totalement l'activation des caspases, on n'observe ici qu'une diminution d'environ 50 %. Par ailleurs, en normoxie, le paclitaxel est responsable d'une légère augmentation de la mort cellulaire (par rapport à la condition contrôle), similaire à la faible activation des caspases. En hypoxie, la mort cellulaire induite par le paclitaxel est réduite de manière très hautement significative par rapport à celle mesurée en normoxie en présence de cet agent chimiothérapeutique, ce qui avait déjà été observé en suivant l'activité des caspases.

1.3) Effet des molécules chimiothérapeutiques sur le réseau microtubulaire

Le paclitaxel, bien qu'il induise une mortalité des cellules HepG2 statistiquement significative dans les conditions utilisées, semble néanmoins avoir peu d'effet en comparaison à

l'étoposide. En conséquent, étant donné que le mode d'action du paclitaxel consiste en une inhibition de la dynamique des microtubules, l'architecture du réseau microtubulaire a été étudiée par immunofluorescence afin de vérifier que cette molécule a bien l'effet escompté. Les cellules ont été incubées pendant 16 heures en normoxie ou en hypoxie, en présence ou non de paclitaxel (10 μ M). L'effet de l'étoposide (50 μ M) sur l'architecture de ce réseau a également été étudié (figure 3.3). Alors que l'hypoxie et l'étoposide ne semblent pas avoir d'effet sur les microtubules, le paclitaxel provoque une stabilisation de tout le réseau microtubulaire. En effet, alors que le réseau microtubulaire est uniformément réparti dans tout le cytoplasme dans les cellules contrôles, des faisceaux de grande taille, plus épais et en forme d'aiguille apparaissent suite au traitement avec le paclitaxel. L'hypoxie ne semble pas avoir d'effet sur cette stabilisation des microtubules induite par le paclitaxel.

1.4) Conclusion

On observe donc, de manière générale, une correspondance entre les profils d'apoptose et de mort cellulaire obtenus suite à l'incubation des deux types cellulaires en présence d'étoposide. Le paclitaxel, malgré qu'il n'induit qu'une faible activation des caspases-3 et -7 dans les cellules HepG2, provoque néanmoins de la mortalité cellulaire. De plus, comme l'a montré l'étude en immunofluorescence qui a été réalisée, le paclitaxel, dans les conditions utilisées, provoque une inhibition importante de la dynamique du réseau microtubulaire. Cette stabilisation ne semble néanmoins pas influencée par l'hypoxie.

Alors que l'hypoxie n'affecte pas l'efficacité de l'étoposide dans les cellules A549, elle possède dans les cellules HepG2 un effet protecteur sur l'effet des deux molécules chimiothérapeutiques utilisées.

2) Effet de l'hypoxie sur les variations d'expression génique induites par l'étoposide ou le paclitaxel

Afin de comprendre l'effet différentiel de l'hypoxie dans les cellules HepG2 par rapport aux cellules A549, l'expression d'un grand nombre de gènes dont les produits sont impliqués dans le processus apoptotique et sa régulation a été analysée en utilisant des cartes microfluidiques (TLDA, TaqMan Low Density Array) « apoptose ». Les résultats obtenus à l'aide de ces cartes ont dû tout d'abord être validés. Cette validation a été réalisée grâce à la confirmation, par PCR en temps réel, des profils d'expression de certains gènes. Une fois les résultats validés, des gènes, dont l'expression est parallèle aux profils de mort cellulaires obtenus dans les cellules HepG2 et A549, ont été sélectionnés. Les variations d'expression ont été ensuite confirmées à la fois par PCR en temps réel et au niveau protéique par Western blot.

2.1) Analyse de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose par TLDA

Afin d'étudier les variations d'expression de gènes liés à l'apoptose, induites par l'étoposide ou le paclitaxel, ainsi que l'effet de l'hypoxie sur celles-ci, des cartes microfluidiques « apoptose » ont été utilisées. Celles-ci permettent l'étude de l'expression de 96 gènes, 93 liés à l'apoptose et 3 gènes « de ménage » dont l'expression est utilisée pour la normalisation de l'expression des gènes d'intérêt. Parmi les 93 gènes liés à l'apoptose dont l'expression a été étudiée, on retrouve par exemple des gènes codant pour des protéines de la famille Bcl2, pour des récepteurs de mort tels que TNF et FAS ainsi que pour des protéines qui leur sont associées, pour des caspases, pour des protéines IAP (inhibitor of apoptosis), pour des protéines impliquées dans la voie NF κ B, pour des activateurs de p53, pour des protéines

CARD (caspase recruitment domain) ou encore différentes kinases. Une liste de ces 93 gènes, ainsi qu'une brève description de leur fonction, sont reprises en Annexe 1.

Pour ce faire, les cellules HepG2 et A549 ont été incubées durant 16 heures en normoxie ou en hypoxie, avec ou sans étoposide (50 μ M) pour les cellules A549, avec ou sans étoposide (50 μ M) ou paclitaxel (10 μ M) pour les cellules HepG2. Après incubation, l'ARN a été extrait et rétro-transcrit en ADNc. Pour chacune des conditions, l'ADNc correspondant ainsi qu'un mix reprenant les enzymes ainsi que les différents éléments nécessaires pour l'amplification, ont été introduits dans les cartes microfluidiques (voir plan de la carte microfluidique en Annexe 2). Une fois les résultats obtenus, seuls les gènes dont les Ct étaient inférieurs à 35 ont été pris en compte.

Afin de normaliser les résultats obtenus, l'expression de 3 gènes « de ménage » ou HKG (HouseKeeping Genes) a été mesurée en parallèle sur ces mêmes cartes. Il s'agit de l'ARN ribosomal 18S, de la β -actine (ACTB) et de l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). L'expression en ARNm de la GAPDH n'a pas pu être utilisée comme référence pour la normalisation car, en tant que gène cible du facteur de transcription HIF-1, son expression est induite en hypoxie. Afin de choisir entre les deux HKG restant, 18S et ACTB, une expérience de PCR en temps réel classique a été effectuée pour ces deux gènes ainsi que pour 23 kDa, qui est utilisé habituellement au laboratoire comme gène de référence dans les réactions de PCR en temps réel classiques (résultats non montrés). Le gène 18S a été choisi sur base de sa similarité d'expression par rapport au gène 23 kDa, et ce dans les deux types cellulaires, pour normaliser l'expression des 93 gènes liés à l'apoptose. Les résultats normalisés, exprimés en « fold change », sont repris dans le tableau 3.1.

Parmi les 93 gènes dont l'expression a été étudiée, certains sont surexprimés en hypoxie dans les deux types cellulaires. Certains de ces gènes sont déjà connus pour être des gènes cibles de HIF-1. Ils constituent donc de bons contrôles positifs de notre expérience. C'est le cas notamment de BNIP3 (Carrero et al., 2000), BNIP3L (Sowter et al., 2001), MCL1 (Piret et al., 2005) et GAPDH (Graven et al., 1999). En plus de ces trois gènes, les gènes BIRC1, 3, 7, 8 sont surexprimés en hypoxie dans les deux types cellulaires. D'un point de vue général, le nombre de gènes induits par l'hypoxie seule dans les cellules A549 est de loin supérieur au nombre de gènes induits dans les cellules HepG2. En effet, alors que dans les cellules HepG2, seuls 9 gènes parmi les 93 voient leur expression augmentée de plus de 25 % en hypoxie, 35 gènes sont surexprimés de plus de 25 % en hypoxie dans les cellules A549. Ces augmentations d'expression induites par l'hypoxie sont, selon les gènes, influencées ou non par la présence de l'une et/ou de l'autre molécule chimiothérapeutique. En général, les gènes cibles de HIF-1 sont peu influencés par la présence de l'étoposide ou du paclitaxel, à l'exception de MCL1, dont l'expression est fortement augmentée par l'étoposide en hypoxie dans les cellules HepG2. D'autres gènes, comme BIRC7, voient leur expression augmentée par la présence en hypoxie de l'étoposide, alors qu'à l'inverse l'expression de gènes tels que BIRC1 est diminuée en présence de l'étoposide en hypoxie. Concernant les autres gènes, la tendance dans les cellules A549 est une diminution de l'expression induite par l'hypoxie en présence de l'étoposide.

L'hypoxie, en plus d'induire l'expression de certains gènes, réprime l'expression de toute une série d'autres gènes. En effet, dans les cellules HepG2, un grand nombre de gènes sont réprimés en hypoxie. Parmi les 93 gènes dont l'expression a été étudiée, 26 voient leur expression réduite d'au moins 50 % et 58 d'au moins 25 % dans les cellules HepG2. Par

contre dans les cellules A549, seuls 3 gènes voient leur expression réduite d'au moins 50 % (FADD, LRDD, CARD6) et 5 d'au moins 25 %.

Lorsque les cellules sont incubées en présence d'étoposide en normoxie, l'expression en ARNm de 12 gènes dans les cellules A549 et de 26 gènes dans les cellules HepG2 est augmentée de plus de 25 %. Parmi ceux-ci, seuls 6 sont surexprimés dans les deux types cellulaires, il s'agit de BIK, BAX, NALP1, LRDD, FAS et DEDD2. Parmi ceux-ci, BAX, LRDD et FAS sont connus pour être des gènes cibles de p53, qui est le facteur de transcription activé par les dommages à l'ADN engendrés par l'étoposide (Haupt et al., 2003 ; Lin et al., 2000). D'autres gènes cibles de p53 sont également surexprimés en présence d'étoposide mais cette fois seulement dans un des deux types cellulaire, il s'agit de BBC3 (Puma) dans les cellules A549 et de BAK et PMAIP1 (Noxa) dans les cellules HepG2. Lorsqu'un traitement avec l'étoposide est associé à une incubation en hypoxie, l'expression des gènes induits par l'étoposide est modifiée. Alors que la quasi-totalité des gènes induits par l'étoposide dans les cellules A549 voient leur expression encore plus augmentée en hypoxie, l'expression de 22 gènes parmi les 26 induits en présence d'étoposide en normoxie dans les cellules HepG2 est réduite lorsque l'incubation en présence d'étoposide est réalisée en hypoxie. L'incubation des cellules HepG2 en présence de paclitaxel induit dans ces cellules la surexpression de 10 gènes ; ce nombre est cependant plus petit que le nombre de gènes induits dans ces cellules par l'étoposide. Parmi ceux-ci, quatre sont également surexprimés en présence d'étoposide (BAD, CARD15, BCL2 et HIP1). L'effet de l'hypoxie sur l'expression de ces gènes est variable. Néanmoins, dans 70 % des cas, leur induction est diminuée en hypoxie.

2.2) Validation des profils d'expression mesurés par cartes microfluidiques

Afin de valider les résultats obtenus à l'aide des cartes microfluidiques, quatre profils d'expression parmi les 93 obtenus ont été confirmés à l'aide de deux réactions de PCR en temps réel différentes. La première est réalisée à partir des mêmes échantillons d'ADNc que ceux utilisés pour les cartes microfluidiques, et fournit une confirmation technique. La seconde, réalisée à partir d'échantillons d'ADNc rétro-transcrits à partir d'extraits d'ARN provenant d'une expérience indépendante, est utilisée comme confirmation expérimentale. Les gènes dont les profils d'expression ont été confirmés codent pour les protéines de la famille Bcl2 Bnip3, Bax, Bak et Noxa. Ces gènes ont été choisis car leur profil d'expression dans les différentes conditions étudiées sont connus. En effet, Bnip3 est un gène cible du facteur de transcription HIF-1 (Guo et al., 2001) ; il devrait donc être induit en hypoxie. Par contre, Bax, Bak et Noxa, en tant que gènes cibles de p53 (Haupt et al., 2003 ; Pearson et al., 2000 ; Kannan et al., 2001), devraient être surexprimés en cas de dommages à l'ADN, et donc, suite à une incubation en présence d'étoposide.

Dans les deux types cellulaires, ainsi que pour les deux approches expérimentales, l'expression en ARNm de Bnip3 est augmentée de manière importante en hypoxie, et cela en présence ou en absence de molécules chimiothérapeutiques (figure 3.4). Ni l'étoposide, ni le paclitaxel n'influencent son expression en normoxie.

Concernant les gènes cibles de p53, Bax (figure 3.5) et Bak (figure 3.6), les profils obtenus par PCR en temps réel révèlent une augmentation importante de l'expression de leur ARNm suite à une incubation en présence d'étoposide. De plus, à la fois dans les cellules A549 et dans les cellules HepG2, l'hypoxie diminue l'expression de Bax et Bak induite par l'étoposide. Le paclitaxel n'a pas d'effet sur l'expression en ARNm de ces deux gènes dans les cellules HepG2. Celle-ci est néanmoins diminuée lors d'une incubation en hypoxie en présence ou non de paclitaxel. Il faut cependant noter que les profils d'expression de Bax et Bak obtenus par cartes microfluidiques pour les cellules A549 ne correspondent pas aux

profils décrits ci-dessus obtenus par PCR en temps réel en réaction unique. En effet, ni l'expression de Bak, ni celle de Bax ne sont augmentées suite à une incubation en présence d'étoposide. De plus, alors que l'hypoxie seule n'a pas d'effet sur l'expression en ARNm de Bax, associée à l'étoposide, elle augmente l'expression de ce gène en comparaison à une incubation en présence de l'étoposide en normoxie. Cette discordance pourrait peut être s'expliquer par le fait que les amorces utilisées dans les deux mesures sont différentes.

Alors que les variations d'expression en ARNm observées pour Bax et Bak sont comparables entre les deux types cellulaires étudiés, les profils d'expression en ARNm obtenus pour Noxa sont différents entre les cellules HepG2 et A549 (figure 3.7). Dans les cellules A549, l'expression de Noxa induite par l'étoposide en normoxie est encore augmentée lorsque les cellules sont incubées en présence d'étoposide en hypoxie. Dans les cellules HepG2 par contre, l'hypoxie diminue l'expression de Noxa induite par l'étoposide. Cette diminution n'est néanmoins observée que dans une des deux expériences. Le paclitaxel, comme pour Bax et Bak, n'influence pas l'expression de Noxa.

En conclusion, l'étude par PCR en temps réel de l'expression en ARNm de 4 des 93 gènes, montre, dans la plupart des cas, une concordance des résultats obtenus à l'aide des deux techniques. Certaines discordances ont néanmoins parfois été observées.

2.3) Recherche de gènes présentant un profil d'expression intéressant parmi les 93 gènes analysés

Après cette étude préliminaire, et étant donné que, dans la plupart des cas, les résultats obtenus par cartes microfluidiques ont été validés par PCR en temps réel classique, les profils d'expression en ARNm des 93 gènes liés à l'apoptose (tableau 3.1) ont été analysés afin de sélectionner parmi ceux-ci des gènes d'intérêt. Pour être intéressants, ces gènes doivent être des gènes pro-(anti-)apoptotiques dont l'expression est inchangée ou augmentée (diminuée) en hypoxie en présence d'étoposide en comparaison à l'effet de l'étoposide en normoxie dans les cellules A549, mais diminuée (augmentée) en hypoxie en présence d'étoposide ou de paclitaxel en comparaison à l'effet de ces deux molécules chimiothérapeutiques en normoxie dans les cellules HepG2. Les gènes pro-apoptotiques d'intérêt auront donc un profil d'expression parallèle au profil de mortalité et ce, pour chacun des deux types cellulaires, alors que les gènes anti-apoptotiques d'intérêt auront un profil d'expression opposé à celui-ci. Selon ces deux critères, dix gènes candidats ont été sélectionnés. Il s'agit des gènes codant pour PMAIP1 (Noxa), la caspase-3, la caspase-10, Bcl2L11 (Bim), Bik, Pycard, FAS, TRADD, DEDD2 et LRDD.

2.4) Validation de l'expression en ARNm des 10 gènes candidats sélectionnés

Afin de confirmer les variations d'expression en ARNm obtenues par cartes microfluidiques pour les 10 gènes candidats, leur expression a été mesurée par réaction de PCR en temps réel classique. Comme cela a été fait pour la validation des résultats obtenus par cartes microfluidiques, deux PCR en temps réel distinctes ont été réalisées. La première avec les mêmes extraits d'ADNc que ceux utilisés pour les cartes microfluidiques, la seconde avec des extraits d'ADNc rétro-transcrits à partir d'ARN provenant d'une expérience indépendante (tableau 3.2).

L'expression en ARNm du premier gène candidat, **Noxa** (PMAIP1), a déjà été décrite au point 2.2, lors de la validation des résultats des cartes microfluidiques. Il avait déjà en effet retenu notre attention de part l'effet différentiel de l'hypoxie sur l'induction par l'étoposide de

son expression. Dans les cellules HepG2, l'expression de Noxa, tout comme l'apoptose, est diminuée en hypoxie en présence ou non des molécules chimiothérapeutiques utilisées. Dans les cellules A549 par contre, l'expression de Noxa induite par l'étoposide est encore augmentée en hypoxie, laquelle ne protège pas ces cellules de l'apoptose (tableau 3.2). Le profil d'expression de Noxa obtenu par TLDA ayant été confirmé par PCR en temps réel, celui-ci reste candidat pour la suite de notre étude.

Le second gène dont l'expression en ARNm a été vérifiée en PCR en temps réel est le gène codant pour la protéine de la famille Bcl2 Bcl2L11, communément appelée **Bim** (tableau 3.2). Pour les cellules A549, les résultats de la PCR en temps réel réalisée sur les mêmes extraits que ceux utilisés pour l'analyse en cartes microfluidiques montrent une belle corrélation entre les deux techniques. L'hypoxie augmente l'expression de Bim qui ne semble pas influencée par la présence de l'étoposide. Par contre, les résultats obtenus à partir d'extraits d'ADNc différents montrent une diminution de l'expression en ARNm de Bim en hypoxie en présence d'étoposide en comparaison à la même incubation en normoxie. Dans les cellules HepG2, l'hypoxie diminue l'expression de Bim et cela en absence ou en présence des molécules chimiothérapeutiques utilisées. Le profil d'expression de Bim obtenu par TLDA ayant été confirmé par PCR en temps réel, celui-ci reste un candidat potentiel pour expliquer l'effet différentiel de l'hypoxie sur la mort cellulaire induite par les agents chimiothérapeutiques utilisés.

Le troisième gène codant pour une protéine BH3-only, à avoir été étudié est le gène codant pour la protéine **Bik** (tableau 3.2). Les résultats des études d'expression en ARNm réalisées par PCR en temps réel classique sont très similaires à ceux obtenus pour Bim et décrits ci-dessus, à une exception près. Dans les cellules A549, l'expression de Bik, contrairement à celle de Bim, est en effet induite par l'étoposide. Pour les cellules A549, le profil d'expression de Bik obtenu par PCR en temps réel à partir des mêmes extraits d'ADNc que ceux introduits sur cartes microfluidiques, est quasi identique à celui obtenu à partir des cartes. En effet, l'expression de Bik, diminuée par l'hypoxie seule et augmentée par l'étoposide, est encore accentuée lorsque l'incubation en présence d'étoposide est réalisée en hypoxie. Le profil d'expression en ARNm obtenu à partir d'extraits d'ADNc différents, montre par contre une légère diminution de l'expression de Bik entre une incubation en normoxie en présence d'étoposide et la même incubation mais en hypoxie. Pour les cellules HepG2, quel que soit l'extrait utilisé, on observe une diminution de l'expression de Bik en hypoxie, laquelle semble moins influencée par l'étoposide qu'elle ne l'est dans les cellules A549. Le paclitaxel seul n'a pas d'effet sur l'expression de Bik. Etant donné que comme pour Noxa et Bim, le profil d'expression de Bik a été confirmé par PCR en temps réel, celui-ci est retenu pour la suite du travail.

Les protéines BH3-only Noxa, Bim et Bik, lorsqu'elles sont activées en réponse à un stimulus pro-apoptotique, induisent l'activation des protéines Bax et Bak, responsables de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Différents facteurs pro-apoptotiques vont alors être libérés dans le cytoplasme tels que APAF1 et le cytochrome c. Ceux-ci, en permettant la formation de l'apoptosome, vont induire l'activation de la caspase-9, elle-même responsable de l'activation de la **caspase-3** effectrice. Le gène de la caspase-3 est le quatrième gène candidat à avoir été choisi (tableau 3.2). Son expression, dans les cellules A549, est diminuée par l'hypoxie seule ainsi que par l'étoposide dans une des deux expériences. Selon l'expérience, on remarque que celle-ci est soit augmentée, soit inchangée entre une incubation en présence d'étoposide en normoxie et en hypoxie. Dans les cellules HepG2, l'expression de la caspase-3 est diminuée à la fois par l'hypoxie seule et par les deux molécules

chimiothérapeutiques utilisées. De plus, celle-ci est encore diminuée lorsque l'incubation en présence des molécules chimiothérapeutiques est réalisée en hypoxie. Le profil d'expression obtenu par TLDA ayant donc été confirmé, le gène de la caspase-3 est retenu pour la suite.

Une autre caspase dont l'expression a été étudiée de manière plus détaillée est la **caspase-10**. Celle-ci, contrairement à la caspase-3 qui est une caspase effectrice, est une caspase initiateur. Suite à l'activation des récepteurs de mort FAS et TNFR, elle est recrutée au niveau de la membrane plasmique, via une interaction avec différentes protéines adaptatrices, et est activée. Elle est alors responsable de l'activation de différentes caspases effectrices comme la caspase-7 et la caspase-3. Jusqu'à présent, les résultats obtenus par cartes microfluidiques, pour les gènes candidats, ont toujours été confirmés d'un point de vue technique à l'aide de la PCR en temps réel réalisée à partir des mêmes extraits d'ADNc. Cependant pour la caspase-10, dans les cellules A549, cette confirmation n'a pas pu être obtenue (tableau 3.2). En effet, alors que le profil obtenu par carte microfluidique montre une augmentation de l'expression de la caspase-10 en hypoxie en présence d'étoposide en comparaison à l'effet de l'étoposide en normoxie, l'expression en ARNm de la caspase-10 mesurée par PCR en temps réel est diminuée entre ces deux mêmes conditions alors que les mêmes extraits ont été utilisés. Une diminution de l'expression de la caspase-10, induite par l'hypoxie en présence d'étoposide, a également été observée pour la seconde expérience. Dans les cellules HepG2 par contre, le même type de profil d'expression est obtenu à l'aide des deux techniques utilisées, c'est-à-dire une diminution de l'expression de la caspase-10 en hypoxie en présence ou en absence de molécules chimiothérapeutiques. Etant donné que l'expression de ce gène, mesurée par PCR en temps réel, ne présente pas le profil recherché dans les cellules A549, celui-ci ne sera plus étudié par la suite.

Un des récepteurs de mort activé en amont de la caspase-10 est le récepteur **FAS**. Son activation, par liaison du ligand FasL, active la voie extrinsèque d'apoptose. Comme pour les autres gènes candidats, le gène FAS a été retenu car son expression, mesurée par cartes microfluidiques, peut être mise en parallèle avec le profil de mort cellulaire (tableau 3.2). Dans les deux types cellulaires, l'hypoxie seule diminue l'expression de FAS, laquelle est augmentée suite à une incubation en présence d'étoposide, et inchangée suite à une incubation des cellules HepG2 avec le paclitaxel. Dans les cellules A549, les résultats pour la première expérience, obtenus par cartes microfluidiques et par PCR en temps réel, montrent une augmentation en hypoxie de l'expression de FAS induite par l'étoposide. Ces résultats n'ont pas pu être reproduits dans la seconde expérience. En effet, l'expression en ARNm de FAS mesurée à l'aide d'extraits d'ADNc différents de ceux introduits sur cartes, est diminuée en hypoxie en présence d'étoposide par rapport à la normoxie en présence de cette molécule chimiothérapeutique. Dans les cellules HepG2, l'effet inhibiteur de l'hypoxie sur l'expression de FAS induite par l'étoposide est observé pour les deux expériences et ce, quelle que soit la technique utilisée. De plus, cette diminution est de loin supérieure à celle mesurée dans la seconde expérience sur cellules A549 entre une incubation en présence d'étoposide en normoxie et en hypoxie. En conclusion, étant donné la correspondance entre les profils d'expression obtenus par cartes microfluidiques et par PCR en temps réel, le gène FAS continue à être un gène candidat dans l'étude de l'effet différentiel de l'hypoxie sur la mort cellulaire induite par l'étoposide et le paclitaxel.

Pour que la caspase-10 puisse être recrutée suite à l'activation d'un récepteur de mort tel que FAS ou TNFR, celle-ci doit interagir avec des protéines adaptatrices, elles-mêmes liées directement ou non au récepteur de mort. Parmi celles-ci, on retrouve la protéine **TRADD**, qui sert d'intermédiaire entre la protéine FADD liée au récepteur TNFR et les procaspases

initiatrices 8 ou 10. L'expression de TRADD varie de manière très différente dans les cellules A549 par rapport aux cellules HepG2 (tableau 3.2). En effet, dans les cellules A549, l'hypoxie seule augmente l'expression de TRADD, alors qu'elle la diminue ou n'a pas d'effet dans les cellules HepG2. De plus, alors que l'étoposide n'a que peu d'effet sur l'expression en ARNm de TRADD dans les cellules A549, il induit une augmentation de celle-ci dans les cellules HepG2. De la même manière, les réactions de PCR en temps réel classiques ont montré une augmentation de l'expression de TRADD induite par le paclitaxel dans les cellules HepG2. L'effet de l'hypoxie sur l'expression de TRADD en présence d'agents chimiothérapeutiques est également différent. Dans les cellules A549, l'hypoxie, en fonction de l'extrait analysé, soit augmente, soit n'a pas d'effet sur l'expression de TRADD en présence d'étoposide. Dans les cellules HepG2 par contre, l'hypoxie diminue l'expression de TRADD induite par les deux agents chimiothérapeutiques utilisés. Au vu de la concordance entre les résultats de cartes microfluidiques et de PCR en temps réel, la protéine adaptatrice TRADD a été retenue pour la suite de notre étude.

Une autre protéine adaptatrice connue pour interagir avec FADD est la protéine **LRDD** (leucine-rich repeats and death domain containing). Dans les cellules A549, l'effet de l'hypoxie sur l'expression de LRDD varie selon la technique ainsi que selon l'extrait (tableau 3.2). De plus, l'augmentation de l'expression de LRDD induite par l'étoposide, mesurée par cartes microfluidiques, n'est pas confirmée par la PCR en temps réel réalisée à partir des mêmes extraits. Lorsque ces cellules sont incubées en présence d'étoposide en hypoxie, l'expression de LRDD est, selon l'expérience, soit augmentée légèrement, soit inchangée par rapport à celle mesurée en présence d'étoposide en normoxie. Dans les cellules HepG2, l'expression de LRDD est induite par les deux molécules chimiothérapeutiques utilisées et l'hypoxie, seule ou associée à l'étoposide ou au paclitaxel, diminue celle-ci. La diminution de l'expression de LRDD induite par l'hypoxie seule n'a cependant pas été observée dans la PCR de confirmation technique. Il est important de noter également que dans les deux types cellulaires, LRDD est peu exprimé. En effet, les Ct mesurés pour ce gène sont très élevés. C'est pour ces raisons que l'étude de l'expression de ce gène n'a pas été poursuivie.

Parmi les dix gènes candidats sélectionnés, on retrouve également le gène codant pour la protéine **DEDD2** (DED-containing DNA-binding protein 2). DEDD2 fait partie de la famille des protéines contenant un domaine DED (death effector domain) qui comprend également la protéine adaptatrice FADD et les procaspases-8 et -10. DEDD2 est capable, comme son homologue DEDD, d'initier l'apoptose via différents mécanismes. Après translocation au niveau nucléaire, DEDD2 peut induire l'apoptose via l'activation de la caspase nucléaire 6, et via l'inhibition de la transcription dépendante de la polymérase I. Dans le cytosol, DEDD et DEDD2 sont tous les deux capables de lier la caspase-3 ainsi que d'augmenter la dégradation des filaments intermédiaires du cytosquelette. Enfin, il a également été montré que ces deux protéines induisent l'apoptose en interagissant directement avec les caspases-8 et -10 (Valmiki et al., 2008). Dans les cellules A549, l'hypoxie seule diminue légèrement l'expression en ARNm de DEDD2 et l'étoposide l'augmente de plus de deux fois (tableau 3.2). Dans ces cellules, l'hypoxie ne semble pas influencer l'effet de l'étoposide. Dans les cellules HepG2, l'hypoxie seule diminue également l'expression en ARNm de DEDD2 qui, comme dans les cellules A549, est augmentée par l'étoposide. Cependant, contrairement à ce qui est observé dans les cellules A549, l'hypoxie, dans les cellules HepG2, diminue l'effet de l'étoposide. Contrairement à LRDD, les profils obtenus par cartes microfluidiques pour DEDD2 ont bien été confirmés par PCR en temps réel. Celui-ci sera donc étudié plus en détails dans la suite du travail.

Le dernier gène candidat dont l'expression, mesurée par cartes microfluidiques, a été vérifiée par PCR en temps réel classique, est le gène codant pour la protéine **Pycard**, appelée également ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD). Pycard est une protéine adaptatrice possédant un domaine CARD, qui lui permet d'interagir avec des procaspases (Masumoto et al., 1999). Dans les cellules A549, l'hypoxie seule augmente l'expression de Pycard dans une des deux expériences, alors que l'étoposide n'a pas d'effet sur celle-ci (tableau 3.2). L'augmentation de l'expression en ARNm de Pycard induite par l'étoposide, mesurée par TLDA en hypoxie, n'a été confirmée par aucune des PCR en temps réel réalisées. Dans les cellules HepG2, alors que l'étoposide augmente l'expression de Pycard et que le paclitaxel n'a pas d'effet sur celle-ci, l'effet de l'hypoxie seule varie d'une expérience à l'autre. De plus, l'effet inhibiteur de l'hypoxie sur l'expression de Pycard induite par l'étoposide n'est pas reproductible. Pour cette raison, l'étude de Pycard n'a pas été poursuivie.

En conclusion de ces différentes validations, trois gènes candidats parmi les 10 ont été éliminés et ne seront donc plus étudiés par la suite. Il s'agit des gènes codant pour la caspase-10, LRDD et Pycard. La caspase-10 a été éliminée principalement car son expression en ARNm dans les cellules A549, mesurée par PCR en temps réel en présence d'étoposide, est diminuée par l'hypoxie. Ce type de profil est en effet opposé à celui recherché. Etant donné que l'effet inhibiteur de l'hypoxie sur l'expression de Pycard, induite par l'étoposide dans les cellules HepG2, n'est pas reproductible d'une expérience à l'autre, celui-ci a également été éliminé. Enfin, l'élimination de LRDD s'explique essentiellement par son expression en ARNm trop faible.

2.5) Etude de l'expression protéique des différents candidats

Dans le but de vérifier que les variations d'expression en ARNm des sept gènes candidats restants sont bien traduites en variations d'abondance protéique, celle-ci a été étudiée par Western blot. Pour ce faire, les cellules HepG2 et A549 ont été incubées durant 16 heures, en normoxie ou en hypoxie, avec ou sans étoposide (50 μ M) pour les cellules A549, avec ou sans étoposide (50 μ M) ou paclitaxel (10 μ M) pour les cellules HepG2. Après incubation, les protéines ont été extraites selon le protocole d'extraction protéique totale, séparées par électrophorèse et l'abondance de la protéine d'intérêt a été évaluée par Western blot.

L'abondance protéique de **Noxa** (figure 3.8) suit le profil d'expression en ARNm qui a été décrit dans la partie précédente. En effet, dans les deux types cellulaires, l'abondance de Noxa est diminuée par l'hypoxie seule, et fortement augmentée par l'étoposide en normoxie. Dans les cellules A549, l'hypoxie n'a pas d'effet sur l'expression protéique de Noxa induite par l'étoposide. Par contre, dans les cellules HepG2, l'hypoxie inhibe l'effet inducteur de l'étoposide. L'abondance protéique de Noxa reste néanmoins nettement supérieure à celle des cellules contrôles. Le paclitaxel semble augmenter légèrement l'abondance de Noxa. Cet effet est inhibé par l'hypoxie. Les profils d'expression en ARNm de Noxa sont donc traduits en termes de variation d'abondance protéique. Par conséquent, Noxa est retenu pour la dernière partie de l'étude, qui va consister à étudier l'impact d'une inhibition de son expression sur l'apoptose induite par les deux agents chimiothérapeutiques.

Bim possède trois isoformes d'épissage différentes, BimEL (extra long), BimL (long) et BimS (short). BimEL est l'isoforme la plus abondante, et sera celle dont l'expression protéique sera étudiée principalement. Dans les cellules A549, l'abondance de BimEL, qui est diminuée en présence d'étoposide, n'est pas influencée par l'hypoxie. Dans les cellules

HepG2, l'expression protéique de BimEL est diminuée légèrement en présence d'étoposide, mais n'est pas modifiée par le paclitaxel. L'hypoxie seule ne semble pas non plus avoir d'effet sur l'abondance de cette isoforme. Lorsque les cellules HepG2 sont incubées en présence d'étoposide ou de paclitaxel en hypoxie, l'abondance de BimEL est diminuée par rapport à celle mesurée lors d'une incubation en présence de ces molécules en normoxie (figure 3.9). Ces variations d'expression protéique, à l'exception de la diminution d'abondance de BimEL en présence d'étoposide, correspondent au profil d'expression en ARNm de Bim mesuré dans les deux types cellulaires. En conséquent, l'impact sur la mortalité cellulaire de la perte d'expression de Bim, tout comme celle de Noxa, sera étudié dans la dernière partie de ce travail.

Un léger retard de migration électrophorétique de BimEL est observé lorsque les cellules A549 ont été incubées en présence d'étoposide que ce soit en normoxie ou en hypoxie, ainsi que lorsque les cellules HepG2 ont été incubées en présence d'étoposide mais en normoxie uniquement (figure 3.9). Ce retard pourrait être expliqué par une modification post-traductionnelle, comme par exemple une phosphorylation. Afin d'étudier si cette modification entraîne un changement de la localisation intracellulaire de BimEL, des marquages en immunofluorescence ont été réalisés sur les cellules HepG2. Celles-ci ont été incubées durant 16 heures, en normoxie ou en hypoxie, en présence ou non d'étoposide (50 μ M) ou de paclitaxel (10 μ M). Après l'incubation, les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées à l'aide d'un ou de deux anticorps spécifiques. Dans un premier temps, seule la protéine Bim a été marquée. Les images obtenues par microscopie confocale n'ont pas montré de variation d'abondance de Bim ni en hypoxie, ni en présence d'étoposide ou de paclitaxel (résultats non montrés). Ensuite, un co-marquage a été réalisé afin de voir s'il y avait ou non colocalisation de Bim avec les microtubules (figure 3.10). En effet, en conditions basales, BimEL ainsi que BimL sont retenus au niveau du réseau microtubulaire par liaison à la protéine DLC1 (dynein light chain 1) (Hübner et al., 2008). On observe que dans les différentes conditions, Bim est présente principalement dans le noyau et dans la région périnucléaire. Une colocalisation avec les microtubules est observée dans toutes les conditions, cependant de façon localisée et non systématique. L'incubation en présence d'étoposide ou de paclitaxel ne semble pas avoir d'effet sur cette colocalisation. Un second co-marquage a été effectué, cette fois afin d'étudier la possible translocation de Bim au niveau mitochondrial au cours du processus apoptotique. Pour ce faire, des anticorps anti-Tom20, une protéine de la membrane mitochondriale externe, ont été utilisés en même temps que des anticorps anti-Bim (figure 3.11). Les images obtenues par microscopie confocale révèlent une augmentation importante de la colocalisation de Bim et Tom20 suite à l'incubation en présence d'étoposide ou de paclitaxel en comparaison aux conditions contrôle. Celle-ci semble diminuée lorsque les cellules sont incubées avec les molécules chimiothérapeutiques en hypoxie par rapport à une incubation en normoxie. En conclusion, les études en immunofluorescence, bien qu'elles ne montrent pas de variation d'abondance de Bim dans les différentes conditions, révèlent néanmoins la translocation de Bim vers la mitochondrie au cours du processus apoptotique en réponse à une incubation en présence d'étoposide ou de paclitaxel. Cette translocation semble diminuée en hypoxie. Cet effet protecteur de l'hypoxie concorde avec la diminution de mort cellulaire observée lorsque le traitement avec l'étoposide ou le paclitaxel est associé à une incubation en hypoxie.

Au vu des résultats obtenus par Western blot et par immunofluorescence, Bim semble être un candidat très intéressant pour expliquer l'effet différentiel de l'hypoxie sur la mort cellulaire entre les cellules HepG2 et A549. Nous poursuivrons donc l'étude de cette protéine dans la suite du travail.

Dans les cellules A549, l'abondance protéique de **Bik** mesurée par Western blot, n'est modifiée par aucune des conditions testées (figure 3.12). Dans les cellules HepG2,

l'abondance protéique de Bik est diminuée légèrement à la fois par l'hypoxie seule, ainsi que par les deux molécules chimiothérapeutiques utilisées. Lorsqu'un traitement avec l'étoposide ou le paclitaxel est associé à une incubation en hypoxie, on remarque une légère diminution de l'abondance de Bik entre une incubation en présence d'étoposide en normoxie et la même incubation en hypoxie, mais une augmentation de son abondance entre une incubation en présence de paclitaxel en normoxie et en hypoxie. L'augmentation de l'expression en ARNm de Bik en présence d'étoposide dans les cellules A549 ne semble donc pas traduite en une augmentation d'abondance protéique. De plus, l'effet protecteur de l'hypoxie en présence de paclitaxel sur l'expression en ARNm de Bik dans les cellules HepG2 n'est pas observé au niveau protéique. En conséquent, Bik ne sera plus étudié par la suite.

Les anticorps utilisés en Western blot pour détecter la **caspase-3** permettent de faire la différence entre la procaspase-3 (35 kDa) et la grande sous-unité de la caspase-3 clivée toujours liée ou non au pro-domaine (19 et 17 kDa). A la fois dans les cellules A549 et dans les cellules HepG2, l'abondance de la forme totale de la caspase-3 n'est pas modifiée ni par les molécules chimiothérapeutiques utilisées, ni par l'hypoxie. En ce qui concerne la forme clivée, son abondance est augmentée très fortement dans les deux types cellulaires par l'étoposide, mais pas par le paclitaxel utilisé dans les cellules HepG2. Alors que dans les cellules A549, l'hypoxie n'a aucun effet sur le clivage de la caspase-3 induit par l'étoposide, celui-ci est complètement inhibé par l'hypoxie dans les cellules HepG2 (figure 3.13). Ces variations d'abondance de la caspase-3 active correspondent tout à fait aux changements de l'activité des caspases-3 et-7 mesurée dans les différentes conditions (figure 3.1). Cependant, étant donné que les variations d'expression en ARNm de la caspase-3 ne sont pas traduites en termes de variation d'abondance totale de la protéine, celle-ci ne sera plus étudiée par la suite.

La protéine **FAS**, qui est une protéine membranaire, a été extraite à la fois par extraction totale classique et par extraction à l'urée, plus adaptée aux protéines membranaires. Les Western blot réalisés avec ces deux types d'extraits ont donné des résultats similaires. Alors que dans les deux lignées cellulaires, l'abondance de FAS n'est pas modifiée d'une condition à l'autre, sa migration en électrophorèse varie selon le type cellulaire dont provient l'extrait. En effet, nous avons observé que le poids moléculaire apparent de FAS en Western blot est aux alentours de 50 kDa dans les cellules HepG2 et de 40-45 kDa dans les cellules A549, alors que FAS, sous sa forme native, est une protéine de 36 kDa (figure 3.14). Etant donné qu'aucune des variations d'expression en ARNm de FAS, détectées préalablement, n'est traduite au niveau protéique, l'étude de la protéine FAS ne sera pas poursuivie.

Tout comme pour l'abondance de FAS, les variations d'expression en ARNm de **DEDD2** ne sont pas traduites en variations d'abondance protéique. En effet, l'abondance de DEDD2 n'est pas modifiée ni par l'hypoxie, ni par les molécules chimiothérapeutiques utilisées dans les deux types cellulaires (figure 3.15). La protéine DEDD2 n'est donc probablement pas impliquée dans notre problématique. Nous ne poursuivrons donc pas son étude dans la suite du travail.

Etant donné que la protéine **TRADD** n'a pu être révélée par Western blot (résultats non montrés), l'immunofluorescence a été utilisée pour étudier son abondance. Dans les deux types cellulaires (figures 3.16 et 3.17), l'abondance de TRADD ne semble pas être modifiée ni par l'hypoxie, ni par les molécules chimiothérapeutiques utilisées. Les résultats sont cependant très variables d'une image à l'autre et d'une cellule à l'autre. La localisation de TRADD est également assez particulière. En effet, celle-ci semble former des agrégats dans le

cytoplasme. Etant donné que TRADD ne montre pas de variation d'abondance protéique intéressante, elle n'est plus étudiée par la suite.

En conclusion, les protéines Noxa et Bim sont les seules pour lesquelles les variations d'expression en ARNm sont traduites en termes de variation d'expression protéique. En présence de molécules chimiothérapeutiques, l'expression de ces deux protéines pro-apoptotiques est régulée différemment par l'hypoxie entre les cellules A549 et les cellules HepG2. Dans les cellules A549, l'hypoxie ne modifie pas l'abondance de ces protéines observée en présence d'étoposide. Dans les cellules HepG2 par contre, leur abondance est diminuée entre une incubation en présence d'étoposide ou de paclitaxel en normoxie et en hypoxie. Parmi les 10 candidats identifiés sur base des profils d'expression en ARNm mesurés par cartes microfluidiques, Noxa et Bim sont donc les deux seuls réellement intéressants pour la compréhension de l'effet différentiel de l'hypoxie sur la mort cellulaire induite par des agents chimiothérapeutiques.

3) Etude de l'impact de l'invalidation de Noxa ou de Bim sur la protection apportée par l'hypoxie vis-à-vis de l'apoptose induite par l'étoposide ou le paclitaxel dans les cellules HepG2

Bim et Noxa sont deux protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl2 de type BH3-only. Alors que Noxa, en tant que gène cible de p53, est surexprimé en cas de dommages à l'ADN, Bim est activé en réponse à un stress UV, à une privation en cytokines, lors d'une augmentation importante de la concentration en Ca^{2+} , ou suite à un traitement au paclitaxel. L'activation de Bim peut être transcriptionnelle et/ou post-traductionnelle. En effet, l'expression de Bim est activée par des facteurs de transcription dépendants de stress tels que FOXO et AP-1. Lors d'une privation en cytokines, la kinase ERK (Extracellular signal regulated kinase) est inhibée, ce qui augmente la stabilité de Bim. En effet, la phosphorylation de Bim par ERK induit sa dégradation protéasomale. De plus, en cas de stress, comme lors d'un traitement au paclitaxel, la kinase JNK (Jun N-terminal kinase) est activée et est responsable de la phosphorylation des deux isoformes majoritaires de Bim, que sont BimL et BimEL. Cette phosphorylation induit la libération de ces protéines du réseau microtubulaire où elles étaient séquestrées par l'intermédiaire de la protéine DLC1. Une fois libérée, Bim, est alors capable d'interagir avec des protéines anti-apoptotiques pour libérer les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (Puthalakath et al., 1999). Alors que Bim est capable d'inhiber l'ensemble des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl2, Noxa ne peut lier et inhiber que les protéines Mcl1 et A1. Ces deux protéines possèdent donc un potentiel apoptotique différent. Alors que Bim est un puissant inducteur d'apoptose par elle-même, Noxa doit être activée parallèlement à d'autres BH3-only, Bad par exemple, pour être réellement efficace. En effet, Bad est capable d'interagir et d'inhiber Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w, protéines non reconnues par Noxa (Willis et al., 2007). Selon la théorie de l'activation directe par les protéines BH3-only de Bax et Bak, certaines protéines, et c'est le cas de Bim, sont également capables d'interagir directement avec Bax et Bak et d'activer celles-ci, elles seront donc dites «effectrices». Noxa par contre, est une protéine «sensibilisatrice». En effet, n'étant pas capable d'interagir directement avec Bax ou Bak, elle va stimuler l'apoptose en liant certaines protéines anti-apoptotiques, ce qui libère Bax et Bak (cf. figure 1.19).

Bim et Noxa sont les deux seules protéines pro-apoptotiques, parmi les 10 choisies à partir des profils d'expression en ARNm mesurés par cartes microfluidiques, à avoir passé les différentes étapes de validation. Dans la suite du travail, nous avons réalisé une étude

fonctionnelle afin de vérifier leur implication dans la mort cellulaire induite par l'étoposide ou le paclitaxel et dans la protection apportée par l'hypoxie. Pour cela, leur expression a été invalidée au moyen de siRNA (small interfering RNA) spécifiques dans les cellules HepG2, dans lesquelles l'hypoxie a un effet protecteur. L'effet de cette invalidation sur l'apoptose a ensuite été étudié. De plus, l'importance du facteur de transcription p53 dans la régulation de l'expression de Bim et de Noxa a été étudiée via l'invalidation, également au moyen de siRNA, de l'expression de ce facteur.

Les siRNA sont des petits ARN doubles brins de 21 nucléotides qui, dans le cytoplasme, sont reconnus par le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Celui-ci, activé après libération du brin sens du siRNA, va reconnaître un transcrit cible, un ARNm, par appariement des bases nucléiques du transcrit avec celles du brin anti-sens du siRNA. Le transcrit sera alors clivé par une endonucléase associée au complexe RISC puis dégradé. La transfection de siRNA dans les cellules a donc pour conséquence la destruction spécifique des ARN messagers cibles, empêchant toute nouvelle traduction de la protéine codée par ces ARN messagers.

3.1) Etude de l'impact de l'invalidation de Noxa sur la mortalité cellulaire

Afin d'étudier l'influence de l'expression de Noxa sur l'apoptose induite par l'étoposide et le paclitaxel ainsi que sur l'effet protecteur de l'hypoxie dans les cellules HepG2, nous avons invalidé son expression au moyen de siRNA spécifiques. Dans un premier temps, différentes mises au point ont été réalisées afin de savoir tout d'abord à quelle densité les cellules devaient être repiquées, ensuite quel devait être le siRNA utilisé comme contrôle négatif et enfin, quelle durée devait séparer le changement du milieu de transfection de l'incubation des cellules dans les différentes conditions. Ensuite, l'effet de l'invalidation de Noxa sur l'apoptose et la protection des cellules HepG2 par l'hypoxie a été étudié.

3.1.1) Mises au point du protocole de transfection

La première mise au point réalisée concerne la densité cellulaire. En effet, étant donné que la transfection rallonge d'un jour au minimum le protocole d'incubation classique, il a été nécessaire de vérifier que la densité cellulaire qui est donc plus importante au moment de l'incubation, n'interfère pas avec l'effet protecteur de l'hypoxie sur la mort cellulaire induite par les agents chimiothérapeutiques utilisés. Les cellules HepG2 ont été repiquées à la même densité que lors d'un protocole d'incubation classique et mises en présence du milieu de transfection le lendemain, lequel a été remplacé 24 heures après par du milieu de culture complet. Environ 6 heures après le changement de milieu, les cellules ont été incubées durant 16 heures dans les différentes conditions, c'est-à-dire en normoxie ou en hypoxie, avec ou sans étoposide (50 μ M) ou paclitaxel (10 μ M). Après l'incubation, des extraits ont été réalisés afin de mesurer l'activité des caspases-3 et -7. Le profil apoptotique obtenu (résultats non montrés) étant quasi identique à celui obtenu suite à un protocole d'incubation classique (figure 3.1), la densité cellulaire lors du repiquage n'a donc pas été modifiée dans la suite du travail.

La seconde mise au point réalisée concerne la durée de récupération des cellules après le changement du milieu de transfection, ainsi que le choix du siRNA servant de contrôle négatif. En effet, l'incubation peut avoir lieu soit le soir même du jour où le milieu de transfection a été changé, soit le lendemain soir. Ces deux cinétiques doivent être testées étant donné que le temps de demi-vie de la protéine Noxa nous est inconnu. Les cellules HepG2 ont donc été repiquées, puis transfectées le lendemain, soit à l'aide de siRNA Noxa, soit à l'aide

de siRNA servant de contrôle négatif. Trois contrôles négatifs différents ont été testés : les siRNA NTsp (Non-Targeting smart pool), les siRNA NT1 (Non-Targeting 1) et les siRNA RF (RISC-free). Les deux types de siRNA NT se distinguent par le nombre de siRNA différents qui les composent, c'est-à-dire un seul pour le siRNA NT1 et quatre pour le siRNA NTsp. Par contre, les siRNA RISC-free, au lieu de ne cibler aucun ARNm spécifiquement, comme c'est le cas pour les NT, ne sont pas reconnus par le complexe RISC. Les différents siRNA sont utilisés à une concentration de 50 nM et le Dharmafect est utilisé comme agent transfectant. Cette concentration est celle utilisée par Sermeus et al. (2008) et Cosse et al. (2009) pour la transfection, à l'aide de Dharmafect, de cellules HepG2 avec des siRNA. Enfin, afin de contrôler l'influence de la transfection elle-même sur l'expression de Noxa, certaines cellules n'ont pas été transfectées. Vingt-quatre heures après la transfection, le milieu a été changé et remplacé par du milieu de culture complet. Après 6 et 30 heures, les cellules ont été incubées en présence d'étoposide. L'étoposide est en effet nécessaire afin d'induire l'expression de Noxa. Après seize heures d'incubation, des extractions d'ARN ainsi que des extractions protéiques ont été réalisées. L'expression en ARNm et l'abondance protéique de Noxa ont alors pu être mesurées respectivement par PCR en temps réel et par Western blot. Sur base des résultats obtenus (non montrés), la cinétique courte ainsi que le siRNA RISC-free comme contrôle négatif ont été choisis pour la transfection des cellules HepG2 avec les siRNA Noxa. Le choix de la cinétique courte s'explique par une meilleure invalidation de Noxa. Le siRNA RF a quant à lui été choisi car l'expression en ARNm de Noxa, mesurée suite à la transfection des cellules avec celui-ci, est plus proche de l'expression en ARNm de Noxa mesurée dans les cellules non transfectées, que ne l'est l'expression de Noxa mesurée suite à la transfection des cellules avec les siRNA NTsp ou NT1.

Enfin, l'efficacité de l'invalidation de Noxa a été mesurée au niveau de l'ARNm par PCR en temps réel ainsi qu'au niveau protéique par Western blot dans toutes les conditions, c'est-à-dire en normoxie ou en hypoxie, avec ou sans étoposide (50 μ M) ou paclitaxel (10 μ M). Pour ce faire, l'expression en ARNm et protéique de Noxa, suite à son invalidation, a été comparée à celle mesurée en absence de transfection ou suite à la transfection des cellules avec les siRNA RISC-free (figure 3.18). Dans toutes les conditions, à l'exception de l'incubation en normoxie en présence d'étoposide, l'efficacité d'inhibition de l'expression en ARNm de Noxa est supérieure à 90 %. Concernant les cellules incubées en normoxie en présence d'étoposide, l'efficacité d'inhibition moindre, néanmoins de 70 %, s'explique par une abondance beaucoup plus importante des transcrits codants pour Noxa dans cette condition suite à leur induction par cet agent. En ce qui concerne l'abondance protéique de Noxa dans les différentes conditions suite à la transfection avec les siRNA Noxa, on observe que celle-ci est très fortement voire totalement diminuée (figure 3.19). L'absence de diminution de l'expression de Noxa en condition normoxie contrôle est lié à un problème technique survenu lors de la transfection de ces cellules.

3.1.2) Etude de l'impact de l'invalidation de Noxa sur la protection apportée par l'hypoxie vis-à-vis de l'apoptose induite par l'étoposide ou le paclitaxel dans les cellules HepG2

Afin d'étudier l'effet de l'invalidation de Noxa sur l'activité apoptotique mesurée dans les différentes conditions étudiées, l'abondance de la caspase-3 clivée (figure 3.20) et de la protéine PARP-1 clivée (figure 3.21) a été étudiée par Western blot. De plus, l'activité caspase a également été mesurée afin de vérifier que les modifications d'abondance des formes clivées de la caspase-3 et de PARP-1 sont bien corrélées à des modifications d'activité de cette protéase (figure 3.22).

La première protéine pour laquelle l'effet de l'invalidation de Noxa a été étudié dans les cellules HepG2 est la caspase-3, plus particulièrement la forme clivée active de celle-ci (figure 3.20). L'abondance de la procaspase-3 n'est influencée ni par les conditions utilisées, ce qui avait déjà été observé préalablement (figure 3.13), ni par la transfection avec des siRNA quels qu'ils soient. L'activation de la caspase-3 par l'étoposide, mais également par le paclitaxel, et l'inhibition de celle-ci lorsque l'incubation avec ces molécules est réalisée en hypoxie, sont observées dans les cellules contrôles non transfectées, et ont déjà été décrites à l'exception de l'activation de la caspase-3 par le paclitaxel qui n'avait pas été observée précédemment (figure 3.13). Suite à la transfection avec les siRNA Noxa et à l'incubation en présence d'étoposide en normoxie, l'abondance de la caspase-3 clivée est diminuée. Cependant, suite à la transfection avec les siRNA RISC-free, qui servent de contrôle négatif, la même diminution d'abondance est observée. Celle-ci n'est donc pas liée à l'inhibition de l'expression de Noxa, mais bien au processus de transfection en lui-même. Lorsque les cellules sont incubées en présence de paclitaxel, l'abondance de la caspase-3 active en normoxie n'est diminuée ni suite à la transfection avec les siRNA Noxa, ni suite à la transfection avec les siRNA RISC-free. En conclusion, il semble que ni l'abondance de la procaspase-3, ni celle de la caspase-3 active, ne soient influencées spécifiquement par la transfection avec les siRNA Noxa.

La deuxième protéine dont le clivage a été analysé par Western blot est la protéine PARP-1 (figure 3.21). PARP-1 est un substrat bien connu des caspases-3 et -7, et est clivé par celles-ci lors du processus apoptotique. Etudier l'abondance de la forme clivée de PARP-1 est donc un moyen d'évaluer l'activité de ces caspases. Tout comme l'abondance de la procaspase-3, celle de la forme native de PARP-1 n'est pas influencée par la transfection avec les siRNA Noxa. Pour ce qui est de la forme clivée, dont l'abondance dans les cellules contrôles non-transfectées est augmentée suite à l'incubation en normoxie en présence d'étoposide ou de paclitaxel, son abondance est diminuée suite à la transfection avec les siRNA Noxa. Cependant, en présence d'étoposide en normoxie, cette diminution est également observée suite à la transfection avec les siRNA RISC-free. Elle n'est donc pas directement liée à la perte d'expression de Noxa. Par contre, en présence de paclitaxel en normoxie, la diminution d'abondance du clivage de PARP-1 suite à la transfection avec les siRNA RISC-free est légèrement inférieure à la diminution observée suite à la transfection avec les siRNA Noxa. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits ci-dessus concernant le clivage de la caspase-3. La perte d'expression de Noxa ne semble donc avoir aucune influence ni sur le clivage de la caspase-3, ni sur l'activité de celle-ci évaluée par l'intermédiaire du clivage de PARP-1.

Afin de confirmer, en termes d'activité proprement dite, les résultats obtenus par Western blot pour l'abondance de la caspase-3 active et le clivage par celle-ci de la protéine PARP-1, l'activité des caspases-3 et -7 a été mesurée après 16 heures d'incubation en normoxie ou en hypoxie, en présence ou non d'étoposide (50 μ M), suite à la transfection avec les siRNA Noxa (figure 3.22). L'activité mesurée a été comparée à celle obtenue dans les mêmes conditions mais pour des cellules non transfectées ou transfectées à l'aide de siRNA RISC-free. Cette étude d'activité n'a pu être réalisée suite à une incubation en présence de paclitaxel. Les résultats ont montré que l'activité des caspases-3 et -7, fortement induite par l'étoposide en normoxie, est augmentée mais de façon non-significative suite à la transfection avec les siRNA Noxa et très significativement suite à la transfection avec les siRNA RISC-free. Cependant, il n'y a pas de différence d'activité significative entre l'activité mesurée après transfection avec les siRNA Noxa et après transfection avec les siRNA RISC-free. En hypoxie en présence d'étoposide, l'activité caspase qui est mesurée suite à la transfection avec les siRNA Noxa ou les siRNA RISC-free, est également supérieure à celle mesurée dans les mêmes conditions sur des cellules non transfectées. Cependant, l'activité de la caspase-3

mesurée en hypoxie en présence d'étoposide suite à la transfection avec les siRNA Noxa est légèrement augmentée par rapport à celle mesurée suite à la transfection avec les siRNA RISC-free. Cependant, cette augmentation est faible et n'a pas été observée au niveau du clivage de PARP-1.

En conclusion, dans notre modèle, Noxa ne semble pas impliqué dans l'apoptose induite par l'étoposide ou le paclitaxel. En effet, lorsque son expression est inhibée, aucune diminution de l'apoptose induite par ces deux molécules chimiothérapeutiques n'est observée. De plus, l'ensemble de ces résultats nous porte à croire que l'expression différentielle de Noxa n'intervient pas dans l'effet protecteur de l'hypoxie sur la mort cellulaire induite par l'étoposide ou le paclitaxel dans les cellules HepG2, absent des cellules A549. En effet, lorsque son expression est invalidée à l'aide de siRNA spécifiques, ni l'abondance de la caspase-3 clivée, ni son activité ne semblent être affectés de façon spécifique.

3.2) Etude de l'impact de l'invalidation de Bim sur la mortalité cellulaire

Afin d'étudier le rôle de Bim dans l'apoptose des cellules HepG2, son expression a été invalidée au moyen de siRNA spécifiques. Dans un premier temps, différentes mises au point ont été réalisées, afin de savoir tout d'abord à quelle densité les cellules devaient être repiquées, ensuite quel devait être le siRNA utilisé comme contrôle négatif et enfin quelle durée devait séparer le changement du milieu de transfection de l'incubation des cellules dans les différentes conditions. Ensuite, l'effet de l'invalidation de Bim sur la protection des cellules HepG2 apportée par l'hypoxie a été étudié.

3.2.1) Mises au point du protocole de transfection

Tout comme pour la transfection avec les siRNA Noxa, des mises au point ont dû être réalisées avant de pouvoir étudier l'impact de la transfection des siRNA Bim sur l'apoptose des cellules HepG2 incubées en présence d'étoposide ou de paclitaxel. En ce qui concerne le temps de récupération des cellules entre le remplacement du milieu de transfection et l'incubation, la cinétique qui a été choisie est plus longue que celle utilisée pour la transfection des siRNA Noxa. En effet, l'inhibition de l'expression en ARNm et protéique de Bim s'est révélée plus importante lorsque les cellules sont incubées dans les différentes conditions le lendemain soir du jour où le milieu de transfection a été remplacé par du milieu complet (résultats non montrés). En conséquence, étant donné que la cinétique est rallongée d'un jour, la densité cellulaire au départ a dû être modifiée. Alors que les cellules transfectées sont toujours repiquées à une densité de 1.000.000 de cellules/T25, les cellules non transfectées, sont à présent repiquées à une densité deux fois moindre. La transfection étant responsable d'une certaine cytotoxicité, cette différence de densité au départ permet une certaine homogénéité de densité entre les cellules transfectées et non transfectées juste avant de commencer l'incubation en présence d'étoposide. Tout comme pour la transfection avec les siRNA Noxa, le siRNA RF est utilisé comme contrôle négatif.

L'efficacité d'inhibition de l'expression en ARNm de Bim après transfection avec les siRNA spécifiques est importante, et ce pour les différentes conditions d'incubation testées. En effet, celle-ci est toujours supérieure à 85 % (figure 3.23). Cette inhibition d'expression en ARNm est traduite en une diminution d'abondance protéique. Les différentes isoformes de Bim ne sont en effet plus détectées après transfection avec des siRNA Bim (figure 3.24).

3.2.2) Etude de l'impact de l'invalidation de Bim sur la protection apportée par l'hypoxie vis-à-vis de l'apoptose induite par l'étoposide ou le paclitaxel dans les cellules HepG2

Afin d'étudier l'effet de l'invalidation de Bim sur l'apoptose mesurée dans les différentes conditions étudiées, l'abondance des formes clivées de la caspase-3 (figure 3.25) et de la protéine PARP-1 (figure 3.27) a été étudiée par Western blot. De plus, l'activité caspase a également été mesurée afin de vérifier que les modifications d'abondance des formes clivées des protéines caspase-3 et PARP-1 sont bien corrélées à des modifications d'activité de cette protéase (figure 3.28).

La première protéine dont l'abondance a été étudiée par Western blot est la caspase-3 (figure 3.25). En situation contrôle ou suite à la transfection avec les siRNA RISC-free, l'abondance de la procaspase-3 n'est pas modifiée ni par l'hypoxie, ni par l'étoposide ou le paclitaxel. La transfection en elle-même ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de cette protéine. Suite à l'invalidation de Bim, une réduction systématique de l'abondance de la procaspase-3 a été observée dans toutes les conditions. La forme active de la caspase-3 n'a pu être révélée par Western blot. Afin de déterminer si la diminution d'abondance de la procaspase-3 qui est observée suite à la transfection avec les siRNA Bim est le résultat d'une diminution d'expression de son ARNm ou d'une activation accrue de la procaspase-3 en caspase-3, l'expression en ARNm de la caspase-3 a été étudiée par PCR en temps réel (figure 3.26). Les résultats de cette expérience montrent une diminution, dans la plupart des conditions, de l'expression en ARNm de la caspase-3 suite à la transfection avec les siRNA Bim. Il faut de plus noter que l'expression de la caspase-3 des cellules non transfectées ne suit pas le profil d'expression en ARNm décrit précédemment (figure 3.13). En effet, l'expression de la caspase-3 n'est pas diminuée en présence d'étoposide par l'hypoxie. En conclusion, la diminution d'abondance de la procaspase-3 observée en Western blot suite à l'inhibition de l'expression de Bim, peut être en partie expliquée par une diminution de l'expression en ARNm de la caspase-3, mais probablement pas uniquement car celle-ci n'est pas observée dans toutes les conditions.

Toujours dans le but d'étudier l'effet de l'inhibition de l'expression de Bim sur l'apoptose des cellules dans les différentes conditions, mais également de comprendre la diminution d'abondance protéique de la procaspase-3 suite à la transfection avec les siRNA Bim, l'abondance protéique des formes native et clivée de la protéine PARP-1 a été étudiée (figure 3.27). L'abondance de la protéine PARP-1 clivée est en effet utilisée pour évaluer l'activité de la caspase-3, et donc le clivage au cours du processus apoptotique de la procaspase-3 en caspase-3 active. Les résultats obtenus pour l'abondance protéique de la protéine PARP-1 native sont identiques à ceux obtenus pour la procaspase-3. En effet, alors que l'abondance de la forme native de PARP-1 n'est influencée ni par les conditions utilisées ni par la transfection avec les siRNA RISC-free, elle est systématiquement diminuée suite à la transfection avec les siRNA Bim. Cette diminution d'abondance ne peut être expliquée totalement par une augmentation du clivage de PARP-1 par les caspases, étant donné que la forme clivée de PARP-1 n'est pas observée dans toutes les conditions après transfection avec les siRNA Bim. Par exemple, en normoxie seule, alors que l'abondance protéique de la forme native de PARP-1 est diminuée suite à la transfection avec les siRNA Bim, la forme clivée n'est pas détectée. Le clivage de PARP-1 est induit par l'étoposide et le paclitaxel dans les cellules non transfectées, et diminué lorsque les cellules sont incubées en hypoxie. Suite à la transfection avec les siRNA Bim, on observe une augmentation du clivage de PARP-1 en hypoxie seule, non observé en absence de transfection ou suite à une transfection avec les siRNA RISC-free. Alors qu'en normoxie, le clivage de PARP-1 induit par l'étoposide ou le paclitaxel n'est pas influencé par l'absence d'expression de Bim, en hypoxie en présence de ces agents

chimiothérapeutiques, on observe une augmentation de l'abondance de PARP-1 clivé suite à la transfection avec les siRNA Bim.

Afin de confirmer en termes d'apoptose les résultats obtenus par Western blot pour le clivage par les caspases-3 et -7 de la protéine PARP-1, l'activité de ces protéases a été mesurée après 16 heures d'incubation en normoxie ou en hypoxie, en présence ou non d'étoposide (50 μ M), suite à la transfection avec les siRNA Bim (figure 3.28). L'activité mesurée a été comparée à celle obtenue dans les mêmes conditions mais dans des cellules non transfectées ou transfectées à l'aide de siRNA RISC-free. Cette étude d'activité n'a pu être réalisée en présence de paclitaxel. Les résultats montrent que l'activité des caspases-3 et -7, fortement induite par l'étoposide en normoxie, est inhibée de manière très significative suite à la transfection avec les siRNA Bim. La transfection avec les siRNA RF provoque également une diminution de l'activité des caspases mais inférieure à celle occasionnée par les siRNA Bim. La protection apportée par l'hypoxie est perdue suite à la transfection avec les siRNA Bim. En effet, il n'y a plus aucune différence significative d'activité caspase entre des cellules transfectées avec les siRNA Bim incubées en présence d'étoposide en normoxie et en hypoxie. En conclusion, étant donné que l'invalidation de Bim diminue très fortement l'apoptose induite par l'étoposide, on peut donc supposer que Bim est impliqué et important dans celle-ci. De plus, l'invalidation de Bim ramène à un même niveau l'activité caspase mesurée en présence d'étoposide en normoxie et en hypoxie. La protection apportée par l'hypoxie sur l'apoptose induite par l'étoposide a donc été perdue suite à la transfection avec les siRNA Bim.

Etant donné que l'effet de l'invalidation de Bim sur le clivage de PARP-1 n'a pas été confirmé par la mesure de l'activité des caspases-3 et -7, la fragmentation de l'ADN a été mesurée suite à l'incubation durant 24 heures, en normoxie ou en hypoxie et en présence ou non d'étoposide (50 μ M) des cellules HepG2 transfectées avec les siRNA Bim (figure 3.29). Cette mesure, qui permet d'évaluer la mort cellulaire par apoptose, est réalisée dans le but de pouvoir estimer l'impact de l'invalidation de Bim sur l'apoptose induite par l'étoposide et sur l'effet protecteur de l'hypoxie vis-à-vis de celle-ci. En absence d'étoposide, l'invalidation de l'expression de Bim n'a aucun effet sur la fragmentation de l'ADN. Lorsque les cellules sont incubées en présence d'étoposide en normoxie, une augmentation très importante de la fragmentation de l'ADN est mesurée. Suite à l'invalidation de Bim, la fragmentation de l'ADN induite par l'étoposide n'est pas modifiée de manière statistiquement significative par rapport à celle mesurée dans des cellules non transfectées. L'invalidation de Bim ne semble donc avoir aucun effet sur la cytotoxicité de l'étoposide dans les cellules tumorales HepG2. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus suite à l'étude du clivage de PARP-1, augmenté fortement suite à l'incubation en normoxie en présence d'étoposide et non modifié par l'inhibition de l'expression de Bim. L'effet protecteur de l'hypoxie sur l'apoptose induite par l'étoposide n'a malheureusement pas été observé de manière statistiquement significative, ce qui s'explique notamment par la variabilité importante entre les triplicats pour cette condition. Suite à l'invalidation de Bim, la fragmentation de l'ADN, en hypoxie en présence d'étoposide, semble augmentée malgré le fait que d'un point de vue statistique l'augmentation n'est pas significative par rapport aux cellules non transfectées. L'inhibition de l'expression de Bim dans des cellules incubées en présence d'étoposide en hypoxie augmente néanmoins très significativement la fragmentation de l'ADN par rapport à celle mesurée à partir de cellules incubées dans les mêmes conditions mais transfectées avec les siRNA RISC-free. A la fois en normoxie et en hypoxie en présence d'étoposide, il semble que la transfection par elle-même soit responsable d'une diminution de la fragmentation de l'ADN, et donc de l'apoptose induite par l'étoposide. En conclusion, il semble que, comme nous l'indiquait le clivage de PARP-1 étudié par Western blot, Bim n'est pas impliqué dans l'apoptose induite

par l'étoposide dans les cellules HepG2. Néanmoins, suite à une incubation en présence d'étoposide en hypoxie, l'invalidation de Bim augmente l'apoptose causée par cet agent chimiothérapeutique. La protection apportée par l'hypoxie vis-à-vis de l'apoptose induite par l'étoposide est donc diminuée en absence de Bim. La protéine BH3-only Bim posséderait donc, dans les cellules HepG2 incubées en hypoxie en présence d'étoposide, un effet anti-apoptotique.

Afin de confirmer l'effet de l'invalidation de Bim sur l'apoptose en termes de mort cellulaire, une mesure de la libération de la lactate déshydrogénase a été réalisée après transfection des cellules HepG2 avec les siRNA Bim et incubation durant 40 heures en normoxie ou en hypoxie, en présence ou non d'étoposide (50 μ M). En absence d'étoposide, l'invalidation de Bim ne semble pas avoir d'effet significatif sur la mort cellulaire. Celle-ci, fortement augmentée suite à l'incubation des cellules HepG2 non transfectées en présence d'étoposide, n'est pas modifiée de manière statistiquement significative suite à l'inhibition de l'expression de Bim. La protection apportée par l'hypoxie vis-à-vis de la mort cellulaire induite par l'étoposide, observée pour les cellules non transfectées, est toujours présente suite à l'invalidation de Bim, mais néanmoins réduite. En effet, la mort cellulaire des cellules HepG2 incubées en hypoxie en présence d'étoposide est fortement augmentée suite à l'invalidation de Bim et cela de manière spécifique (figure 3.30).

En conclusion, le profil de mort cellulaire obtenu correspond assez bien au clivage de PARP-1 étudié par Western-blot, ainsi qu'à l'apoptose mesurée par l'intermédiaire de la fragmentation de l'ADN. Bim ne semble donc pas intervenir dans l'apoptose induite par l'étoposide étant donné que son invalidation n'affecte ni l'apoptose ni la mort cellulaire induite par cet agent. Par contre, il semble que Bim possède un effet anti-apoptotique en hypoxie en présence d'étoposide. En effet, lorsque son expression est inhibée, l'apoptose induite par l'étoposide en hypoxie est augmentée et la protection apportée par le manque d'oxygène diminuée.

3.3) Etude de l'impact de l'invalidation de p53 sur l'abondance de Noxa et de Bim

En 2009, Cosse et al. ont montré que la protection apportée par l'hypoxie vis-à-vis de l'apoptose et de la mort cellulaire induite par l'étoposide dans les cellules HepG2, pouvait être en partie expliquée par une diminution en hypoxie de l'abondance de p53 augmentée en présence d'étoposide. Par conséquent, étant donné que parmi nos deux gènes candidats, l'un (Noxa) est un gène cible de p53, et l'autre (Bim) est décrit pour ne pas l'être, il nous semblait intéressant de vérifier cette activation transcriptionnelle dans nos conditions expérimentales. Nous avons donc étudié l'impact d'une invalidation de p53 sur l'abondance de ces deux protéines (figure 3.31).

L'abondance de p53, augmentée très fortement par l'étoposide en normoxie, est diminuée de façon importante en hypoxie en présence d'étoposide. Lorsque les cellules sont transfectées avec les siRNA p53, on observe une diminution systématique de l'expression protéique de ce facteur de transcription. L'abondance de Noxa mesurée dans les différentes conditions varie de manière totalement parallèle à celle de p53. En effet, son abondance est augmentée par l'étoposide, diminuée en hypoxie en présence de cet agent chimiothérapeutique et la transfection avec les siRNA p53 réduit de manière quasi-totale son expression. Contrairement à l'expression de Noxa, l'expression de Bim n'est pas réduite suite à la transfection avec les siRNA p53, elle a même tendance à être augmentée dans certaines conditions ; elle est donc bien indépendante de p53.

Etant donné que la protéine Bim semble être impliquée dans l'effet protecteur de hypoxie dans les cellules HepG2 et que son expression n'est pas liée au facteur de transcription p53, on peut donc supposer l'existence d'un autre mécanisme, différent de la diminution

d'abondance en hypoxie en présence d'étoposide du facteur de transcription p53, répondant à l'hypoxie et responsable de la réduction de l'expression de Bim. Cependant, l'effet protecteur de l'hypoxie vis-à-vis de l'apoptose induite par l'étoposide ne semble pas lié directement à la diminution de l'expression de Bim étant donné que dans cette condition Bim a un effet anti-apoptotique. Son expression devrait donc être augmentée.

IV. Discussion, perspectives et conclusion

L'hypoxie, au sein des tumeurs solides, est causée par la prolifération trop rapide des cellules tumorales par rapport au développement de nouveaux vaisseaux sanguins, ainsi que par l'architecture anormale de ceux-ci. En effet, les vaisseaux sanguins tumoraux, en plus d'être distribués irrégulièrement, comportent de nombreuses anomalies structurales telles que des dilatations, des formes aberrantes (allongées, tortueuses,...) ou encore un recouvrement endothélial incomplet (Vaupel et al., 2004). Ce manque en oxygène va induire, par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF-1, une série de réponses cellulaires et moléculaires adaptatives. Ces réponses concernent notamment le métabolisme, le pH, l'angiogenèse, la mort et la survie cellulaire (Brahimi-Horn et al., 2007). Parmi les effets de l'hypoxie sur les cellules tumorales, on retrouve également la résistance aux radio- et chimiothérapies. La résistance des cellules tumorales hypoxiques aux chimiothérapies peut tout d'abord s'expliquer par le fait que certaines drogues nécessitent une oxygénation optimale pour un maximum d'efficacité. De plus, les cellules hypoxiques étant plus éloignées des vaisseaux sanguins, celles-ci sont également moins accessibles. Les cellules tumorales hypoxiques proliférant plus lentement, elles sont également moins sensibles aux chimiothérapies agissant à un moment bien précis du cycle cellulaire (Shannon et al., 2003). Enfin, certaines études ont également montré que des modifications d'expression génique et protéique jouent également un rôle dans cette résistance (Höckel et al., 2001).

Cependant, l'effet protecteur de l'hypoxie sur l'apoptose induite par les chimiothérapies n'est pas présent dans tous les types de cellules cancéreuses. En effet, alors que l'hypoxie inhibe l'apoptose induite par l'étoposide dans les cellules de carcinome hépatique HepG2, elle n'a aucun effet sur les cellules de carcinome pulmonaire A549 et augmente l'efficacité de l'étoposide dans les cellules de cancer du sein MCF-7 (Cosse et al., 2007). Le but de ce travail a été de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de cette différence d'effet de l'hypoxie entre les cellules HepG2 et A549. Pour ce faire, l'expression d'un grand nombre de gènes liés à l'apoptose a été étudiée à l'aide de cartes microfluidiques, afin d'identifier des gènes dont l'expression permettrait d'expliquer les différences de comportement de ces deux lignées cellulaires lorsqu'elles sont exposées à l'hypoxie. Dix gènes pro-apoptotiques dont l'expression dans les cellules A549 est augmentée ou stable entre une incubation en normoxie et en hypoxie en présence d'étoposide, mais dont l'expression dans les cellules HepG2 est diminuée entre une incubation en normoxie et en hypoxie en présence d'étoposide ou de paclitaxel, ont été sélectionnés. Après avoir confirmé les changements d'expression en ARNm et en protéine de ces différents candidats, les siRNA spécifiques ont été utilisés pour inhiber sélectivement l'expression de deux de ces gènes. Les conséquences de l'inhibition de l'expression de ces candidats sur l'apoptose et la mort cellulaire ont été étudiées afin d'évaluer si ces candidats sont réellement impliqués dans l'apoptose induite par l'étoposide ou le paclitaxel et si l'hypoxie exerce son effet protecteur dans les cellules HepG2 en modulant leur expression.

Nous avons montré que, dans les cellules HepG2, l'hypoxie inhibe l'apoptose induite par l'étoposide, alors qu'elle n'a aucun effet sur celle-ci dans les cellules A549. Ces profils apoptotiques ont été confirmés par une étude de cytotoxicité, qui a montré des résultats similaires. Les profils d'activité des caspases-3 et -7 et de mort cellulaire obtenus pour les cellules HepG2 et A549 suite à une incubation en présence d'étoposide, en normoxie ou en hypoxie, correspondent à ceux décrits par Cosse et al. (Cosse et al., 2007) et Sermeus et al. (Sermeus et al., 2008) qui ont utilisé les mêmes concentrations en étoposide et le même degré

d'hypoxie. Cependant, la diminution en hypoxie de la mort cellulaire induite par l'étoposide est inférieure à la diminution de l'activité des caspases-3 et -7 mesurée dans la même condition. Cette différence peut tout d'abord être expliquée par la différence de temps d'incubation en présence de l'étoposide, en normoxie ou en hypoxie, entre les deux types de test. Alors que l'extraction pour la mesure de l'activité des caspase-3 et -7 est réalisée après 16 heures d'incubation, les différents échantillons pour la mesure de la libération de la lactate déshydrogénase sont récupérés après 40 heures d'incubation dans les différentes conditions. De plus, l'apoptose n'est pas le seul mécanisme de mort cellulaire responsable de la cytotoxicité de l'étoposide. L'autophagie semble également fortement impliquée. En effet, Lee et al. ont montré que l'effet cytotoxique de l'étoposide dans les cellules de carcinome utérin était supprimé lorsque celles-ci étaient traitées, en plus de l'étoposide, avec des inhibiteurs de l'autophagie. Lorsque l'étoposide est combiné à un inhibiteur de caspases, sa cytotoxicité est également diminuée. Dans ces cellules, les processus d'apoptose et d'autophagie seraient donc tous deux impliqués dans la mort cellulaire induite par l'étoposide (Lee et al., 2007). Une autre étude, réalisée cette fois à l'aide de fibroblastes embryonnaires de souris Bax/Bak $-/-$, a montré le même type de résultats. En effet, l'étoposide est capable d'induire la mort de ces cellules, résistantes à l'apoptose, en activant fortement l'autophagie (Shimizu et al., 2004).

L'apoptose induite par l'étoposide est le plus souvent associée à l'activation du facteur de transcription p53. Ce facteur de transcription, également appelé gardien du génome, active, en cas de dommages à l'ADN, différentes voies de signalisation amenant à un arrêt du cycle cellulaire, à la réparation des dommages, et si celle-ci n'est pas possible, à la mort cellulaire par apoptose (Bullock et al., 2002). L'étoposide, en inhibant la topoisomérase II, provoque en effet l'apparition de cassures doubles brins, responsables de l'activation de p53 (Montecucco et al., 2007). Une fois activé, p53 induit l'expression de toute une série de gènes, parmi lesquels on retrouve des protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bak et Noxa qui sont toutes les trois des protéines de la famille Bcl2 (Haupt et al., 2003 ; Pearson et al., 2000 ; Kannan et al., 2001).

Alors que dans les cellules HepG2, la cytotoxicité de l'étoposide a été comparée à celle du paclitaxel, dans les cellules A549, cette molécule chimiothérapeutique n'a pas été utilisée étant donné qu'elle n'induit aucune cytotoxicité même à une concentration de 10 μ M (données non publiées). Celle-ci n'a pas été augmentée au-delà afin de rester dans des conditions proches de celles utilisées en clinique. En effet, la concentration en paclitaxel mesurée au niveau plasmatique varie généralement de 0,1 à 10 μ M (Sonnichsen et al., 1998). L'activité de la caspase-3 mesurée suite à l'incubation des cellules HepG2 en normoxie en présence de paclitaxel est très faible. Malgré cela, la mort cellulaire induite en présence d'oxygène par cette molécule chimiothérapeutique, bien qu'inférieure à la cytotoxicité de l'étoposide, est très significativement augmentée par rapport à la condition contrôle. La mort cellulaire induite par le paclitaxel semble secondaire à un arrêt du cycle en mitose, causé par la stabilisation, par le paclitaxel, du réseau microtubulaire (Wang et al., 2000). L'implication des caspases dans la mort cellulaire induite par le paclitaxel est controversée. En effet, plusieurs études ont montré que l'apoptose induite par le paclitaxel, fort dépendante du type cellulaire, était indépendante des caspases (Chen et al., 2008 ; Huisman et al., 2002 ; Ofir et al., 2002). A l'inverse, il a été montré, dans les cellules HepG2, que le paclitaxel induit une diminution de l'abondance de la procaspase-3 et donc une activation de la caspase-3, après 48 heures d'incubation à une concentration de 15 μ g/ml (Brenes et al., 2007). Les différences de durée d'incubation et de concentration utilisées pourraient expliquer l'absence d'activation de la caspase-3 dans nos conditions expérimentales. Lorsque les cellules HepG2 sont incubées en présence de paclitaxel en hypoxie, la mort cellulaire induite par cet agent chimiothérapeutique

est fortement diminuée. L'effet protecteur de l'hypoxie sur la mort cellulaire induite par l'étoposide peut donc être étendu à d'autres molécules chimiothérapeutiques.

Par l'intermédiaire d'une étude de l'expression de gènes liés à l'apoptose, nous avons montré que l'étoposide est responsable de la surexpression d'un certain nombre de gènes, parmi lesquels on retrouve des gènes cibles de p53 tels que FAS (Kannan et al., 2001), BAX (Pearson et al., 2000), NOXA (Haupt et al., 2003), ou encore LRDD (Lin et al., 2000). Alors que dans les cellules HepG2, la surexpression de la plupart de ces gènes est diminuée en hypoxie, le phénomène inverse est observé dans les cellules A549 où l'expression de FAS et BAX est augmentée entre une incubation en présence d'étoposide en normoxie et en hypoxie. Cet effet différentiel de l'hypoxie sur l'expression de gènes induits par l'étoposide peut être expliqué, en ce qui concerne les gènes cibles de p53, par une variation de l'abondance de ce facteur de transcription, induite par l'hypoxie en présence d'étoposide, différente dans les cellules HepG2 et dans les cellules A549. En effet, Cosse et al. ont montré que dans les cellules HepG2, l'expression de p53 induite par l'étoposide en normoxie, était diminuée fortement par l'hypoxie. Par contre, dans les cellules A549, l'expression de p53 n'est pas modifiée entre une incubation en présence d'étoposide en normoxie et en hypoxie (2007). Une autre explication à cet effet différentiel de l'hypoxie sur l'expression des gènes induits par l'étoposide dans les cellules HepG2 et A549 pourrait être une sensibilité différente des deux types cellulaires à l'hypoxie. En effet, une chute plus précoce du niveau en ATP dans les cellules HepG2, et donc de la transcription, pourrait expliquer la diminution générale de l'expression des gènes induits par l'étoposide dans ces cellules. Cette hypothèse doit encore être vérifiée expérimentalement.

En hypoxie, on observe la surexpression de certains gènes, laquelle est dépendante (BNIP3, BNIP3L, GAPDH, MCL1 (Greijer et al., 2005)) ou non (BIRC1, 3, 7, 8) du facteur de transcription HIF-1. L'expression des gènes cibles de HIF-1 semble peu influencée par la présence de l'étoposide ou du paclitaxel. Le même type d'observation a déjà été réalisé préalablement par Sermeus et al. qui ont montré que dans les cellules HepG2, l'étoposide n'influence pas l'activité de HIF-1 (Sermeus et al., 2008). L'hypoxie est également responsable de la diminution de l'expression d'un grand nombre de gènes dans les cellules HepG2. Cette diminution semble moins marquée dans les cellules A549. Par exemple, BAX, qui est un gène pro-apoptotique de première importance, voit son expression diminuer fortement suite à une incubation en hypoxie. Un autre gène dont l'expression est également diminuée par l'hypoxie est BID. Erler et al. ont montré en 2004 que la diminution de son expression en hypoxie est directement dépendante de HIF-1 et de la liaison de celui-ci au niveau de la séquence HRE du promoteur de BID.

Certains gènes pro-apoptotiques dont l'expression a été analysée présentent des profils d'expression qui suivent la même tendance que les profils d'apoptose et de mort cellulaire mesurés dans les cellules HepG2 et A549. Dans les cellules HepG2, leur expression est diminuée entre une incubation en présence d'étoposide ou de paclitaxel en normoxie et la même incubation en hypoxie. Dans les cellules A549 par contre, l'hypoxie ne modifie pas l'expression de ces gènes mesurée en normoxie en présence d'étoposide. Ces gènes sont extrêmement intéressants dans le cadre de notre problématique. Leur expression permettrait en effet de comprendre l'effet différentiel de l'hypoxie sur la mort cellulaire induite par l'étoposide ou le paclitaxel dans les cellules HepG2 et A549.

Parmi ces gènes dont les profils d'expression dans les cellules HepG2 et A549 sont parallèles aux profils apoptotique et de mort cellulaire, très peu présentent une correspondance entre les variations d'expression en ARNm et celles de leur expression protéique. En effet, alors que

les profils d'expression en ARNm de BIK, DEDD2 et FAS, mesurés par cartes microfluidiques et vérifiés par PCR en temps réel, varient de manière parallèle au profil de mort cellulaire, leur abondance protéique n'est modifiée dans aucune des conditions.

Nous avons curieusement observé une différence de migration électrophorétique pour FAS en Western blot entre les cellules HepG2 et A549. En effet, le poids moléculaire apparent de FAS est aux alentours de 50 kDa dans les cellules HepG2 et de 40-45 kDa dans les cellules A549, alors que FAS, sous sa forme native, est une protéine de 36 kDa. Cette différence de migration pourrait s'expliquer par une différence de glycosylation de ce récepteur, connu pour être hautement glycosylé (Gradl et al., 1996).

Par ailleurs, la protéine TRADD n'ayant pu être révélée par Western blot avec l'anticorps utilisé, son abondance ainsi que sa localisation cellulaire ont été étudiées par immunofluorescence. Alors que l'expression en ARNm de TRADD, toute comme celle de BIK, DEDD2 et FAS, est diminuée entre une incubation en normoxie et en hypoxie en présence d'étoposide ou de paclitaxel dans les cellules HepG2 et n'est pas modifiée par l'hypoxie en présence d'étoposide dans les cellules A549, son abondance protéique dans les deux types cellulaires n'est modifiée ni par l'hypoxie, ni par les agents chimiothérapeutiques utilisés. Dans les différentes conditions, on remarque que le marquage en fluorescence associé à TRADD est compact et concentré dans la région périnucléaire. Cette localisation, semblable dans les deux types cellulaires, n'est pas modifiée ni par l'hypoxie, ni par l'étoposide ou le paclitaxel. Ce type de marquage est typique de l'appareil de Golgi, auquel la protéine TRADD serait associée. En effet, Jones et al. (Jones et al., 1999) ont montré, grâce à des études en immunofluorescence, que dans des conditions non-stimulées, les protéines TRADD, cytosoliques, sont principalement localisées dans la région du Golgi médian et du cis-Golgi. Après 1 minute de traitement au TNF, TRADD est transloqué et se retrouve lié à TNFR1 au niveau de la membrane plasmique.

En ce qui concerne la caspase-3, son expression en ARNm dans les différentes conditions varie également de manière similaire aux profils d'apoptose et de mort cellulaire mesurés dans les cellules HepG2 et A549. En effet, elle est diminuée par l'hypoxie en présence d'étoposide ou de paclitaxel dans les cellules HepG2 et augmentée par l'hypoxie en présence d'étoposide dans les cellules A549. Cependant, ni l'hypoxie, ni l'étoposide ou le paclitaxel ne modifient l'abondance de la forme précurseur de cette protéine, et cela dans les deux types cellulaires. En ce qui concerne l'abondance des fragments clivés, celle-ci n'est pas modifiée en présence de paclitaxel, mais fortement augmentée par l'étoposide à la fois dans les cellules HepG2 et A549. Cette augmentation induite par l'étoposide, est inchangée entre une incubation en normoxie et en hypoxie dans les cellules A549, mais complètement inhibée lorsque l'incubation des cellules HepG2 en présence d'étoposide se réalise en hypoxie. Ces variations d'abondance de la forme active de la caspase-3 correspondent aux variations d'activité des caspases-3 et -7 décrites précédemment (figure 3.1). Comme pour les quatre protéines décrites ci-dessus, il semble donc que les variations d'expression en ARNm de la caspase-3 ne soient pas traduites en termes de variation d'expression protéique.

Cette divergence entre les profils d'expression en ARNm et les profils d'expression protéique peut s'expliquer par le fait que l'abondance en ARNm est un faible indicateur de l'abondance de la protéine correspondante. Une analyse réalisée en 2001 en levure, étudiant la corrélation entre le niveau d'expression en ARNm et le niveau d'expression protéique, a montré que pour 72 % des gènes analysés, le ratio niveau d'expression protéique : niveau d'expression en ARNm n'est pas compris dans l'intervalle de confiance, lequel reprend des valeurs jusqu'à deux fois supérieures ou inférieures au ratio moyen. Le même type d'étude a également été réalisé sur cellules de mammifères et sur cellules tumorales, où une corrélation encore plus faible a été observée. Cette divergence entre abondance en ARNm et abondance protéique s'explique par le fait que le contrôle de l'expression se réalise principalement non pas lors de

la transcription mais lors de la traduction (Pradet-Balade et al., 2001). Malgré cela, l'étude du niveau d'expression en ARNm reste le moyen le plus facile et rapide pour étudier simultanément l'expression d'un grand nombre de gènes. Cependant, comme le montrent les études comparant transcriptome et protéome, les niveaux d'expression en ARNm ne peuvent être utilisés seuls comme indicateurs de l'abondance protéique. Par conséquent, des contrôles supplémentaires doivent être réalisés afin de confirmer, au niveau protéique, les variations d'expression en ARNm observées.

Malgré tout, parmi les gènes choisis sur base de leur profil d'expression en ARNm mesuré par cartes microfluidiques et dont l'expression a été validée par PCR en temps réel, deux d'entre eux montrent une concordance entre leur profil d'expression en ARNm et leur profil d'expression protéique dans les cellules HepG2 et les cellules A549.

Ces deux gènes codent pour des protéines pro-apoptotiques BH3-only de la famille des protéines Bcl2 : Noxa (PMAIP1) et Bim (BCL2L11). Toutes les protéines de la famille Bcl2 partagent un ou plusieurs domaines d'homologie appelés BH (Bcl2 homology). Comme leur nom l'indique, les protéines BH3-only sont uniquement composées du domaine BH3. Celui-ci est suffisant pour permettre leur interaction avec la boucle hydrophobe des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl2, constituée des domaines BH-1, -2 et -3. C'est via l'interaction avec ces protéines anti-apoptotiques que les protéines BH3-only une fois activées, vont libérer Bax et Bak et induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Celle-ci peut également être provoquée suite à l'activation directe par des protéines BH3-only des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, directement responsables de la perméabilisation mitochondriale (cf. figure 1.19) (Giam et al., 2009).

Bien que très semblables les unes aux autres d'un point de vue structural, les différentes protéines BH3-only ne sont pas activées par les mêmes stimuli, et ne sont pas toutes capables d'interagir avec les mêmes protéines. Noxa, en tant que gène cible de p53, est surexprimé en cas de dommages à l'ADN, par exemple causés par l'étoposide. Bim par contre, est activé en cas de stress UV, de privation en cytokines ou d'une concentration trop élevée en calcium (Puthalakath & Stasser, 2002 ; Coultas & Stasser, 2003). Alors que certaines protéines BH3-only telles que Puma, un autre gène cible de p53, ou Bim, sont capables d'inhiber l'ensemble des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl2, Noxa ne peut lier et inhiber que les protéines Mcl1 et A1. A l'inverse, Bad, une autre protéine BH3-only, est capable d'interagir uniquement avec Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w. Les protéines BH3-only sont donc différentes dans leur potentiel pro-apoptotique. Si on en croit la théorie de l'activation indirecte par les protéines BH3-only des protéines Bax et Bak, celles-ci seraient activées, une fois que toutes les protéines anti-apoptotiques seraient neutralisées. Cela explique donc pourquoi des protéines telles que Puma ou Bim sont de puissants inducteurs d'apoptose par eux-mêmes, alors que Noxa ou Bad doivent être activés parallèlement pour induire l'apoptose de manière efficace puisque individuellement leur potentiel pro-apoptotique est faible (Willis et al., 2007).

L'expression en ARNm de Noxa, fortement induite par l'étoposide, est diminuée entre une incubation en présence d'étoposide ou de paclitaxel en normoxie et la même incubation en hypoxie dans les cellules HepG2, mais augmentée par l'hypoxie en présence d'étoposide en comparaison à la normoxie en présence de cette même molécule chimiothérapeutique dans les cellules A549. Des variations similaires d'expression ont été observées au niveau protéique. L'inactivation de p53 à l'aide de siRNA spécifiques a montré que l'expression de Noxa est directement dépendante de ce facteur de transcription.

Etant donné le parallélisme entre ce profil d'expression et les profils d'apoptose et de mort cellulaire, l'expression de Noxa a été invalidée au moyen de siRNA spécifiques afin d'étudier l'impact de cette invalidation sur l'apoptose induite par l'étoposide ou le paclitaxel, ainsi que sur l'effet protecteur de l'hypoxie observé dans les cellules HepG2. Après transfection des cellules HepG2 avec les siRNA Noxa et incubation dans les différentes conditions étudiées, l'abondance des formes clivées de la caspase-3 et de PARP-1 a été étudiée par Western blot dans le but d'évaluer l'apoptose. Ni le clivage de la caspase-3, ni celui de PARP-1, induits tous deux par l'étoposide ou le paclitaxel en normoxie et diminués par l'hypoxie, ne sont modifiés de manière spécifique suite à l'invalidation de Noxa. L'inhibition de l'expression de Noxa ne semble donc avoir de conséquence ni sur l'apoptose induite par ces deux molécules, ni sur la protection apportée par l'hypoxie vis-à-vis de l'apoptose induite par celles-ci. Afin de confirmer les résultats obtenus pour le clivage de PARP-1 en termes d'activité caspase, l'effet de l'invalidation de Noxa sur l'activité des caspases-3 et -7 a été étudié. L'invalidation de Noxa ne semble pas non plus modifier ni l'augmentation de l'activité caspase induite par l'étoposide, ni la protection apportée par l'hypoxie.

Dans notre modèle, la protéine BH3-only Noxa ne serait donc pas nécessaire à l'apoptose induite par l'étoposide, et non impliquée dans la protection conférée par l'hypoxie. Un grand nombre d'études traitant de l'induction de l'apoptose par p53 présentent deux de ses gènes cibles, Puma et Noxa, comme des protéines BH3-only pro-apoptotiques essentielles à l'apoptose induite par ce facteur de transcription. Cependant, toutes sont d'accord concernant la moindre importance de Noxa par rapport à Puma dans celle-ci. Alors que l'invalidation de Puma est toujours associée à une protection des cellules vis-à-vis de l'apoptose induite par différents agents causant des dommages à l'ADN, ce n'est pas toujours le cas pour Noxa. En effet, alors que la perte de Puma et de Noxa diminuent l'apoptose induite par des dommages à l'ADN dans des fibroblastes, seule la perte de Puma protège les lymphocytes de la mort cellulaire induite par ces agents (Villunger et al., 2003). La moindre importance de Noxa par rapport à Puma dans l'apoptose induite par p53 s'explique notamment par le fait que Noxa est incapable d'activer directement Bax et Bak, et que, contrairement à Puma qui est capable d'interagir avec l'entièreté des protéines anti-apoptotiques de type Bcl-2, Noxa interagit uniquement avec Mcl1 et A1 (Willis et al., 2007). De plus, étant donné que l'expression de Mcl1 est fortement induite par l'étoposide (Tableau 3.1), on peut supposer que l'action pro-apoptotique de Noxa, même en présence d'étoposide, est maintenue inhibée.

Suite à son activation en cas de stress UV, de privation en cytokines ou d'une concentration trop élevée en calcium (Puthalakath & Stasser, 2002 ; Coultas & Stasser, 2003), l'expression de Bim est augmentée au niveau transcriptionnel et/ou post-traductionnel. L'expression de Bim est activée par des facteurs de transcription dépendants de stress tels que FOXO et AP-1. En conditions basales, Bim est liée au réseau microtubulaire par l'intermédiaire de la protéine DLC1, mais en cas de stress, celle-ci est libérée et est alors capable d'interagir avec des protéines anti-apoptotiques pour libérer les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (Puthalakath et al., 1999).

L'expression en ARNm de Bim, tout comme celle de Noxa, varie de manière similaire aux profils d'apoptose et de mort cellulaire. Dans les cellules A549, l'expression en ARNm de Bim est légèrement augmentée par l'hypoxie et non affectée par l'étoposide. Lorsque l'incubation en présence d'étoposide se réalise en hypoxie, l'expression de Bim est augmentée. Par contre, dans les cellules HepG2, l'hypoxie seule ou en présence d'agents chimiothérapeutiques diminue l'expression de ce gène. Ces variations d'expression en ARNm sont traduites au niveau protéique pour l'isoforme majoritaire de Bim, Bim EL. L'expression

de Bim, contrairement à celle de Noxa, est indépendante du facteur de transcription p53. Nous avons en effet montré que l'invalidation de ce facteur ne diminue pas l'abondance protéique de Bim dans les différentes conditions étudiées. Un autre mécanisme de régulation, indépendant de p53, semble donc impliqué dans la régulation de l'expression de Bim par l'hypoxie en présence ou non de molécules chimiothérapeutiques.

En plus des variations d'abondance de Bim, un retard de migration électrophorétique de BimEL a été observé en Western blot lorsque les cellules A549 ont été incubées en présence d'étoposide que ce soit en normoxie ou en hypoxie, ainsi que lorsque les cellules HepG2 ont été incubées en présence d'étoposide mais en normoxie uniquement. Ce retard pourrait être expliqué par une modification post-traductionnelle de BimEL, comme par exemple une phosphorylation. En effet, BimEL est connue pour être phosphorylée en réponse à différents stimuli par deux kinases principalement, ERK et JNK. La phosphorylation de BimEL par JNK est la seule stimulatrice d'apoptose connue jusqu'à présent. En effet, alors que les différentes phosphorylations possibles de BimEL par ERK stimulent la survie cellulaire en favorisant sa dégradation par le protéasome, sa phosphorylation par JNK libère BimEL du réseau microtubulaire au niveau duquel elle est retenue par l'intermédiaire de la protéine DLC1 (Hübner et al., 2008 ; Ley et al., 2005). Une telle diminution de phosphorylation pourrait expliquer, au moins partiellement l'effet protecteur de l'hypoxie sur l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques dans les cellules HepG2, absent des cellules A549. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser un Western blot avec des anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée par JNK de BimEL. Cependant, ces anticorps n'existant pas encore commercialement, ils devraient être obtenus après purification du sérum obtenu à partir de lapins immunisés au moyen d'un peptide spécifique. C'est ce qu'ont fait Hübner et al. (Hübner et al., 2008) dans leur étude consacrée aux différentes phosphorylations de Bim. Un autre moyen de vérifier que le retard sur gel, observé dans certaines de nos conditions, est dû à une phosphorylation de BimEL par JNK, serait d'incuber les cellules, dans les différentes conditions étudiées, en présence d'un inhibiteur de JNK et d'étudier l'impact de cette inhibition sur le retard sur gel de BimEL.

Etant donné que l'effet de la phosphorylation de BimEL par JNK est connu, c'est-à-dire une libération de la protéine du réseau microtubulaire, nous avons étudié la localisation de Bim en parallèle à celle de l' α -tubuline grâce à des marquages en immunofluorescence. Les images obtenues en microscopie confocale montrent une colocalisation de Bim et de l' α -tubuline dans toutes les conditions, mais néanmoins de manière localisée et non systématique. Le traitement avec les deux agents chimiothérapeutiques utilisés ne semble pas avoir d'effet sur cette colocalisation. La diminution d'abondance de la protéine Bim en hypoxie, observée sur les images de la figure 3.10, n'a pas été observée lorsque la localisation de Bim a été étudiée seule et n'est donc pas reproductible. Toutes les protéines Bim, même en conditions contrôles, ne seraient donc pas séquestrées au niveau du réseau microtubulaire. En plus d'être présentes dans la région périnucléaire, les protéines Bim sont également observées dans le noyau. Suite à leur libération des microtubules en réponse à un signal de stress, les protéines Bim vont interagir avec des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl2 présentes au sein de la membrane mitochondriale externe mais également en membrane nucléaire et du réticulum endoplasmique (Puthalakath et al., 1999). Afin d'étudier l'impact d'une incubation en présence d'étoposide ou de paclitaxel en normoxie ou en hypoxie sur la translocation de Bim en membrane mitochondriale externe, d'autres marquages en immunofluorescence ont été réalisés, cette fois afin de comparer la localisation subcellulaire de Bim à celle d'une protéine mitochondriale, Tom20. La colocalisation de Bim et Tom20, observée faiblement en conditions contrôles, est augmentée fortement suite à l'incubation en présence d'étoposide ou de paclitaxel. Il semble donc bien y avoir translocation de cette protéine pro-apoptotique en

membrane mitochondriale externe en présence de ces molécules chimiothérapeutiques, où elle peut alors interagir avec des protéines comme Bcl2 et les inhiber. En conditions contrôles, il est possible que certaines protéines Bim, comme cela a été décrit dans des lymphocytes T par Zhu et al. (2004), soient déjà associée à Bcl2 ou Bcl-xL. La translocation de Bim en membrane mitochondriale externe induite en présence d'agents chimiothérapeutiques, semble diminuée par l'hypoxie.

En conclusion, l'hypoxie pourrait protéger les cellules HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide et le paclitaxel, à la fois en diminuant l'expression en ARNm et protéique de Bim, mais également en diminuant la translocation de cette protéine en membrane mitochondriale externe en réponse à un stimulus pro-apoptotique.

Afin de confirmer cette hypothèse, l'expression de Bim a été invalidée au moyen de siRNA spécifiques. La transfection des cellules HepG2 avec ces siRNA engendre une diminution quasi complète de l'expression en ARNm et protéique de Bim. Afin d'étudier l'impact de cette invalidation sur l'apoptose induite par l'étoposide ou le paclitaxel ainsi que sur la protection apportée par l'hypoxie, différents moyens pour évaluer l'apoptose ont été utilisés : l'étude de l'abondance de la forme clivée de PARP-1, l'étude de l'activité des caspases-3 et -7, la mesure de la fragmentation de l'ADN et l'étude de la libération de la lactate déshydrogénase qui permet d'évaluer la mortalité cellulaire globale.

Alors que le clivage de PARP-1, dans les cellules non transfectées, est activé par l'étoposide et le paclitaxel et inhibé par l'hypoxie, un clivage accru de cette protéine est observé en hypoxie en présence ou non d'étoposide ou de paclitaxel suite à la transfection avec les siRNA Bim. En normoxie par contre, l'invalidation de Bim n'a aucun effet sur le clivage de PARP-1. Tout comme le clivage de PARP-1, la fragmentation de l'ADN est fortement augmentée en présence d'étoposide et non influencée par l'inhibition de l'expression de Bim en normoxie. En hypoxie en présence d'étoposide, la fragmentation de l'ADN est augmentée suite à l'inhibition de l'expression de Bim, ce qui correspond à l'augmentation du clivage de PARP-1 observée dans cette même condition en Western blot. Par manque de temps, la mesure de la fragmentation de l'ADN n'a pu être réalisée suite à une incubation des cellules HepG2 transfectées avec les siRNA Bim en présence de paclitaxel. Il serait intéressant de vérifier si une même correspondance entre le clivage de PARP-1 et la fragmentation de l'ADN est observée suite à une incubation en présence de paclitaxel, comme c'est le cas en présence d'étoposide. La protéine Bim étant impliquée dans l'apoptose induite par le paclitaxel (Puthalakath et al., 1999), on pourrait s'attendre à une résistance des cellules transfectées avec les siRNA Bim à l'apoptose induite par cette molécule chimiothérapeutique. Or, aucune diminution de l'abondance de la forme clivée de PARP-1 n'a été observée entre des cellules non transfectées et des cellules transfectées avec les siRNA Bim incubées en présence de paclitaxel.

Le profil apoptotique des cellules HepG2 suite à l'invalidation de Bim, obtenu en mesurant l'abondance de la protéine PARP-1 clivée et la fragmentation de l'ADN, a été confirmé au niveau de la mort cellulaire. En effet, la cytotoxicité de l'étoposide dans les cellules HepG2 n'est pas altérée en normoxie suite à l'invalidation de Bim mais augmentée en hypoxie. La protection apportée par l'hypoxie vis-à-vis de la mort cellulaire induite par cette molécule est donc réduite. Par conséquent, bien que l'apoptose et la mort cellulaire induites par l'étoposide ne soient pas dépendantes de la protéine Bim, celle-ci, dans les cellules HepG2 en hypoxie en présence d'étoposide, semble avoir un effet anti-apoptotique. La protéine Bnip3, qui comme Bim est une protéine BH3-only, est connue pour stimuler, dans certaines conditions, la survie cellulaire en favorisant l'autophagie et donc le recyclage d'organites tels que les ribosomes et les mitochondries à des fins de nutrition et de protection (Brahimi-Horn et al., 2007). Bnip3 induit l'autophagie en libérant une autre protéine BH3-only, la Beclin 1, liée en conditions

basales à des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl2. Une fois libérée, celle-ci va induire l'autophagie. D'autres protéines BH3-only telles que Bad et Bik sont également capables d'induire l'autophagie, notamment en libérant, comme le fait Bnip3, la Becline 1 de sa liaison à des protéines anti-apoptotiques (Maiuri et al., 2007 ; Rashmi et al., 2008 ; Lomonosova et al., 2009). On pourrait donc supposer que, dans certaines conditions, suite ou en absence de certaines modifications post-traductionnelles par exemple, Bim puisse se comporter de manière similaire à Bnip3, puisse induire l'autophagie et donc stimuler la survie cellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse, l'autophagie pourrait être mesurée dans les différentes conditions étudiées suite à la transfection de siRNA Bim et comparée à celle mesurée dans des cellules non transfectées ou transfectées avec les siRNA servant de contrôle négatif. Toujours dans le but de vérifier l'effet anti-apoptotique de Bim observé en hypoxie en présence d'étoposide, il serait intéressant, au lieu d'inhiber l'expression de Bim, de surexprimer celle-ci et de voir si l'effet inverse est observé, c'est-à-dire si la protection apportée par l'hypoxie est accrue suite à la surexpression de Bim.

Il semble également que l'invalidation de Bim soit responsable d'une diminution de l'abondance protéique de la procaspase-3 et de la forme native de PARP-1. Ni l'hypoxie, ni l'étoposide ou le paclitaxel n'ont d'influence sur cette diminution. En ce qui concerne la caspase-3, dont l'expression en ARNm a pu être étudiée par PCR en temps réel, il semble que la diminution d'abondance observée suite à l'invalidation de Bim puisse être en partie expliquée par une diminution de son expression en ARNm. Différentes hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette diminution. Une première explication pourrait être la reconnaissance par les siRNA Bim des transcrits codant pour la caspase-3. En effet, il n'est pas rare d'observer certains effets collatéraux suite à la transfection de siRNA. Ceux-ci s'expliquent principalement par le fait que l'appariement entre un siRNA et un transcrit d'ARNm n'a pas besoin d'être parfait pour provoquer la dégradation du transcrit en question. Une deuxième explication à cette diminution pourrait être une implication de Bim dans la stabilisation de certains ARNm dont la dégradation serait augmentée suite à la transfection avec les siRNA Bim. Enfin, étant donné que plusieurs études ont montré que l'expression génique de la caspase-3 était régulée notamment par certaines modifications épigénétiques, un effet de Bim sur les enzymes responsables de ces modifications pourrait également être envisagé comme hypothèse à la diminution de l'expression en ARNm de la caspase-3 suite à l'invalidation de Bim (Wallace et al., 2006 ; Yakovlev et al., 2009). Il serait intéressant de pouvoir mesurer l'expression en ARNm de PARP-1, comme cela a été fait pour la caspase-3, afin de savoir si la diminution d'abondance protéique de sa forme native suite à la transfection avec les siRNA Bim peut s'expliquer également en partie par une diminution de son expression. L'étude de l'expression en ARNm d'un plus grand nombre de gènes, au moyen de cartes microfluidiques par exemple, devrait être également réalisée afin de vérifier que l'expression d'autres gènes n'est pas altérée suite à la transfection de siRNA Bim, comme c'est le cas pour la caspase-3 et peut-être pour PARP-1. Pour savoir si des effets collatéraux associés aux siRNA Bim utilisés pourraient être responsables de l'altération d'expression qui est observée, un autre type de siRNA Bim pourrait être utilisé, lequel serait composé d'un seul siRNA hautement spécifique au lieu du mélange de quatre siRNA différents utilisé dans notre étude. Si malgré cela la diminution de l'expression de la caspase-3 est toujours présente suite à l'inhibition de l'expression de Bim, le mécanisme responsable de celle-ci devra être étudié et identifié.

Les résultats de la mesure de l'activité des caspases-3 et -7, responsables au cours de l'apoptose du clivage de PARP-1, ne correspondent pas à ceux obtenus en étudiant le clivage de PARP-1, la fragmentation de l'ADN et la mort cellulaire. En effet, l'augmentation

d'activité de ces caspases observée suite à une incubation des cellules non transfectées en présence d'étoposide, est diminuée de manière importante suite à la transfection avec les siRNA Bim. Suite à l'invalidation de Bim, la protection apportée par l'hypoxie vis-à-vis de l'activation des caspases induite par l'étoposide est perdue. La différence entre ces résultats et ceux obtenus en mesurant le clivage de PARP-1, la fragmentation de l'ADN et la mort cellulaire, devrait dans un premier temps être vérifiée. En effet, la mesure de l'activité de ces caspases suite à la transfection de siRNA Bim n'a été faite qu'une seule fois. Si cette différence se vérifie, la diminution de l'activité des caspases-3 et -7 pourrait être expliquée par la diminution de leur expression mesurée suite à l'inhibition de l'expression de Bim. En effet, comme nous venons de le mentionner, l'expression en ARNm et protéique de la caspase-3 est diminuée suite à la transfection avec les siRNA Bim. Si cela est vrai, cela signifie que le clivage de PARP-1 et d'ICAD qui maintient l'endonucléase responsable de la fragmentation de l'ADN inactive, est réalisé par une ou plusieurs enzymes différentes des caspases-3 et -7. Etant donné la taille du fragment clivé de PARP-1 observé sur les Western blots réalisés dans cette étude, il semble que l'enzyme responsable de ce clivage soit une caspase. En effet, d'autres enzymes telles que les calpaïnes I et II et la granzyme B sont également capables de cliver PARP-1. Cependant la taille des fragments générés suite au clivage de PARP-1 par ces enzymes est inférieure à la taille du fragment généré par les caspases effectrices (Bhaskara et al., 2009). Bien que seules les caspases-3 et -7 soient reconnues comme responsables du clivage de PARP-1 au cours de l'apoptose, d'autres caspases sont également capables de reconnaître le motif DEVD de PARP-1 et de cliver après celui-ci. En effet, il a été montré qu'*in vitro*, les caspases-2, -4, -6, -8, -9 et -10 sont capables, à hautes concentrations, de cliver PARP-1 (Gu et al., 1995). Cependant, l'implication de ces différentes caspases dans le clivage physiologique de PARP-1 n'a pas encore pu être vérifiée.

La protéine BH3-only Bim, non impliquée dans la cytotoxicité de l'étoposide, semble donc posséder un effet anti-apoptotique en hypoxie en présence d'étoposide. Cet effet pourrait expliquer au moins partiellement l'effet inhibiteur de l'hypoxie vis-à-vis de l'apoptose induite par l'étoposide dans les cellules HepG2. Cependant, l'expression de Bim ne permet pas d'expliquer l'effet protecteur de l'hypoxie étant donné qu'elle est diminuée entre une incubation en présence d'étoposide en normoxie et en hypoxie. Un autre mécanisme, indépendant de p53 et de sa diminution d'abondance en hypoxie en présence d'étoposide, est responsable de cette diminution d'expression. Une différence de localisation subcellulaire, consécutive à une absence de modification post-traductionnelle, pourrait constituer une explication à l'effet anti-apoptotique de Bim observé uniquement en hypoxie en présence d'étoposide. Bim pourrait exercer son effet anti-apoptotique en stimulant l'autophagie, comme le fait Bnip3 une autre protéine BH3-only, laquelle favoriserait la survie cellulaire.

En conclusion, afin de comprendre l'effet différentiel de l'hypoxie dans les cellules tumorales HepG2 et A549, l'impact de l'invalidation de Noxa ou de Bim sur l'apoptose induite par l'étoposide et la protection apportée par l'hypoxie, a été étudié. Noxa et Bim ont été choisis car leur profil d'expression est parallèle aux profils d'apoptose et de mort cellulaire. Malgré leur profil d'expression intéressant, ni Noxa ni Bim ne sont nécessaires à l'apoptose induite par l'étoposide dans les cellules HepG2. En effet, leur invalidation à l'aide de siRNA spécifiques ne diminue pas la cytotoxicité de l'étoposide en normoxie. En hypoxie, l'effet de l'invalidation de Noxa ou de Bim sur la protection apportée par l'hypoxie vis-à-vis de l'apoptose induite par l'étoposide est différent. Alors que l'invalidation de Noxa ne modifie pas la protection apportée par l'hypoxie, celle-ci est diminuée suite à l'invalidation de Bim. En effet, l'inhibition de l'expression de Bim en hypoxie en présence d'étoposide augmente la cytotoxicité de cet agent chimiothérapeutique. Dans les cellules HepG2 en hypoxie en

présence d'étoposide, Bim semble donc posséder un effet anti-apoptotique. Celui-ci pourrait être expliqué par une absence de modification post-traductionnelle de Bim, bien que la nature exacte de celle-ci n'ait pu encore être établie. Un moyen pour Bim de favoriser la survie cellulaire pourrait être l'activation de l'autophagie, laquelle est réalisée dans certaines circonstances par d'autres protéines BH3-only telles que Bnip3. Etant donné que la protéine BH3-only Bim semble impliquée dans la résistance aux chimiothérapies induite par l'hypoxie, celle-ci pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle. L'inhibition de Bim réalisée en parallèle à un traitement chimiothérapeutique standard permettrait en effet d'augmenter leur efficacité en diminuant la résistance induite par l'hypoxie.

V. Bibliographie

- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science **281**(5381): 1322-6.
- Adams, J. M. and S. Cory (2001). "Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family." Trends Biochem Sci **26**(1): 61-6.
- Alvarez-Tejado, M., S. Naranjo-Suarez, et al. (2001). "Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis." J Biol Chem **276**(25): 22368-74.
- Ameltem, O. and E. O. Pettersen (1991). "Cell inactivation and cell cycle inhibition as induced by extreme hypoxia: the possible role of cell cycle arrest as a protection against hypoxia-induced lethal damage." Cell Prolif **24**(2): 127-41.
- Ameri, K., C. E. Lewis, et al. (2004). "Anoxic induction of ATF-4 through HIF-1-independent pathways of protein stabilization in human cancer cells." Blood **103**(5): 1876-82.
- Bao, Q. and Y. Shi (2007). "Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases." Cell Death Differ **14**(1): 56-65.
- Bertolotti, A., Y. Zhang, et al. (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**(6): 326-32.
- Bertout, J. A., S. A. Patel, et al. (2008). "The impact of O₂ availability on human cancer." Nat Rev Cancer **8**(12): 967-75.
- Bhaskara, V. K., S. Challa, et al. (2009). "Differential PARP cleavage: an indication for existence of multiple forms of cell death in human gliomas." Neurol India **57**(3): 264-8.
- Bi, M., C. Naczki, et al. (2005). "ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth." Embo J **24**(19): 3470-81.
- Blagosklonny, M. V. and T. Fojo (1999). "Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review)." Int J Cancer **83**(2): 151-6.
- Brahimi-Horn, M. C., J. Chiche, et al. (2007). "Hypoxia and cancer." J Mol Med **85**(12): 1301-7.
- Brenes, O., F. Arce, et al. (2007). "Characterization of cell death events induced by anti-neoplastic drugs cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil on human hepatoma cell lines: Possible mechanisms of cell resistance." Biomed Pharmacother **61**(6): 347-55.
- Buttgereit, F. and M. D. Brand (1995). "A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells." Biochem J **312** (Pt 1): 163-7.

- Carrero, P., K. Okamoto, et al. (2000). "Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha." Mol Cell Biol **20**(1): 402-15.
- Chen, D., M. Li, et al. (2003). "Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function." J Biol Chem **278**(16): 13595-8.
- Chen, T. S., X. P. Wang, et al. (2008). "Taxol induces caspase-independent cytoplasmic vacuolization and cell death through endoplasmic reticulum (ER) swelling in ASTC-a-1 cells." Cancer Lett **270**(1): 164-72.
- Chipuk, J. E. and D. R. Green (2008). "How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?" Trends Cell Biol **18**(4): 157-64.
- Cosse, J. P. and C. Michiels (2008). "Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression." Anticancer Agents Med Chem **8**(7): 790-7.
- Cosse, J. P., M. Ronvaux, et al. (2009). "Hypoxia-induced decrease in p53 protein level and increase in c-jun DNA binding activity results in cancer cell resistance to etoposide." Neoplasia **11**(10): 976-86.
- Cosse, J. P., A. Sermeus, et al. (2007). "Differential effects of hypoxia on etoposide-induced apoptosis according to the cancer cell lines." Mol Cancer **6**: 61.
- Coultas, L. and A. Strasser (2003). "The role of the Bcl-2 protein family in cancer." Semin Cancer Biol **13**(2): 115-23.
- Deng, X., F. Gao, et al. (2004). "Mono- and multisite phosphorylation enhances Bcl2's antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(1): 153-8.
- Denko, N. C., L. A. Fontana, et al. (2003). "Investigating hypoxic tumor physiology through gene expression patterns." Oncogene **22**(37): 5907-14.
- Dewson, G., T. Kratina, et al. (2008). "To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions." Mol Cell **30**(3): 369-80.
- Dhanasekaran, D. N. and E. P. Reddy (2008). "JNK signaling in apoptosis." Oncogene **27**(48): 6245-51.
- Donepudi, M. and M. G. Grutter (2002). "Structure and zymogen activation of caspases." Biophys Chem **101-102**: 145-53.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.
- Enoch, T. and C. Norbury (1995). "Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM." Trends Biochem Sci **20**(10): 426-30.

- Erler, J. T., C. J. Cawthorne, et al. (2004). "Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance." Mol Cell Biol **24**(7): 2875-89.
- Ewings, K. E., C. M. Wiggins, et al. (2007). "Bim and the pro-survival Bcl-2 proteins: opposites attract, ERK repels." Cell Cycle **6**(18): 2236-40.
- Fels, D. R. and C. Koumenis (2005). "HIF-1alpha and p53: the ODD couple?" Trends Biochem Sci **30**(8): 426-9.
- Ferrara, N. and R. S. Kerbel (2005). "Angiogenesis as a therapeutic target." Nature **438**(7070): 967-74.
- Fong, G. H. and K. Takeda (2008). "Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins." Cell Death Differ **15**(4): 635-41.
- Gewies, A. (2003). "Introduction to apoptosis." ApoReview
- Giam, M., D. C. Huang, et al. (2008). "BH3-only proteins and their roles in programmed cell death." Oncogene **27 Suppl 1**: S128-36.
- Gothié, E., J. Pouyssegur (2002). "HIF-1: régulateur central de l'hypoxie." Médecine/Sciences **18** (1), 70-8.
- Graven, K. K., Q. Yu, et al. (1999). "Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene." Biochim Biophys Acta **1447**(2-3): 208-18.
- Greijer, A. E., P. van der Groep, et al. (2005). "Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)." J Pathol **206**(3): 291-304.
- Greijer, A. E. and E. van der Wall (2004). "The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis." J Clin Pathol **57**(10): 1009-14.
- Gu, Y., C. Sarnecki, et al. (1995). "Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by interleukin-1 beta converting enzyme and its homologs TX and Nedd-2." J Biol Chem **270**(32): 18715-8.
- Guo, K., G. Searfoss, et al. (2001). "Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3." Cell Death Differ **8**(4): 367-76.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hansson, L. O., A. Friedler, et al. (2002). "Two sequence motifs from HIF-1alpha bind to the DNA-binding site of p53." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10305-9.
- Hardie, D. G. (2000). "Metabolic control: a new solution to an old problem." Curr Biol **10**(20): R757-9.

- Harding, H. P., Y. Zhang, et al. (2003). "An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress." Mol Cell **11**(3): 619-33.
- Haupt, S., M. Berger, et al. (2003). "Apoptosis - the p53 network." J Cell Sci **116**(Pt 20): 4077-85.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-6.
- Henry-Mowatt, J., C. Dive, et al. (2004). "Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer." Oncogene **23**(16): 2850-60.
- Hockel, M. and P. Vaupel (2001). "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." J Natl Cancer Inst **93**(4): 266-76.
- Hu, C. J., L. Y. Wang, et al. (2003). "Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation." Mol Cell Biol **23**(24): 9361-74.
- Hubner, A., T. Barrett, et al. (2008). "Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity." Mol Cell **30**(4): 415-25.
- Hue, L. and M. H. Rider (1987). "Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues." Biochem J **245**(2): 313-24.
- Huisman, C., C. G. Ferreira, et al. (2002). "Paclitaxel triggers cell death primarily via caspase-independent routes in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460." Clin Cancer Res **8**(2): 596-606.
- Jones, S. J., E. C. Ledgerwood, et al. (1999). "TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNF-R1." J Immunol **162**(2): 1042-8.
- Kaelin, W. G., Jr. (2005). "The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing." Biochem Biophys Res Commun **338**(1): 627-38.
- Kaelin, W. G., Jr. and P. J. Ratcliffe (2008). "Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway." Mol Cell **30**(4): 393-402.
- Kallio, P. J., K. Okamoto, et al. (1998). "Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha." Embo J **17**(22): 6573-86.
- Kaluz, S., M. Kaluzova, et al. (2008). "Regulation of gene expression by hypoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element." Clin Chim Acta **395**(1-2): 6-13.
- Kannan, K., N. Amariglio, et al. (2001). "DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53." Oncogene **20**(18): 2225-34.

- Karpinich, N. O., M. Tafani, et al. (2002). "The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c." J Biol Chem **277**(19): 16547-52.
- Ke, Q. and M. Costa (2006). "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)." Mol Pharmacol **70**(5): 1469-80.
- Kemp, B. E., K. I. Mitchelhill, et al. (1999). "Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase." Trends Biochem Sci **24**(1): 22-5.
- Khosravi-Far, R. and M. D. Esposti (2004). "Death receptor signals to mitochondria." Cancer Biol Ther **3**(11): 1051-7.
- Koshiji, M., Y. Kageyama, et al. (2004). "HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc." Embo J **23**(9): 1949-56.
- Koumenis, C., C. Naczki, et al. (2002). "Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha." Mol Cell Biol **22**(21): 7405-16.
- Koumenis, C. and B. G. Wouters (2006). ""Translating" tumor hypoxia: unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways." Mol Cancer Res **4**(7): 423-36.
- Kraggerud, S. M., J. A. Sandvik, et al. (1995). "Regulation of protein synthesis in human cells exposed to extreme hypoxia." Anticancer Res **15**(3): 683-6.
- Kunz, M., S. Ibrahim, et al. (2001). "Activation of c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is critical for hypoxia-induced apoptosis of human malignant melanoma." Cell Growth Differ **12**(3): 137-45.
- Lee, J. W., S. H. Bae, et al. (2004). "Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions." Exp Mol Med **36**(1): 1-12.
- Lee, S. B., S. Y. Tong, et al. (2007). "Caspase-independent autophagic cytotoxicity in etoposide-treated CaSki cervical carcinoma cells." DNA Cell Biol **26**(10): 713-20.
- Ley, R., K. E. Ewings, et al. (2005). "Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK." Cell Death Differ **12**(8): 1008-14.
- Lin, Y., W. Ma, et al. (2000). "Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis." Nat Genet **26**(1): 122-7.
- Lindsten, T., A. J. Ross, et al. (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." Mol Cell **6**(6): 1389-99.
- Liu, C. Y. and R. J. Kaufman (2003). "The unfolded protein response." J Cell Sci **116**(Pt 10): 1861-2.

- Lomonosova, E. and G. Chinnadurai (2008). "BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview." Oncogene **27 Suppl 1**: S2-19.
- Lu, P. D., H. P. Harding, et al. (2004). "Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response." J Cell Biol **167**(1): 27-33.
- Magagnin, M. G., M. Koritzinsky, et al. (2006). "Patterns of tumor oxygenation and their influence on the cellular hypoxic response and hypoxia-directed therapies." Drug Resist Updat **9**(4-5): 185-97.
- Maiuri, M. C., G. Le Toumelin, et al. (2007). "Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1." Embo J **26**(10): 2527-39.
- Marchenko, N. D. and U. M. Moll (2007). "The role of ubiquitination in the direct mitochondrial death program of p53." Cell Cycle **6**(14): 1718-23.
- Marsin, A. S., L. Bertrand, et al. (2000). "Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia." Curr Biol **10**(20): 1247-55.
- Marzo, I., C. Brenner, et al. (1998). "Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis." Science **281**(5385): 2027-31.
- Masumoto, J., S. Taniguchi, et al. (1999). "ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells." J Biol Chem **274**(48): 33835-8.
- Michiels, C. (2004). "Physiological and pathological responses to hypoxia." Am J Pathol **164**(6): 1875-82.
- Montecucco, A. and G. Biamonti (2007). "Cellular response to etoposide treatment." Cancer Lett **252**(1): 9-18.
- Norbury, C. J. and B. Zhivotovsky (2004). "DNA damage-induced apoptosis." Oncogene **23**(16): 2797-808.
- Nunez, G., M. A. Benedict, et al. (1998). "Caspases: the proteases of the apoptotic pathway." Oncogene **17**(25): 3237-45.
- Ofir, R., R. Seidman, et al. (2002). "Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent." Cell Death Differ **9**(6): 636-42.
- Pearson, A. S., F. R. Spitz, et al. (2000). "Up-regulation of the proapoptotic mediators Bax and Bak after adenovirus-mediated p53 gene transfer in lung cancer cells." Clin Cancer Res **6**(3): 887-90.
- Peter, M. E. and P. H. Krammer (2003). "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond." Cell Death Differ **10**(1): 26-35.

- Piret, J. P., E. Minet, et al. (2005). "Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis." J Biol Chem **280**(10): 9336-44.
- Piret, J. P., D. Mottet, et al. (2002). "Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein?" Biochem Pharmacol **64**(5-6): 889-92.
- Pop, C. and G. S. Salvesen (2009). "Human caspases: activation, specificity, and regulation." J Biol Chem **284**(33): 21777-81.
- Pradet-Balade, B., F. Boulme, et al. (2001). "Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics?" Trends Biochem Sci **26**(4): 225-9.
- Puthalakath, H., D. C. Huang, et al. (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex." Mol Cell **3**(3): 287-96.
- Puthalakath, H. and A. Strasser (2002). "Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins." Cell Death Differ **9**(5): 505-12.
- Rang, H. P., M. M. Dall, et al. (1999). In Pharmacology, 4th edn. Churchill Livingstone: Edinburgh, 670-77.
- Rashmi, R., S. G. Pillai, et al. (2008). "BH3-only protein BIK induces caspase-independent cell death with autophagic features in Bcl-2 null cells." Oncogene **27**(10): 1366-75.
- Reed, J. C. (1997). "Double identity for proteins of the Bcl-2 family." Nature **387**(6635): 773-6.
- Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 897-907.
- Rocha, S. (2007). "Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription." Trends Biochem Sci **32**(8): 389-97.
- Romero-Ramirez, L., H. Cao, et al. (2004). "XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth." Cancer Res **64**(17): 5943-7.
- Roos, W. P. and B. Kaina (2006). "DNA damage-induced cell death by apoptosis." Trends Mol Med **12**(9): 440-50.
- Ryan, K. M., A. C. Phillips, et al. (2001). "Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 332-7.
- Saikumar, P., Z. Dong, et al. (1998). "Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury." Oncogene **17**(26): 3401-15.

- Saraste, A. and K. Pulkki (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis." Cardiovasc Res **45**(3): 528-37.
- Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(10): 721-32.
- Semenza, G. L. (2009). "Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1." Semin Cancer Biol **19**(1): 12-6.
- Sermeus, A., J. P. Cosse, et al. (2008). "Hypoxia induces protection against etoposide-induced apoptosis: molecular profiling of changes in gene expression and transcription factor activity." Mol Cancer **7**: 27.
- Shannon, A. M., D. J. Bouchier-Hayes, et al. (2003). "Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies." Cancer Treat Rev **29**(4): 297-307.
- Shen, H. M. and V. Tergaonkar (2009). "NFkappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy." Apoptosis **14**(4): 348-63.
- Shimizu, S., T. Kanaseki, et al. (2004). "Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes." Nat Cell Biol **6**(12): 1221-8.
- Sonnichsen, D. S. and M. V. Relling (1998). "Paclitaxel and docetaxel. " In: Grochow LB Ames AM, editors; A clinician's guide to chemotherapy pharmacokinetics and pharmacodynamics; Baltimore: Williams & Wilkins; 375-94.
- Sowter, H. M., P. J. Ratcliffe, et al. (2001). "HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors." Cancer Res **61**(18): 6669-73.
- Suzuki, H., A. Tomida, et al. (2001). "Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia." Oncogene **20**(41): 5779-88.
- Swietach, P., R. D. Vaughan-Jones, et al. (2007). "Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9." Cancer Metastasis Rev **26**(2): 299-310.
- Tredan, O., C. M. Galmarini, et al. (2007). "Drug resistance and the solid tumor microenvironment." J Natl Cancer Inst **99**(19): 1441-54.
- Valmiki, M. G. and J. W. Ramos (2009). "Death effector domain-containing proteins." Cell Mol Life Sci **66**(5): 814-30.
- Vaseva, A. V. and U. M. Moll (2009). "The mitochondrial p53 pathway." Biochim Biophys Acta **1787**(5): 414-20.
- Vattem, K. M. and R. C. Wek (2004). "Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11269-74.
- Vaupel, P. and L. Harrison (2004). "Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response." Oncologist **9 Suppl 5**: 4-9.

- Vaupel, P., O. Thews, et al. (2001). "Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia." Med Oncol **18**(4): 243-59.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele, et al. (2005). "Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer." Ann Hematol **84**(10): 627-39.
- Villunger, A., E. M. Michalak, et al. (2003). "p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa." Science **302**(5647): 1036-8.
- Walker, L. J., R. B. Craig, et al. (1994). "A role for the human DNA repair enzyme HAP1 in cellular protection against DNA damaging agents and hypoxic stress." Nucleic Acids Res **22**(23): 4884-9.
- Wallace, D. M., M. Donovan, et al. (2006). "Histone deacetylase activity regulates apaf-1 and caspase 3 expression in the developing mouse retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(7): 2765-72.
- Wang, T. H., H. S. Wang, et al. (2000). "Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together." Cancer **88**(11): 2619-28.
- Wenger, R. H., D. P. Stiehl, et al. (2005). "Integration of oxygen signaling at the consensus HRE." Sci STKE **2005**(306): re12.
- Willis, S. N., J. I. Fletcher, et al. (2007). "Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak." Science **315**(5813): 856-9.
- Wouters, B. G. and M. Koritzinsky (2008). "Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer." Nat Rev Cancer **8**(11): 851-64.
- Wouters, B. G., T. van den Beucken, et al. (2005). "Control of the hypoxic response through regulation of mRNA translation." Semin Cell Dev Biol **16**(4-5): 487-501.
- Yakovlev, A., M. Khafizova, et al. (2009). "Epigenetic regulation of caspase-3 gene expression in rat brain development." Gene.
- Yang, Y. and X. Yu (2003). "Regulation of apoptosis: the ubiquitous way." Faseb J **17**(8): 790-9.
- Yasuda, H. (2008). "Solid tumor physiology and hypoxia-induced chemo/radio-resistance: novel strategy for cancer therapy: nitric oxide donor as a therapeutic enhancer." Nitric Oxide **19**(2): 205-16.
- Zhang, K. and R. J. Kaufman (2006). "Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response." Handb Exp Pharmacol(172): 69-91.
- Zhou, J., T. Schmid, et al. (2006). "Tumor hypoxia and cancer progression." Cancer Lett **237**(1): 10-21.

Zhu, Y., B. J. Swanson, et al. (2004). "Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(20): 7681-6.

Zimmermann, K. C., C. Bonzon, et al. (2001). "The machinery of programmed cell death." Pharmacol Ther **92**(1): 57-70.

Annexe 1: Liste des 96 gènes dont l'expression est étudiée par les cartes microfluidiques (TLDA) apoptose.

Abbreviation	Name	Synonyms	Function
18S	Eukaryotic 18S rRNA	No synonyms	The 18 S rRNA is the rRNA of the small ribosomal subunit of eukaryotes. The function of the rRNA is to provide a mechanism for decoding mRNA into amino acids and to interact with the tRNAs during translation by providing peptidyl transferase activity.
ACTB	Actin, beta	PS1TP5BP1	This gene encodes one of six different actin proteins. This actin is a major constituent of the contractile apparatus and one of the two nonmuscle cytoskeletal actins.
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1	APAF-1, CED4, DKFZp781B1145	This gene encodes a cytoplasmic protein that initiates apoptosis. This protein contains several copies of a caspase recruitment domain (CARD), and an ATPase domain. Upon binding cytochrome c and dATP, this protein forms an oligomeric apoptosome.
BAD	BCL2-associated agonist of cell death	BBC2, BCL2L8	The protein encoded by this gene is a member of the BCL-2 family. BCL-2 family members are known to be regulators of programmed cell death. This protein positively regulates cell apoptosis by forming heterodimers with BCL-xL and BCL-2, and reversing their death repressor activity. Proapoptotic activity of this protein is regulated through its phosphorylation. Protein kinases AKT and MAP kinase, as well as protein phosphatase calcineurin, were found to be involved in the regulation of this protein. Alternative splicing of this gene results in two transcript variants which encode the same isoform.
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	BAK, CDN1, BCL2L7, MGC3887, BAK-LIKE, MGC117255,	The proapoptotic protein encoded by this gene belongs to the BCL2 protein family. It interacts with and accelerates the opening of the mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC), which leads to a loss in membrane potential and the release of cytochrome c. This protein also interacts with the tumor suppressor p53 after exposure to cell stress.

BAX	BCL2-associated X protein	BCL2L4	The protein encoded by this gene belongs to the BCL2 protein family. This protein forms a heterodimer with BCL2, and functions as an apoptotic activator. This protein is reported to interact with, and increase the opening of the VDAC, which leads to the loss in membrane potential and the release of cytochrome c. The expression of this gene is regulated by the tumor suppressor p53 and has been shown to be involved in p53-mediated apoptosis. Multiple alternatively spliced transcript variants, which encode different isoforms, have been reported for this gene.
BBC3	BCL2 binding component 3	JFY1, PUMA	BBC3 is transcriptionally induced upon diverse apoptotic stimuli to induce apoptosis via the mitochondrial apoptotic pathway. BBC3 is transcriptionally activated by p53; it is also upregulated after endoplasmic reticulum stress, independently to P53 status. BBC3 is also transactivated by p73, a p53 related protein with, also, G1 cell cycle arrest and apoptosis functions. BBC3 induces BAX conformational change and multimerization.
BCAP31	B-cell receptor-associated protein 31	CDM, BAP31, 6C6-AG, DXS1357E	The protein encoded by this gene may play a role in anterograde transport of membrane proteins from the endoplasmic reticulum to the Golgi and may be involved in CASP8-mediated apoptosis.
BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10	CLAP, mE10, CIPER, c-E10, CARMEN	This gene was identified by its translocation in a case of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. The protein encoded by this gene contains a caspase recruitment domain (CARD), and has been shown to induce apoptosis and to activate NFκB. This protein is reported to interact with other CARD domain containing proteins, which are thought to function as upstream regulators in NFκB signalling. This protein is found to form a complex with MALT1, a protein encoded by another gene known to be translocated in MALT lymphoma. MALT1 and this protein are thought to synergize in the activation of NFκB, and the deregulation of either of them may contribute to the same pathogenetic process that leads to the malignancy.
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl-2	This gene encodes an integral outer mitochondrial membrane protein that blocks the apoptotic death of some cells such as lymphocytes. Constitutive expression of BCL2, such as in the case of translocation of BCL2 to Ig heavy chain locus, is thought to be the cause of follicular lymphoma.

BCL2A1	BCL2-related protein A1	GRS, BFL1, ACC-1, ACC-2, HBPA1 BCL2L5	The protein encoded by this gene is a member of the BCL-2 family. This protein is able to reduce the release of pro-apoptotic cytochrome c from mitochondria and block caspase activation. This gene is a direct transcription target of NFκB in response to inflammatory mediators, and is up-regulated by different extracellular signals, such as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), CD40 and inflammatory cytokine TNF and IL-1, which suggests a cytoprotective function that is essential for lymphocyte activation as well as cell survival.
BCL2L1	BCL2-like 1	BCLX, BCL2L, Bcl-X, bcl-xL, bcl-xS, BCL-XL/S, DKFZp781P2092	The protein encoded by this gene is a member of the BCL-2 family. The proteins encoded by this gene are located at the outer mitochondrial membrane, and have been shown to regulate the VDAC opening. Two alternatively spliced transcript variants, which encode distinct isoforms, have been reported. The longer isoform acts as an apoptotic inhibitor and the shorter form acts as an apoptotic activator.
BCL2L10	BCL2-like 10	Boo, Diva, BCL-B, MGC129810, MGC129811	The protein encoded by this gene is a member of the BCL-2 family. This protein contains conserved BH4, BH1 and BH2 domains. This protein can interact with other proteins of BCL-2 family including BCL2, BCL2L1/BCL-X(L), and BAX. Over-expression of this gene has been shown to suppress cell apoptosis possibly through the prevention of cytochrome C release from the mitochondria, and thus activating caspase 3 activation. The mouse counterpart of this protein is found to interact with Apaf1 and forms a protein complex with caspase 9, which suggests the involvement of this protein in APAF1 and caspase 9 related apoptotic pathway.
BCL2L11	BCL2-like 11	BAM, BIM,BOD, BimL, BimEL, BIM-beta6, BIM-beta7, BIM-alpha6	The protein encoded by this gene is a member of the BCL-2 family. This protein, which contains a BH3 domain, has been shown to interact with other members of the BCL-2 protein family, including BCL2, BCL2L1/BCL-X(L), and MCL1, and to act as an apoptotic activator.
BCL2L13	BCL2-like 13	MIL1, BCL-RAMBO	The protein encoded by this gene is a member of the BCL-2 family and may promote the activation of caspase 3 and apoptosis.
BCL2L14	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)	BCLG	The protein encoded by this gene is a member of the BCL-2 family. Overexpression of this gene has been shown to induce apoptosis in cells.
BCL2L2	BCL2-like 2	BCLW, BCL-W, KIAA0271	The protein encoded by this gene is a member of the BCL-2 family. Expression of this gene in cells has been shown to contribute to reduced cell apoptosis under cytotoxic conditions.

BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3	BCL4, D19S37	This gene is a proto-oncogene candidate identified by its translocation into the immunoglobulin alpha-locus in some cases of B-cell leukemia. This protein functions as a transcriptional co-activator that activates through its association with NFκB homodimers. The expression of this gene can be induced by NFκB, which forms a part of the autoregulatory loop that controls the nuclear residence of p50 NFκB.
BID	BH3 interacting domain death agonist	FP497, MGC15319, MGC42355	This gene encodes a death agonist that heterodimerizes with either agonist BAX or antagonist BCL2. The encoded protein is a member of the BCL-2 family of cell death regulators. It is a mediator of mitochondrial damage induced by caspase 8 (CASP8) which cleaves this encoded protein, and the COOH-terminal part translocates to mitochondria where it triggers cytochrome c release.
BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	BP4, NBK, BIP1	The protein encoded by this gene is known to interact with cellular and viral survival-promoting proteins, such as BCL2 and the Epstein-Barr virus in order to enhance programmed cell death. Because its activity is suppressed in the presence of survival-promoting proteins, this protein is suggested as a likely target for anti-apoptotic proteins. This protein shares a critical BH3 domain with other death-promoting proteins, BAX and BAK.
BIRC1	NLR family, apoptosis inhibitory protein (NAIP)	BIRC1, NLRB1, psiNAIP, FLJ42520	This gene is a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) gene family, which encodes negative regulatory proteins that prevent apoptotic cell death. It is thought that this gene is a modifier of spinal muscular atrophy caused by mutations in a neighbouring gene, SMN1. The protein encoded by this gene contains regions of homology to two baculovirus inhibitor of apoptosis proteins, and it is able to suppress apoptosis induced by various signals.
BIRC2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	API1, MIHB, HIAP2, RNF48, cIAP1, Hiap-2	This gene is a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) gene family, which encodes negative regulatory proteins that prevent apoptotic cell death. The protein encoded by this gene inhibits apoptosis by interacting with TNF receptor associated factors 1 and 2 (TRAF1 and TRAF2) to form an heteromeric complex, which is then recruited to the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2).

BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	AIP1, API2, MIHC, CIAP2, HAIP1, HIAP1, MALT2, RNF49	This gene is a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) gene family, which encodes negative regulatory proteins that prevent apoptotic cell death. The protein encoded inhibits apoptosis by binding to tumor necrosis factor receptor-associated factors TRAF1 and TRAF2, probably by interfering with activation of ICE-like proteases. The encoded protein inhibits apoptosis induced by serum deprivation but does not affect apoptosis resulting from exposure to menadione, a potent inducer of free radicals.
BIRC4	X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)	API3, ILP1, MIHA, XLP2, BIRC4	This gene is a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) gene family, which encodes negative regulatory proteins that prevent apoptotic cell death. IAP family members usually contain multiple baculovirus IAP repeat (BIR) domains, but this gene encodes proteins with only a single BIR domain. The encoded proteins also lack a C-terminus RING finger domain. Gene expression is high during foetal development and in most tumors yet low in adult tissues. Antisense transcripts are involved in the regulation of this gene's expression. At least four transcript variants encoding distinct isoforms have been found for this gene, but the full-length nature of only three of them have been determined.
BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5	API4, EPR-1	This gene is a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) gene family, which encodes negative regulatory proteins that prevent apoptotic cell death. Gene expression is high during foetal development and in most tumors yet low in adult tissues.
BIRC6	Baculoviral IAP repeat-containing 6	BRUCE, APOLLON	This gene is a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) gene family, which encodes negative regulatory proteins that prevent apoptotic cell death. This gene encodes a protein which inhibits apoptosis by facilitating the degradation of apoptotic proteins by ubiquitination.
BIRC7	Baculoviral IAP repeat-containing 7	KIAP, LIVIN, MLIAP, RNF50, ML-IAP	This gene is a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) gene family, which encodes negative regulatory proteins that prevent apoptotic cell death. Two transcript variants encoding different isoforms have been found for this gene. The two isoforms have different antiapoptotic properties, with isoform α protecting cells from apoptosis induced by staurosporine and isoform β protecting cells from apoptosis induced by etoposide.

BIRC8	Baculoviral IAP repeat-containing 8	ILP2, ILP-2, hILP2	This gene is a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) gene family, which encodes negative regulatory proteins that prevent apoptotic cell death. The protein encoded by this gene protects against apoptosis mediated by BAX by binding to caspase 9.
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	NIP3	This gene is a member of the BCL2/adenovirus E1B 19 kd-interacting protein (BNIP) family. It interacts with the E1B 19 kDa protein which is responsible for the protection of virally-induced cell death, as well as E1B 19 kDa-like sequences of BCL2, also an apoptotic protector. This gene contains a BH3 domain and a transmembrane domain, which have been associated with pro-apoptotic function. The dimeric mitochondrial protein encoded by this gene is known to induce apoptosis, even in the presence of BCL2.
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	NIX, BNIP3a	This gene is a member of the BCL2/adenovirus E1B 19 kd-interacting protein (BNIP) family. It interacts with the E1B 19 kDa protein which is responsible for the protection of virally-induced cell death, as well as E1B 19 kDa-like sequences of BCL2, also an apoptotic protector. The protein encoded by this gene is a functional homolog of BNIP3, a proapoptotic protein. This protein may function simultaneously with BNIP3 and may play a role in tumor suppression.
BOK	BCL2-related ovarian killer	BOKL, BCL2L9, MGC4631	The protein encoded by this gene is a member of the BCL-2 family. This protein contains all four BH domains and is a pro-apoptotic BCL-2 protein identified in the ovary.
CARD15	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2)	CD, ACUG, BLAU, IBD1, NLRC2, NOD2B, CARD15, CLR16.3, PSORAS1	This gene is a member of the Nod1/Apaf-1 family and encodes a protein with two caspase recruitment (CARD) domains and six leucine-rich repeats (LRRs). The protein plays a role in the immune response to intracellular bacterial lipopolysaccharides (LPS) and activating the NFκB protein.
CARD4	Caspase recruitment domain family member 4	CARD4, NLRC1, CLR7.1	The protein encoded by this gene enhances caspase 9-mediated apoptosis and induces NFκB activity.

CARD6	Caspase recruitment domain family, member 6	CINCIN1	The encoded protein is a microtubule-associated protein that has been shown to interact with receptor-interacting protein kinases and positively modulate signal transduction pathways converging on activation of the inducible transcription factor NFκB.
CARD9	Caspase recruitment domain family, member 9	hCARD9	The protein encoded by this gene is a member of the CARD protein family. This protein was identified by its selective association with the CARD domain of BCL10, a positive regulator of apoptosis and NFκB activation, and is thought to function as a molecular scaffold for the assembly of a BCL10 signalling complex that activates NFκB.
CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (IL1β convertase)	ICE, P45, IL1BC	This gene encodes a protein which is a member of the caspase family. This gene was identified by its ability to proteolytically cleave and activate the inactive precursor of IL-1, a cytokine involved in the processes such as inflammation, septic shock, and wound healing. This gene has been shown to induce cell apoptosis.
CASP10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	MCH4, ALPS2, FLICE2	This gene encodes a protein which is a member of the caspase family. This protein cleaves and activates caspases 3 and 7, and the protein itself is processed by caspase 8.
CASP14	Caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase	MGC119078, MGC119079	This gene encodes a member of the caspase family. This caspase has been shown to be processed and activated by caspase 8 and caspase 10 <i>in vitro</i> , and by anti-Fas agonist antibody or TNF-related apoptosis inducing ligand <i>in vivo</i> .
CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	ICH1, NEDD2, CASP-2, ICH-1L, ICH-1L/1S	This gene encodes a protein which is a member of the caspase family. The proteolytic cleavage of this protein is induced by a variety of apoptotic stimuli.
CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	CPP32, SCA-1, CPP32B	This gene encodes a protein which is a member of the caspase family. This protein cleaves and activates caspases 6, 7 and 9, and the protein itself is processed by caspases 8, 9 and 10.
CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	TX, ICH-2, Mih1/TX, ICEREL-II, ICE(rel)II	This gene encodes a protein that is a member of the caspase family. This caspase is able to cleave and activate its own precursor protein, as well as caspase 1 precursor. When over-expressed, this gene induces cell apoptosis.

CASP5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase 5	ICH-3, MGC141966, ICEREL-III	This gene encodes a member of the caspase family. Overexpression of the active form of this enzyme induces apoptosis in fibroblasts.
CASP6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase 6	MCH2	This gene encodes a protein which is a member of the caspase family. This protein is processed by caspases 7, 8 and 10, and is thought to function as a downstream enzyme in the caspase activation cascade.
CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase 7	MCH3, CMH-1, ICE-LAP3	This gene encodes a protein which is a member of the caspase family. The precursor of this caspase is cleaved by caspase 3 and 10. It is activated upon cell death stimuli and induces apoptosis.
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase 8	CAP4, MACH, MCH5, FLICE, ALPS2B, FLJ17672	This gene encodes a member of the caspase family. This protein is involved in the programmed cell death induced by Fas and various apoptotic stimuli. The N-terminal FADD-like death effector domain of this protein suggests that it may interact with Fas-interacting protein FADD.
CASP8AP2	CASP8 associated protein 2	CED-4, FLASH, RIP25, FLJ11208, KIAA1315	This protein is highly similar to FLASH, a mouse apoptotic protein identified by its interaction with the death-effector domain (DED) of caspase 8. Studies of FLASH protein suggested that this protein may be a component of the death-inducing signalling complex that includes Fas receptor, Fas-binding adapter FADD, and caspase 8, and plays a regulatory role in Fas-mediated apoptosis.
CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	MCH6, APAF3 , ICE-LAP6, CASPASE-9c	This gene encodes a member of the cysteine-aspartic acid protease (caspase) family. This protein is activated by a multimeric complex, the apoptosome, which is composed of cytochrome c, APAF1 and dATP. Caspase 9 activation is thought to be one of the earliest in the caspase activation cascade. Alternative splicing results in two transcript variants which encode different isoforms.
CFLAR	CASP8 and FADD- like apoptosis regulator	CASH, FLIP, MRIT, CLARP, FLAME, Casper, FLAME1(-1), c- FLIP, I-FLICE, c- FLIPL, R or S, CASP8AP1, CFLAR	The protein encoded by this gene acts as an inhibitor of TNFRSF6 mediated apoptosis. A proteolytic fragment (p43) is likely retained in the death-inducing signalling complex (DISC) thereby blocking further recruitment and processing of caspase 8 at the complex. Full length and shorter isoforms have been shown either to induce apoptosis or to reduce TNFRSF-triggered apoptosis.

CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	IKK1, IKKA, IKBKA, TCF16, NFKB1A, IKK-alpha	This gene encodes a member of the serine/threonine protein kinase family. The encoded protein, a component of a cytokine-activated protein complex that is an inhibitor of the essential transcription factor NFκB complex, phosphorylates sites that trigger the degradation of the inhibitor via the ubiquitination pathway, thereby activating the transcription factor.
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	RAIDD, MGC9163	The protein encoded by this gene is a death domain (CARD/DD)-containing protein and has been shown to induce cell apoptosis. Through its CARD domain, this protein interacts with, and thus recruits, caspase 2/ICH1 to the cell death signal transduction complex that includes tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1A), RIPK1/RIP kinase, and numbers of other CARD domain-containing proteins.
DAPK1	Death-associated protein kinase 1	DAPK, DKFZp781I035	Death-associated protein kinase 1 is a positive mediator of interferon γ induced programmed cell death. DAPK1 encodes a structurally unique 160-kD calmodulin dependent serine-threonine kinase which is a tumor suppressor candidate.
DEDD	Death effector domain containing	DEFT, DEDD1, FLDED1, CASP8IP1	This gene encodes a protein that contains a death effector domain (DED). Overexpression of this gene was shown to induce weak apoptosis.
DEDD2	Death effector domain containing 2	FLAME-3	The protein encoded by this gene may play a critical role in death receptor-induced apoptosis, may target CASP8 and CASP10 to the nucleus, may regulate degradation of intermediate filaments during apoptosis and may play a role in the general transcription machinery in the nucleus.
DIABLO	Diablo homolog (Drosophila)	SMAC, SMAC3, DIABLO-S	This gene encodes an IAP-binding protein. The encoded mitochondrial protein enters the cytosol when cells undergo apoptosis, and it moderates the caspase inhibition of IAPs.
ESRRBL1	Oestrogen-related receptor beta like 1	HIPPI, MHS4R2, ESRRBL1, FLJ10147	The protein encoded by this gene has pro-apoptotic function. The protein encoded by this gene has the ability to bind a DNA sequence motif present in the promoter of caspase genes such as CASP1, CASP8 and CASP10, suggesting that it may act as a transcription regulator, however the relevance of such function remains unclear.

FADD	Fas (TNFRSF6)-associated death domain	GIG3, MORT1	The protein encoded by this gene is an adaptor molecule that interacts with various cell surface receptors and mediates cell apoptotic signals. This protein participates in the death signalling initiated by death receptors. Interaction of this protein with the receptors allows it to recruit caspase 8, and thereby activate the cysteine protease cascade.
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	APT1, CD95, FAS1, APO-1, FASTM, ALPS1A, TNFRSF6	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. It has been shown to play a central role in the physiological regulation of programmed cell death, and has been implicated in the pathogenesis of various malignancies and diseases of the immune system. The interaction of this receptor with its ligand allows the formation of DISC that includes FADD, caspase 8, and caspase 10. The autoproteolytic processing of the caspases in the complex leads to apoptosis. The isoforms lacking the transmembrane domain may negatively regulate the apoptosis mediated by the full length isoform.
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	FASL, CD178, CD95L, TNFSF6, APT1LG1	The protein encoded by this gene is the ligand for FAS. Both are transmembrane proteins. Interaction of FAS with this ligand is critical in triggering apoptosis of some types of cells such as lymphocytes.
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD, GAPD, MGC88685	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase catalyzes an important energy-yielding step in carbohydrate metabolism, the reversible oxidative phosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate in the presence of inorganic phosphate and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD).
HIP1	Huntingtin interacting protein 1	ILWEQ, MGC126506	The product of this gene is a membrane-associated protein that colocalizes with huntingtin. This protein has similarities to cytoskeleton proteins and its interaction with huntingtin is thought to play a functional role in the cell filament network. This gene could help in the understanding of the normal function of huntingtin and also the pathogenesis of Huntington disease. It also has been implicated in the pathogenesis of hematopoietic malignancies.
HRK	Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)	DP5, HAKIRI	Activator of apoptosis Hrk regulates apoptosis through interaction with antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). HRK interacts with BCL2 and BCLXL via the BH3 domain, but not with the death-promoting BCL2-related proteins BAX, BAK, or BCL-XS.

HTRA2	HtrA serine peptidase 2	OMI, PARK13, PRSS25	This gene encodes a serine protease which localizes in the endoplasmic reticulum and interacts with an alternatively spliced form of mitogen-activated protein kinase 14. The protein has also been localized to the mitochondria with release to the cytosol following apoptotic stimulus. The protein is thought to induce apoptosis by binding the apoptosis inhibitory protein baculoviral IAP repeat-containing 4. Nuclear localization of this protein has also been observed.
ICEBERG (CARD18)	Caspase recruitment domain family, member 18	UNQ5804, pseudo-ICE, CARD18 (official symbol)	The protein encoded by this gene inhibits generation of IL-1 β by interacting with caspase 1 and preventing its association with RIP2.
IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	IKK2, IKKB, NFKBIB, FLJ40509, IKK β , MGC131801	The NF κ B complex is inhibited by I κ B proteins which inactivate NF κ B by trapping it in the cytoplasm. Phosphorylation of serine residues on the I κ B proteins by kinases (IKBKA or IKBKB) marks them for destruction via the ubiquitination pathway, thereby allowing activation of the NF κ B complex. Activated NF κ B complex translocates into the nucleus and binds DNA at κ B-binding motifs.
IKBKE	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon	IKKE, IKKI, IKK-i	The protein encoded by this gene phosphorylates inhibitors of NF κ B thus leading to the dissociation of the inhibitor/NF κ B complex and ultimately the degradation of the inhibitor.
IKBKG	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma	IP, IP1, IP2, FIP3, IPD2, NEMO, FIP-3, Fip3p, AMCBX1, IKK-gamma	This gene encodes the regulatory subunit of the inhibitor of κ B kinase (IKK) complex, which activates NF κ B resulting in activation of genes involved in inflammation, immunity, cell survival, and other pathways. Mutations in this gene result in incontinentia pigmenti, hypohidrotic ectodermal dysplasia, and several other types of immunodeficiencies. Multiple transcript variants encoding different isoforms have been found for this gene. A pseudogene highly similar to this locus is located in an adjacent region of the X chromosome.

LRDD	Leucine-rich repeats and death domain containing	PIDD, MGC16925, DKFZp434D229	The protein encoded by this gene has been shown to interact with other death domain proteins, such as FADD and MAP-kinase activating death domain-containing protein (MADD), and thus may function as an adaptor protein in cell death-related signaling processes. The expression of the mouse counterpart of this gene has been found to be positively regulated by the tumor suppressor p53 and to induce cell apoptosis in response to DNA damage, which suggests a role for this gene as an effector of p53-dependent apoptosis.
LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	LT, TNFB, TNFSF1	Lymphotoxin- α , a member of the TNF family, is a cytokine produced by lymphocytes. LTA is highly inducible, secreted, and exists as homotrimeric molecule. LTA forms heterotrimers with lymphotoxin- β which anchors lymphotoxin- α to the cell surface. LTA mediates a large variety of inflammatory, immunostimulatory, and antiviral responses. LTA is also involved in the formation of secondary lymphoid organs during development and plays a role in apoptosis.
LTB	Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	p33, TNFC, TNFSF3	Lymphotoxin- β is a type II membrane protein of the TNF family. It anchors lymphotoxin- α to the cell surface through heterotrimer formation. LTB is an inducer of the inflammatory response system and involved in normal development of lymphoid tissue.
MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	TM, EAT, MCL1L, MCL1S, MGC1839, MGC104264	The protein encoded by this gene is a member of the BCL-2 family. Alternative splicing occurs at this locus and two transcript variants encoding distinct isoforms have been identified. The longer gene product (isoform 1) enhances cell survival by inhibiting apoptosis while the alternatively spliced shorter gene product (isoform 2) promotes apoptosis and is death-inducing.
NALP1	NLR family, pyrin domain containing 1 (NLRP1)	NAC, CARD7, NALP1, SLEV1, DEFCAP	This gene encodes a member of the Ced-4 family of apoptosis proteins. Ced-family members contain a caspase recruitment domain (CARD) and are known to be key mediators of programmed cell death. The encoded protein interacts strongly with caspase 2 and weakly with caspase 9. Overexpression of this gene was demonstrated to induce apoptosis in cells.

NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	KBF1, p105, EBP-1, MGC54151, NFKB-p50, NFKB-p105, NFκB	This gene encodes a 105 kD protein which can undergo cotranslational processing by the 26S proteasome to produce a 50 kD protein. The 105 kD protein is a Rel protein-specific transcription inhibitor and the 50 kD protein is a DNA binding subunit of the NFκB protein complex. NFκB is activated by a wide variety of stimuli such as cytokines, oxidant-free radicals, inhaled particles, ultraviolet irradiation, and bacterial or viral products. Inappropriate activation of NFκB has been linked to inflammatory events associated with autoimmune arthritis, asthma, septic shock, lung fibrosis, glomerulonephritis, atherosclerosis, and AIDS. In contrast, complete and persistent inhibition of NFκB has been linked directly to apoptosis, inappropriate immune cell development, and delayed cell growth
NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	LYT10, LYT-10	NFKB1 or NFKB2 is bound to REL, RELA, or RELB to form the NFκB complex. The p50 (NFKB1)/p65 (RELA) heterodimer is the most abundant form of NFκB.
NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	IKBA, MAD-3, NFKBI	The NFκB complex is inhibited by IκB proteins which inactivate NFκB by trapping it in the cytoplasm. Phosphorylation of serine residues on the IκB proteins by kinases (IKBKA or IKBKB) marks them for destruction via the ubiquitination pathway, thereby allowing activation of the NFκB complex. Activated NFκB complex translocates into the nucleus and binds DNA at κB-binding motifs. NFKBIA is one of the IκB isoformes.
NFKBIB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	IKBB, TRIP9	The NFκB complex is inhibited by IκB proteins which inactivate NFκB by trapping it in the cytoplasm. Phosphorylation of serine residues on the IκB proteins by kinases (IKBKA or IKBKB) marks them for destruction via the ubiquitination pathway, thereby allowing activation of the NFκB complex. Activated NFκB complex translocates into the nucleus and binds DNA at κB-binding motifs. NFKBIB is one of the IκB isoformes.

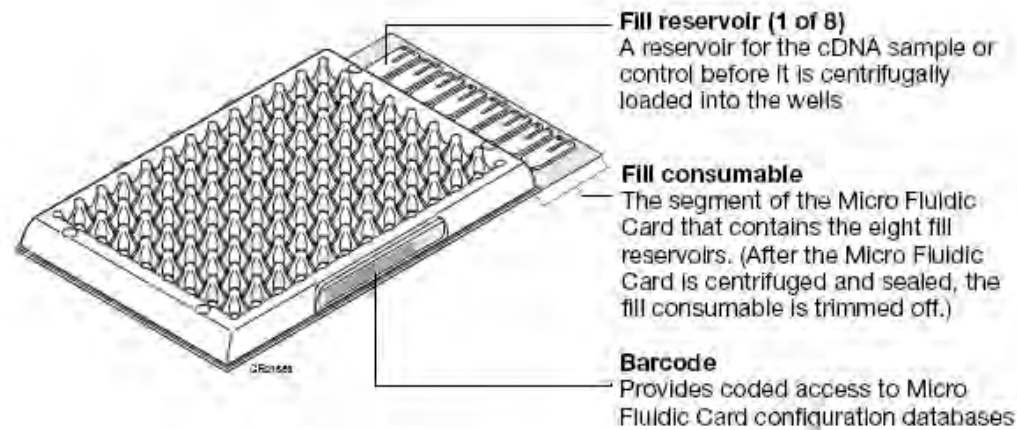
NFKBIE	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	IKBE	The NFκB complex is inhibited by IκB proteins which inactivate NFκB by trapping it in the cytoplasm. Phosphorylation of serine residues on the IκB proteins by kinases (IKBKA or IKBKB) marks them for destruction via the ubiquitination pathway, thereby allowing activation of the NFκB complex. Activated NFκB complex translocates into the nucleus and binds DNA at κB-binding motifs. NFKBIE is one of the IκB isoforms.
NFKBIZ	Nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	IKBZ, INAP, MAIL, FLJ30225, FLJ34463	This gene is a member of the ankyrin-repeat family and is induced by lipopolysaccharide (LPS). The C-terminal portion of the encoded product which contains the ankyrin repeats, shares high sequence similarity with the IκB family of proteins.
PEA15	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15	PED, MAT1, HMAT1, MAT1H	PEA15 is a death effector domain (DED)-containing protein predominantly expressed in the central nervous system, particularly in astrocytes.
PMAIP1	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	APR, NOXA	The protein encoded by this gene promotes activation of caspases and apoptosis, promotes mitochondrial membrane changes and efflux of apoptogenic proteins from the mitochondria, contributes to p53-dependent apoptosis after radiation exposure, promotes proteasomal degradation of MCL1, competes with BAK1 for binding to MCL1 and can displace BAK1 from its binding site on MCL1, competes with BIM/BCL2L11 for binding to MCL1 and can displace BIM/BCL2L11 from its binding site on MCL1.
PYCARD	PYD and CARD domain containing	ASC, TMS, TMS1, CARD5	In normal cells, the encoded adaptator protein is localized in the cytoplasm; however, in cells undergoing apoptosis, it forms ball-like aggregates near the nuclear periphery.
REL	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)	C-Rel	The REL gene encodes c-Rel, a transcription factor that is a member of the Rel/NFκB family, which also includes RELA, RELB, NFKB1, and NFKB2. These proteins are related through a highly conserved N-terminal region termed the Rel domain, which is responsible for DNA binding, dimerization, nuclear localization, and binding to the NFκB inhibitor.

RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	p65, NFkB3, MGC131774	NFkB1 or NFkB2 is bound to REL, RELA, or RELB to form the NFkB complex. The p50 (NFkB1)/p65 (RELA) heterodimer is the most abundant form of NFkB. The NFkB complex is inhibited by IkB proteins which inactivate NFkB by trapping it in the cytoplasm. Phosphorylation of serine residues on the IkB proteins by kinases (IKBKA or IKBKB) marks them for destruction via the ubiquitination pathway, thereby allowing activation of the NFkB complex. Activated NFkB complex translocates into the nucleus and binds DNA at kB-binding motifs.
RELB	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	IREL, I-REL	NFkB1 or NFkB2 is bound to REL, RELA, or RELB to form the NFkB complex. The p50 (NFkB1)/p65 (RELA) heterodimer is the most abundant form of NFkB. The NFkB complex is inhibited by IkB proteins which inactivate NFkB by trapping it in the cytoplasm. Phosphorylation of serine residues on the IkB proteins by kinases (IKBKA or IKBKB) marks them for destruction via the ubiquitination pathway, thereby allowing activation of the NFkB complex. Activated NFkB complex translocates into the nucleus and binds DNA at kB-binding motifs.
RIPK1	Receptor-interacting serine-threonine kinase 1	RIP, RIP1, FLJ39204	The protein encoded by this gene promotes apoptosis and activation of NFkB and is required for TNFRSF1A mediated activation of NFkB.
RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	CCK, RICK, RIP2, CARD3, GIG30, CARDIAK	This gene encodes a member of the receptor-interacting protein (RIP) family of serine/threonine protein kinases. The encoded protein is a potent activator of NFkB and inducer of apoptosis in response to various stimuli.
TA-NFkBH	T-cell activation NFkB-like protein	MGC11314, IkBNS, MGC149503, NFkBID	The protein encoded by this gene may regulate the expression of IL-2, IL-6, and other cytokines through regulation on NFkB activity. This protein has functions in the regulation of inflammatory responses. May also regulate TCR-induced negative selection of thymocytes.

TBK1	TANK-binding T-kinase 1	NAK, T2K, FLJ11330	The NFκB complex of proteins is inhibited by IκB proteins, which inactivate NFκB by trapping it in the cytoplasm. Phosphorylation of serine residues on the IκB proteins by IκB kinases marks them for destruction via the ubiquitination pathway, thereby allowing activation and nuclear translocation of the NFκB complex. The protein encoded by this gene is similar to IκB kinases and can mediate NFκB activation in response to certain growth factors.
TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	DIF, TNFA, TNFSF2, TNF-alpha	This gene encodes a multifunctional proinflammatory cytokine that belongs to the TNF superfamily. This cytokine is involved in the regulation of a wide spectrum of biological processes including cell proliferation, differentiation, apoptosis, lipid metabolism, and coagulation.
TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	DR4, APO2, CD261, MGC9365, TRAILR1, TRAILR-1	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. This receptor is activated by TNF-related apoptosis inducing ligand (TNFSF10/TRAIL), and thus transduces cell death signal and induces cell apoptosis. Studies with FADD-deficient mice suggested that FADD, a death domain containing adaptor protein, is required for the apoptosis mediated by this protein.
TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	DR5, CD262, KILLER, TRICK2, TRICKB, TRAILR2, KILLER/DR5	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. This receptor can be activated by TNF-related apoptosis inducing ligand (TNFSF10/TRAIL/APO-2L), and transduces apoptosis signal. Studies with FADD-deficient mice suggested that FADD, a death domain containing adaptor protein, is required for the apoptosis mediated by this protein.
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	FPF, p55, p60, TBP1, TNF-R, TNFAR, TNFR1, TNFR55	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. This protein is one of the major receptors for the TNFα. This receptor can activate NFκB, mediate apoptosis, and function as a regulator of inflammation.
TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	p75, TBPII, TNFBR, TNFR2, CD120b, TNFR80, TNF-R75, p75TNFR, TNF-R-II	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. This protein and TNF-receptor 1 form a heterocomplex that mediates the recruitment of two anti-apoptotic proteins, c-IAP1 and c-IAP2, which possess E3 ubiquitin ligase activity. The function of IAPs in TNF-receptor signalling is unknown; however, c-IAP1 is thought to potentiate TNF-induced apoptosis by the ubiquitination and degradation of TNF-receptor-associated factor 2, which mediates anti-apoptotic signals.

TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	DR6, BM-018, MGC31965	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. This receptor has been shown to activate NFκB and MAPK8/JNK, and induce cell apoptosis. Through its death domain, this receptor interacts with TRADD protein, which is known to serve as an adaptor that mediates signal transduction of TNF-receptors.
TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	DR3, TR3, DDR3, LARD, APO-3, TRAMP, TNFRSF12	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. This receptor has been shown to stimulate NFκB activity and regulate cell apoptosis. The signal transduction of this receptor is mediated by various death domain containing adaptor proteins.
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TL2, APO2L, CD253, TRAIL, Apo-2L	The protein encoded by this gene is a cytokine that belongs to the TNF ligand family. This protein preferentially induces apoptosis in transformed and tumor cells, but does not appear to kill normal cells although it is expressed at a significant level in most normal tissues. This protein binds to several members of TNF receptor superfamily including TNFRSF10A/TRAILR1, TNFRSF10B/TRAILR2, TNFRSF10C/TRAIL-R3, TNFRSF10D/TRAILR4, and possibly also to TNFRSF11B/OPG. The binding of this protein to its receptors has been shown to trigger the activation of MAPK8/JNK, caspase 8, and caspase 3.
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain	Hs.89862, MGC11078	The protein encoded by this gene is a death domain containing adaptor molecule that interacts with TNFRSF1A/TNFR1 and mediates programmed cell death signalling and NFκB activation. This protein binds adaptor protein TRAF2, reduces the recruitment of inhibitor-of-apoptosis proteins (IAPs) by TRAF2, and thus suppresses TRAF2 mediated apoptosis. This protein can also interact with receptor TNFRSF6/FAS and adaptor protein FADD/MORT1, and is involved in the Fas-induced cell death pathway.

Annexe 2: Plan de la carte microfluidique apoptose d'Applied Biosystems.



Human Apoptosis Array

A	BIRC2	BAK1	BCL3	CASP1	CASP2	CASP5	CASP7	CASP8	CASP9	IKKBK	18S	LTB	MCL1	NFKB1	NFKB2	NFKBIB	NFKBIE	PMAIP1	RELB	TNFRSF1B	TNFRSF10A	CARD4	NALP1	CASP14	1
B	BCL2L13	TNFRSF21	HTRA2	TBK1	ESRRBL1	LRDD	CARD15	CARD9	NFKBIZ	BCL2L14	BIRC7	CARD6	BIRC8	DEDD2	APAF1	BIRC3	BIRC4	BIRC5	FAS	FASLG	BAD	BAX	BCL2	BCL2A1	2
C	BCL2L1	BCL2L2	BIK	BNIP3L	BOK	CASP3	CASP6	CASP10	DAPK1	HIP1	BIRC1	NFKBIA	RELA	TNF	IKBK	PEA15	TRADD	RIPK1	HRK	TNFSF10	FADD	TNFRSF10B	CFLAR	DEDD	3
D	BCL2L10	BCL2L11	BBC3	PYCARD	DIABLO	BIRC6	GAPDH	ACTB	CHUK	REL	TNFRSF1A	RIPK2	IKBKE	BCAP31	ICEBERG	TA-NFKBH	BID	BNIP3	CASP4	LTA	TNFRSF25	CRADD	BCL10	CASP8AP2	4
E	BIRC2	BAK1	BCL3	CASP1	CASP2	CASP5	CASP7	CASP8	CASP9	IKKBK	18S	LTB	MCL1	NFKB1	NFKB2	NFKBIB	NFKBIE	PMAIP1	RELB	TNFRSF1B	TNFRSF10A	CARD4	NALP1	CASP14	5
F	BCL2L13	TNFRSF21	HTRA2	TBK1	ESRRBL1	LRDD	CARD15	CARD9	NFKBIZ	BCL2L14	BIRC7	CARD6	BIRC8	DEDD2	APAF1	BIRC3	BIRC4	BIRC5	FAS	FASLG	BAD	BAX	BCL2	BCL2A1	6
G	BCL2L1	BCL2L2	BIK	BNIP3L	BOK	CASP3	CASP6	CASP10	DAPK1	HIP1	BIRC1	NFKBIA	RELA	TNF	IKBK	PEA15	TRADD	RIPK1	HRK	TNFSF10	FADD	TNFRSF10B	CFLAR	DEDD	7
H	BCL2L10	BCL2L11	BBC3	PYCARD	DIABLO	BIRC6	GAPDH	ACTB	CHUK	REL	TNFRSF1A	RIPK2	IKBKE	BCAP31	ICEBERG	TA-NFKBH	BID	BNIP3	CASP4	LTA	TNFRSF25	CRADD	BCL10	CASP8AP2	8
I	BIRC2	BAK1	BCL3	CASP1	CASP2	CASP5	CASP7	CASP8	CASP9	IKKBK	18S	LTB	MCL1	NFKB1	NFKB2	NFKBIB	NFKBIE	PMAIP1	RELB	TNFRSF1B	TNFRSF10A	CARD4	NALP1	CASP14	9
J	BCL2L13	TNFRSF21	HTRA2	TBK1	ESRRBL1	LRDD	CARD15	CARD9	NFKBIZ	BCL2L14	BIRC7	CARD6	BIRC8	DEDD2	APAF1	BIRC3	BIRC4	BIRC5	FAS	FASLG	BAD	BAX	BCL2	BCL2A1	10
K	BCL2L1	BCL2L2	BIK	BNIP3L	BOK	CASP3	CASP6	CASP10	DAPK1	HIP1	BIRC1	NFKBIA	RELA	TNF	IKBK	PEA15	TRADD	RIPK1	HRK	TNFSF10	FADD	TNFRSF10B	CFLAR	DEDD	11
L	BCL2L10	BCL2L11	BBC3	PYCARD	DIABLO	BIRC6	GAPDH	ACTB	CHUK	REL	TNFRSF1A	RIPK2	IKBKE	BCAP31	ICEBERG	TA-NFKBH	BID	BNIP3	CASP4	LTA	TNFRSF25	CRADD	BCL10	CASP8AP2	12
M	BIRC2	BAK1	BCL3	CASP1	CASP2	CASP5	CASP7	CASP8	CASP9	IKKBK	18S	LTB	MCL1	NFKB1	NFKB2	NFKBIB	NFKBIE	PMAIP1	RELB	TNFRSF1B	TNFRSF10A	CARD4	NALP1	CASP14	13
N	BCL2L13	TNFRSF21	HTRA2	TBK1	ESRRBL1	LRDD	CARD15	CARD9	NFKBIZ	BCL2L14	BIRC7	CARD6	BIRC8	DEDD2	APAF1	BIRC3	BIRC4	BIRC5	FAS	FASLG	BAD	BAX	BCL2	BCL2A1	14
O	BCL2L1	BCL2L2	BIK	BNIP3L	BOK	CASP3	CASP6	CASP10	DAPK1	HIP1	BIRC1	NFKBIA	RELA	TNF	IKBK	PEA15	TRADD	RIPK1	HRK	TNFSF10	FADD	TNFRSF10B	CFLAR	DEDD	15
P	BCL2L10	BCL2L11	BBC3	PYCARD	DIABLO	BIRC6	GAPDH	ACTB	CHUK	REL	TNFRSF1A	RIPK2	IKBKE	BCAP31	ICEBERG	TA-NFKBH	BID	BNIP3	CASP4	LTA	TNFRSF25	CRADD	BCL10	CASP8AP2	16
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Port