Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Influence de la protéine PUMILIO 2 sur le phénotype sénescent induit par les oncogènes

Villard, Amélie

Award date:
2018

Awarding institution:
Universite 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.

Download date: 04. May. 2026

UNIVERSITÉ DE NAMUR

Faculté des Sciences

INFLUENCE DE LA PROTEINE PUMILIO 2 SUR LE PHENOTYPE SENESCENT INDUIT PAR LES ONCOGENES

Mémoire présenté pour l'obtention

du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Amélie VILLARD

Août 2018

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - http://www.unamur.be

Influence de la protéine PUMILIO 2 sur le phénotype sénescent induit par les oncogènes

VILLARD Amélie

Résumé

Durant la tumorigenèse, les cellules doivent contourner un certain nombre de barrières, dont la sénescence. La sénescence cellulaire est définie comme un arrêt irréversible de la prolifération et peut être induite prématurément, comme mécanisme de sauvegarde, lorsque la cellule est soumise à un stress. Les oncogènes Ras et MEK entrainent, au sein de la cellule, une sur-activation de la voie des MAP Kinases, impliquée dans la prolifération cellulaire. L'induction de ce stress mitotique est connue pour induire la sénescence cellulaire. La protéine Pumilio 2 est un membre de la famille des protéines PUF. Ce régulateur post-transcriptionnel se lie aux ARN messagers et inhibe leur traduction ou entraine leur dégradation. Il a été montré que la protéine ERK, dernière kinase de la voie des MAPK, pouvait être régulée directement ou indirectement, via la phosphatase DUSP6, par la protéine Pumilio 2. Il est intéressant d'investiguer si la protéine Pumilio 2 pourrait avoir une influence sur le phénotype cellulaire sénescent induit par les oncogènes Ras ou MEK, via la régulation négative de la kinase ERK.

L'utilisation de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines (ostéosarcorme et cancer du sein) et de plusieurs inducteurs de la sénescence (Ras et MEK inductibles ou constitutivement actifs), nous a permis de mettre en évidence un rôle modéré, dans certains contextes, de la protéine Pumilio 2, dans le contournement de la sénescence. Il a en effet été observé des changements morphologiques, d'activité SA-βgal et de potentiel prolifératif des cellules en présence de la protéine. Des modifications dans les niveaux de transcrits de marqueurs de prolifération et de marqueurs la sénescence ont aussi été observées. Ce contournement de la sénescence était généralement accompagné d'une légère réduction de la quantité protéique de p-ERK, suggérant un contrôle négatif de la voie des MAPK par la protéine Pumilio 2.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Août 2018

Promoteur: C. Michiels

Remerciements

A l'issus de cette année de mémoire passée au sein de l'URBC, je tiens à prendre du temps pour remercier toutes les personnes qui ont pu, de prêt ou de loin, m'aider à venir à bout de ce projet.

Tout premièrement, ***Merci****, à ma promotrice Carine Michiels, de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Merci pour votre bonne humeur, votre positivité continuelle, vos conseils, vos corrections et vos mots d'encouragements qui ont su me motiver.*

Un immense ***Merci****, à Benjamin pour son encadrement et pour m'avoir initié à, et fait aimer la recherche. Merci pour ta disponibilité, pour ton écoute et pour tes conseils. Merci d'avoir eu les mots pour me redonner la motivation à de nombreuses reprises et ce, même dans les pires moments. Enfin, Merci pour ton aide précieuse et pour tes corrections au moment de la rédaction.*

Je voudrais aussi dire un ***Merci*** *général à toute l'équipe TumHyp, aux autres équipes de l'URBC ainsi qu'aux techniciens de laboratoire. Merci pour vos conseils, pour votre aide et pour avoir embellit mes journées de travail.* ***Merci*** *plus particulièrement à Sophie, essentiellement pour le thé, parfois pour la bière, mais surtout pour l'oreille et les rires.*

Merci *aux autres mémorants de l'URBC, Jérémy, Mathilde, Marie-Albane, An, Alison, Clotilde et Jia-Wei. Sans vous l'année aurait été bien trop monotone. A nos longues soirées de travail, à nos crises de rire, à nos crises de nerfs. Tous ensemble dans la même merde…*

Merci *à mes parents, à mes sœurs et à mon frère d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu dans mes projets et tout au long de mes longues années d'études. Merci plus simplement d'avoir été là, malgré les huit centaines de kilomètres qui nous séparent. Loin des yeux, près du cœur.*

Merci *à mes amis de m'avoir aidé à décompresser et de m'avoir apporté leur soutien.* ***Merci*** *à la Dream Team du Saint Loup d'avoir à la fois embellit et rendu insupportable chacun des services passés en votre compagnie.* ***Merci*** *à Sarah d'être… Sarah, mon divertissement préféré.* ***Merci*** *à Valentin, de m'avoir recueilli dans sa grotte. Et enfin,* ***Merci*** *à Johan pour son aide précieuse.*

A vous tous, du fond du cœur, ***Merci*** *!*

Amélie

Abréviations

3'UTR	3' untranslated region
4-OHT	4-Hydroxytamoxyfen
ADN	acide désoxyribonucléique
AGO	protéine Argonaute
ALT	prolongation alternative des télomères
AML	leucémiques myéloïdes aigües
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messagers
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATP	adénosine tri-phosphate
ATR	ataxia telangiectasia and rad-3 related protein
Bax	Bcl-2-associated X protein
BRCA	BReast CAncer
BSA	Bovine Serum Albumin
Ct	Cycle threshold
CD	common docking
CDK	kinases dépendantes des cyclines
CO_2	dioxyde de carbone
CRD	domaine riche en cystéines
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
Cyt-C	cytochrome C
DDR	réponse aux dommages à l'ADN
DUSP6	dual specificity phosphatase 6
EGFR	epithelial growth factor receptor
EMT	transition épithélio-mésenchymateuse
ER	oestrogen receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAS	first apoptotique signal receptor
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
GAP	GTPases activating proteins
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GEF	guanine exchange factor
Grb2	growth factor receptor binding homology 2
HKG	HouseKeeping Gene
H_2O_2	peroxyde d'hydrogène
H-Ras	harvey-Ras
HRP	HorseRadish Peroxidase
HSP	Heat Shock Protein
IGFR	insulin-like growth factor receptors
IGFBP7	insulin-like growth factor-binding protein 7
IL6/8	interleukines 6/8
KC	Killing Control
K-Ras	kirsten-Ras
LT	lymphocytes T
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MAPKK	MAPK kinases
MDM2	murine double minute 2
MEC	matrice extracellulaire
MEK	mitogen-activated ERK kinase
miR	micros ARN
MLH1	mutL homolog 1
MMP	production de métalloprotéinases matricielles
MSH2	mutS protein homolog 2
NES	nuclear export signal
NK	natural killer
NOP9	nucleolar protein 9
N-Ras	neuroblastoma-Ras
OIS	sénescence induite par les oncogènes
PBS	Phosphate Buffured Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PD-L1	programmed death-ligand 1
PFA	Paraformaldéhyde
PI3K	phosphatidyl-inositol 3-kinase
PI3P	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphophate

PUF	Pumilio-Fem-3-binding factor
pRB	protéine du rétinoblastome
RBD	Ras-binding domain
PTB	phosphotyrosine-binding
RAS	rat sarcoma
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RB	rétinoblastome
RE	réticulum endoplasmique
RLT	RNeasy Lysis Buffer
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RS	sénescence réplicative
RTK	récepteurs à activité tyrosine kinase
RT-qPCR	Reverse Transcription quantitative PCR
SAHF	foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence
SASP	phénotype sécrétoire associé à la sénescence
SDS	dodécylsulfate de sodium
SH2	Src homology-2
SIPS	sénescence induite prématurément par les stress
SMAD4	mothers against decapentaplegic homolog 4
SOS	son of sevenless
TBS	Tris-Buffered Saline
TGFβ	transforming growth factor β
TP53	tumor protein 53
VEGF	vascular epithelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptors
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

Table des matières

INTRODUCTION

1. Le cancer 1
    1.1. Généralités 1
        1.1.1. Incidence 1
        1.1.2. Traitements 1
    1.2. Une maladie génétique : équilibre entre oncogènes et suppresseurs de tumeur 2
        1.2.1. Les oncogenes 3
        1.2.2. Les suppresseurs de tumeur 3
    1.3. Tumorigenèse et hétérogénéité tumorale 4
    1.4. Les caractéristiques du cancer 5
        1.4.1. Prolifération soutenue et anarchique 5
            1.4.1.1. Nouveaux rapports aux signaux de prolifération 5
            1.4.1.2. Immortalité réplicative 5
            1.4.1.3. Echappement des programmes de sauvegarde 6
        1.4.2. Adaptation à l'environnement tumoral 7
            1.4.2.1. Angiogenèse 7
            1.4.2.2. Modification du métabolisme 7
        1.4.3. Invasion et métastases 7
2 La senescence 8
    2.1. Les caractéristiques de la sénescence cellulaire 8
        2.1.1. Arrêt de la prolifération 8
        2.1.2. Morphologie 9
        2.1.3. Activité β-galactosidase Associée à la Sénescence (SA- βgal) 9
        2.1.4. Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence (SASP) 9
        2.1.5. Foyers d'Hétérochromatine Associés à la Sénescence (SAHF) 9
        2.1.6. Résistance à l'apoptose 9
        2.1.7. Altération de l'expression génique 10
        2.1.8. Inducteurs de la sénescence 10
        2.1.9. Sénescence réplicative (RS) 10
        2.1.10. Sénescence Induite par les Oncogènes (OIS) 10
        2.1.11. Sénescence Induite Prématurément par les Stress (SIPS) 11
    2.2. Les voies de signalisation impliquées dans la sénescence 11
        2.2.1. La protéine p53 et la sénescence 11
            2.2.1.1. La réponse aux dommages à l'ADN (DDR) 11
            2.2.1.2. La voie $p14^{Arf}$/p53/$p21^{Cip}$ 11
        2.2.2. La voie $p16^{INK4a}$/Rb et la sénescence 12
    2.3. Rôles de la senescence 12
        2.3.1. Sénescence et vieillissement 12
        2.3.2. Sénescence et cancer 12
        2.3.3. Autres rôles de la sénescence 13
3 La voie des MAPK 13
    3.1. La voie canonique des MAPK 13
        3.1.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase 13
        3.1.2. Les protéines Ras 14
        3.1.3. Les protéines Raf 14
        3.1.4. Les protéines MEK 15
        3.1.5. La protéine ERK 15

3.2. La voie des MAPK et le cancer 15
3.2.1. Les altérations de la voie des MAPK 16
3.2.2. Rôle de la voie des MAPK dans le cancer 16
3.2.3. La voie des MAPK et la sénescence 17
4 Pumilio 2 17
4.1. Structure de la protéine Pumilio 2 17
4.2. Mécanismes d'action de la protéine Pumilio 2 18
4.3. Fonctions biologiques de la protéine Pumilio 2 19
4.4. La protéine Pumilio 2 et le cancer 20
4.5. La protéine Pumilio 2 et la voie des MAPK 20
OBJECTIFS 21
MATERIEL ET METHODES
1. Culture cellulaire 22
1.1. Types cellulaires utilizes 22
1.1.1. Les cellules Phoenix-ECO 22
1.1.2. Les cellules HEK293T 22
1.1.3. Les cellules MDA-MB-468 22
1.1.4. Les cellules MCF-7 22
1.1.5. Les cellules U-2 OS 22
1.2. Repiquage et ensemencement des cellules 23
1.2.1. Réactifs et matériel 23
1.2.2. Méthode de repiquage des cellules 23
1.2.3. Méthode de comptage et d'ensemencement des cellules 23
2. Transfection 23
2.1. Matériel nécessaire à la transfection au chlorure de calcium et plasmides 24
2.2. Principe de transfection au chlorure de calcium 24
2.3. Méthode de transfection des cellules Phoenix-ECO 24
2.4. Méthode de transfection des cellules HEK293T 24
3. Transduction rétrovirale et lentivirale 24
3.1. Matériel nécessaire à la transduction rétrovirale et lentivirale 24
3.2. Les retrovirus 25
3.3. Principe de la transduction rétrovirale 25
3.4. Méthode de la transduction rétrovirale 25
3.5. Les lentivirus 26
3.6. Principe de la transduction lentivirale 26
3.7. Méthode de la transduction lentivirale 26
4. Induction de la sénescence 26
4.1. Les protéines de fusion MEK:ER et Ras:ER 26
4.2. Matériel et réactifs 26
4.3. Méthode d'induction de la sénescence avec les protéines MEK:ER et Ras:ER 27
4.4. Expression constitutive de KRas4B(G12V) 27
5. Test de proliferation 27
5.1. Matériel et réactifs 27
5.2. Méthode du test de prolifération 27
6. Activité β-galactosidase associée à la sénescence 27
6.1. Principe 27
6.2. Matériel et réactifs 28
6.3. Méthode 28
7. Analyse par RT-PCR quantitative 28
7.1. Extraction d'ARN total et purification 28

7.1.1. Réactifs et matériel 28
7.1.2. Méthode 28
7.2. Rétro-transcription de l'ARNm en ADNc 28
7.2.1. Réactifs et matériel 29
7.2.2. Méthode 29
7.3. PCR quantitative 29
7.3.1. Principe 29
7.3.2. Réactif et matériel 29
7.3.3. Méthode 29
7.4. Western Blot 30
7.4.1. Principe 30
7.4.2. Méthode 30
7.5. Immunofluorescence 31
7.5.1. Principe 31
7.5.2. Réactifs et matériel 32
7.5.3. Méthode 32

RESULTATS

1. Modèles d'étude 33
2. Induction de la senescence 33
3. Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la sénescence induite par 34
l'oncogène inductible HRas:ER dans des cellules U-2 OS
3.1. Morphologie des cellules U-2 OS transduites avec Ras:ER 34
3.2. Activité SA-βgal des cellules U-2 OS transduites avec Ras:ER 34
3.3. Potentiel prolifératif des cellules U-2 OS transduites avec Ras:ER 35
3.4. Activation de la voie des MAPK dans les cellules U-2 OS transduites avec 35
Ras:ER
4. Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la sénescence induite par 35
l'oncogène inductible ΔMEK1:ER dans des cellules U-2 OS
4.1. Morphologie des cellules U-2 OS transduites avec MEK:ER 36
4.2. Activité SA-βgal des cellules U-2 OS transduites avec MEK:ER 36
4.3. Potentiel prolifératif des cellules U-2 OS transduites avec MEK:ER 36
4.4. Niveaux d'ARNm de marqueurs de prolifération et de la sénescence dans les 36
cellules U-2 OS transduites avec MEK:ER
4.5. Activation de la voie des MAPK dans les cellules U-2 OS transduites avec 37
Ras:ER
5. Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la sénescence induite par 37
l'oncogène constitutivemet actif HRas dans des cellules MDA-MB-468
5.1. Morphologie des cellules MDA-MB-468 transduites avec l'oncogène 38
constitutivement actif HRas
5.2. Potentiel prolifératif des cellules MDA-MB-468 transduites avec l'oncogène 38
constitutivement actif HRas
5.3. Niveau d'ARNm de marqueurs de prolifération et de la sénescence dans les 38
cellules MDA-MB-468 transduites avec l'oncogène constitutivement actif HRas
5.4. Activation de la voie des MAPK dans les cellules MDA-MB-468 transduites 39
avec l'oncogène constitutivement actif HRas
6. Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la sénescence induite par 39
l'oncogène constitutivement actif MEKDD dans des cellules MCF-7
6.1. Potentiel prolifératif des cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène 39
constitutivement actif MEK DD
6.2. Evaluation de l'expression protéique de Pumilio 2 dans les cellules MCF-7 40

transduites avec l'oncogène constitutivement actif MEK DD
6.3. Activation de la voie des MAPK dans les cellules MCF-7 transduites avec 40
l'oncogène constitutivement actif MEK DD
7. Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la sénescence induite par 41
l'oncogène constitutivement actif KRas4B(G12V) dans des cellules MCF-7
7.1. Morphologie des cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement 41
actif KRas
7.2. Activité SA-βgal des cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène 41
constitutivement actif KRas
7.3. Potentiel prolifératif des cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène 41
constitutivement actif KRas
7.4. Evaluation de l'expression protéique de Pumilio 2 dans les cellules MCF-7 42
transduites avec l'oncogène constitutivement actif MEK DD
7.5. Activation de la voie des MAPK dans les cellules MCF-7 transduites avec 42
l'oncogène constitutivement actif MEK DD
DISCUSSION 43

BIBLIOGRAPHIE 47

INTRODUCTION

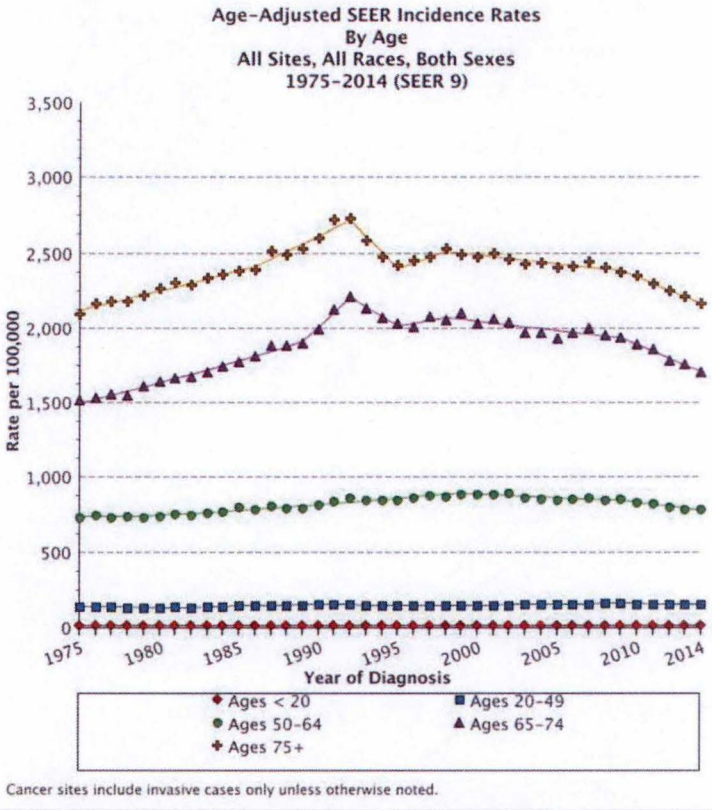


Figure I.1 : Incidence du cancer relativisée par tranche d'âge
Contrairement aux idées reçues, bien que l'incidence totale du cancer soit en augmentation constante, l'incidence relativisée par tranche d'âge et par rapport à l'augmentation de la population nous montre que le nombre de nouveaux de cas de cancer reste stable dans les populations jeunes et a tendance à baisser dans les populations âgées. (Image tirée du site http://seer.cancer.gov/)

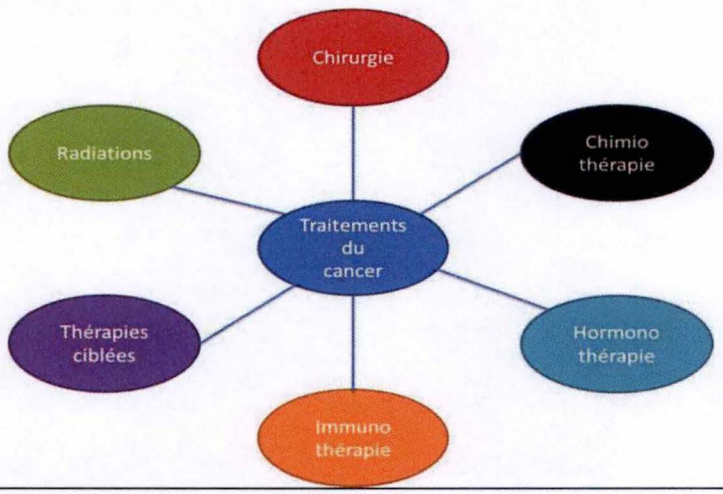


Figure I.2 : Différents traitements du cancer
Il existe à l'heure actuelle plusieurs types de thérapie contre le cancer. Les plus anciennes et encore aujourd'hui les plus utilisées sont la chimiothérapie et la radiothérapie. La chirurgie semble être, dans de nombreux cas, le seul moyen de pouvoir réellement guérir le cancer en retirant proprement toutes les cellules tumorales de l'organisme. Récemment, de nouvelles thérapies ont vu le jour. C'est le cas des thérapies ciblées et de l'immunothérapie.

1. Le cancer

1.1. Généralités

Le terme cancer regroupe plus de 200 maladies aux formes différentes, et tout autant de sous-types, pouvant toucher n'importe quelle partie du corps ou organe. Les cancers sont tous caractérisés par une prolifération incontrôlée de cellules ayant échappé à leurs mécanismes régulateurs intrinsèques formant alors, dans le cas des cancers solides, un néoplasme. Ce néoplasme envahit ensuite les tissus environnants, réduisant significativement la survie du malade. A ce dernier stade, certaines cellules acquièrent la capacité de migrer vers des organes distants. Ces cellules migrantes, appelées métastases, sont responsables de l'établissement de foyers secondaires à distance, foyers qui sont généralement la cause du décès du patient.

1.1.1 Incidence

Le cancer est à l'heure actuelle la deuxième cause de mortalité en Europe derrière les maladies cardiovasculaires, et la première cause de décès chez les moins de 65 ans d'après le site Eurostat *(http://ec.europa.eu/)*. En 2012, 3,45 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués en Europe avec une incidence légèrement plus haute chez les hommes (53% contre 47% chez les femmes). Les plus répandus étaient alors les cancers du sein, colorectal, de la prostate et du poumon, représentant à eux seuls 50% des nouveaux cas détectés *(Ferlay et al., 2013)*. Le nombre de décès, quant-à-lui, était de 1,75 million, avec un cinquième de ce total, uniquement dû au cancer du poumon *(Ferlay et al., 2013)*. L'incidence du cancer est en constante augmentation, passant de 2,9 millions de nouveaux cas, en Europe, en 2004, à 3,45 millions, en 2012 et cette tendance se confirme encore aujourd'hui *(Boyle & Ferlay, 2004)*. L'augmentation du nombre de cancers est due, en partie, à une modification de notre manière de vivre (alcool, tabagisme, obésité, exposition aux rayons ultraviolets, ...) ainsi qu'à certains facteurs environnementaux (ondes, amiante, pollution, pesticides). L'augmentation de l'incidence peut cependant être en grande partie expliquée par l'amélioration des techniques de dépistage, l'augmentation de la population (10 millions d'habitants supplémentaires en Europe entre 2000 et 2010) ainsi que par son vieillissement *(Hill, 2009 ; Jordan, 2016)*. Le cancer est en effet une maladie de la personne âgée avec 47% des cas survenant chez les plus de 70 ans, en France, en 2007 *(Grosclaude, 2007)*. Un vieillissement global de la population est observé depuis plusieurs années, dû à la diminution du nombre de naissances par couple et de la mortalité infantile ainsi qu'à une augmentation du taux de survie, grâce au développement de la médecine et à une amélioration des conditions de vie *(Beard et al., 2016)*. Nous pouvons donc nous attendre à voir l'incidence générale du cancer continuer à augmenter dans les prochaines décennies, bien que l'incidence relativisée, par la tranche d'âge et par l'augmentation de la population, devrait rester relativement stable *(Hill, 2009 ; Jordan, 2016 ; Grosclaude, 2007)* **[Figure I.1]**. Une étude prévoit essentiellement une augmentation de l'incidence des cancers féminins (sein et utérus), de la thyroïde, des mélanomes et des cancers du foie et du pancréas, qui devraient tous deux dépasser l'incidence des cancers colorectaux d'ici 2030 aux Etats-Unis *(Rahib et al., 2014.)* Un rapport de l'Institut de la Veille Sanitaire, publié en 2009, a aussi montré que, bien que la mortalité de la grande majorité des cancers ait diminuée en cinquante ans, grâce aux avancées de dépistage et thérapeutiques, celle de certains d'entre eux, comme les mélanomes, les myélomes ou le cancer du pancréas, a plutôt tendance à augmenter *(Hill, Doyon & Mousannif, 2009)*.

1.1.2 Traitements

Ces dernières années, de grandes avancées ont été faites aussi bien au niveau de l'amélioration du diagnostic, permettant ainsi de déceler plus précocement certains types de cancers, qu'au niveau des traitements avec l'arrivée du principe de médecine personnalisée. Les chimiothérapies et la radiothérapie ont été les principaux traitements administrés ces 40 dernières années, souvent en association avec de la chirurgie **[Figure I.2]**. La résection totale de

la tumeur, est souvent le seul traitement réellement efficace, mais reste impossible dans une majorité de cas *(Urruticoechea et al., 2010)*. Le principal désavantage de ces deux thérapies est leur faible spécificité pour les cellules cancéreuses. La radiothérapie affecte, sans distinction, tous les tissus traversés par les rayons X, les endommageant et pouvant entrainer l'apparition de cancers secondaires. La chimiothérapie, quant-à-elle, atteint les cellules en divisions. Elle affecte donc principalement les cellules cancéreuses mais aussi les cellules des racines capillaires, l'épithélium gastrique et les cellules myéloïdes et lymphoïdes, entrainant de nombreux effets secondaires potentiellement dangereux pour le patient *(Baudino, 2015)*. La plupart des chimiothérapies ciblent l'ADN afin d'empêcher la division des cellules cancéreuses et d'entrainer la mort cellulaire *(Baudino, 2015)*. Les cancers hormono-dépendants, comme certains cancers du sein et de la prostate, peuvent être traités par hormonothérapie, consistant à inhiber la synthèse et/ou l'action des hormones et ainsi créer un environnement défavorable au développement du cancer *(Urruticoechea et al., 2010)*. Plus récemment, depuis le début des années 2000, les thérapies dites « ciblées » ont commencé à voir le jour. Ces thérapies ont pour but d'avoir moins d'effets secondaires, par le ciblage d'enzymes ou autres protéines surexprimées par les cellules cancéreuses. Ces molécules peuvent être des anticorps dirigés vers les facteurs de croissance ou leurs récepteurs afin d'empêcher l'activation de ces derniers, ou des petites molécules inhibitrices dirigées vers les protéines impliquées dans les voies de signalisation, la plupart du temps des kinases *(Baudino, 2015)*. Ces traitements sont d'autant plus efficaces en présence ou en l'absence de certaines altérations génétiques. Pour les identifier, il est nécessaire d'avoir préalablement séquencé le génome de la tumeur. Le principal avantage de ces nouvelles thérapies est leur rapidité d'action. Chez la plupart des patients, les tumeurs régressent en à peine quelques jours, justifiant leur utilisation dans les situations d'urgence. Ce point positif est malheureusement, dans la quasi-totalité des cas, associé à l'apparition de résistance et à l'émergence de nouvelles tumeurs bien plus agressives après quelques mois de traitement seulement *(Huang et al., 2013)*. Une autre voie de traitement plus récente, et qui semble pour le moment être la plus prometteuse, est l'immunothérapie. Celle-ci consiste à réactiver le système immunitaire en inhibant les mécanismes d'échappement à l'immunité qu'exploitent habituellement les cellules cancéreuses *(Pardoll, 2016)*. Ces traitements sont bien plus efficaces dans les cancers comportant de nombreuses mutations (ex. cancer du poumon, colorectal, mélanome) que dans les cancers peu mutagènes (ex. leucémie, glioblastome). En effet, chaque mutation étant susceptible de créer des antigènes différents, plus le nombre de mutations est grand, plus la probabilité d'avoir des antigènes immunogènes capables d'induire une réponse anti-tumorale augmente. De plus, le système immunitaire ne s'active que graduellement, il faut donc généralement attendre au minimum 3 mois après le début du traitement pour observer une réponse *(Hoos et al., 2010)*. Malgré cette période de décalage, les immunothérapies anticancéreuses présentent pour le moment de très bons résultats ainsi que l'avantage de ne pas nécessiter de traitement prolongé dans le temps contrairement aux thérapies ciblées.

La constante augmentation de l'incidence des cancers et l'augmentation de la mortalité dans certains cas nous indiquent que cette maladie restera un problème majeur de santé publique pendant encore de nombreuses décennies. Malgré les grandes avancées en matière de dépistage et de traitement, le remède miracle n'existe pas et il reste plus que nécessaire d'améliorer les traitements existants et de découvrir de nouvelles cibles et stratégies thérapeutiques.

1.2 Une maladie génétique : équilibre entre oncogènes et suppresseurs de tumeur

Une cellule devient cancéreuse suite à l'acquisition de plusieurs modifications épigénétiques et altérations génétiques. Il peut s'agir de mutations ponctuelles, de duplications d'une partie du génome, de délétions, d'insertions voire de translocations. Un cancer survient lorsque ces altérations entraînent l'activation permanente d'un proto-oncogène (alors nommé oncogène) et/ou l'inactivation d'un suppresseur de tumeur *(Shortt & Johnstone, 2012)*.

1.2.1 Les oncogènes

Les oncogènes sont des gènes codant pour des onco-protéines. Celles-ci sont impliquées dans une dizaine de voies de signalisation contrôlant deux processus majeurs au sein de la cellule, à savoir, la prolifération et la survie cellulaire *(Lee & Muller, 2010)*. Ces onco-protéines peuvent être des facteurs de croissance, des récepteurs membranaires, des signaux de transduction qui se trouvent souvent être des protéines kinases, ou des facteurs de transcription *(Chan & McGee, 1987)*. L'activation anormale de ces oncogènes peut venir d'une surexpression du gène normal ou de l'expression d'une protéine mutante. Cette dernière peut être active de manière permanente, avoir une stabilité accrue, être recrutée plus efficacement en son site d'action ou se lier de manière anormale à un partenaire *(Shortt & Johnstone, 2012)*. Quelle que soit la raison de cette activation anormale, celle-ci conduit irrémédiablement à une prolifération anarchique des cellules. A l'heure actuelle, une soixantaine d'oncogènes ont été identifiés. Parmi les plus connus, les gènes *RAS*, *RAF* et *PI3K* codent pour des protéines impliquées dans la transduction des signaux de prolifération tandis que les gènes *EGFR*, *FGFR* et *PDGFR* codent pour les récepteurs aux facteurs de croissance, en amont de ces voies de signalisation *(Vogelstein et al., 2013)*. Le gène *MYC* code pour un facteur de transcription contrôlant l'expression de 15% du génome, conférant lui aussi un avantage prolifératif lorsqu'il est activé. Le gène *BCL2* est impliqué dans le contrôle de l'apoptose et le gène *VHL* dans l'angiogenèse. Le gène *NOTCH* et les gènes codant pour des enzymes modifiant la chromatine contrôlent la destinée de la cellule via une régulation générale de la transcription. Dans le cas des cancers, celles-ci vont avoir tendance à rester à un stade prolifératif plutôt que de se différencier *(Vogelstein et al., 2013)*. Les oncogènes sont les cibles principales de la recherche thérapeutique dans le cadre des nouvelles thérapies dites ciblées.

1.2.2 Les suppresseurs de tumeur

Contrairement aux oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur n'entraînent l'apparition d'un cancer que lorsqu'ils les deux copies du gène sont altérées et/ou réduites au silence. Cependant, il semble que beaucoup plus de cancers soient initiés par la perte de fonction d'un suppresseur de tumeur que par le gain de fonction d'un oncogène *(Morris et al., 2015)*, ceci peut s'expliquer par l'existence de « hot spots » de mutations au sein du génome (*Kandoth et al., 2013*). De plus, dans la plupart des cas, l'un des deux allèles est déjà altéré par une mutation héréditaire ou inactivée par une régulation épigénétique. Un peu plus de 70 suppresseurs de tumeur ont été découverts à ce jour (*Vogelstein et al., 2013)*. Ces gènes protecteurs peuvent être classés dans deux groupes distincts. Les « gatekeeper » contrôlent la croissance et le cycle cellulaire grâce à plusieurs points de contrôle et peuvent faire entrer les cellules en apoptose ou en sénescence en réponse à divers stress comme l'accumulation de dommages à l'ADN *(van Heemst, 2007)*. C'est par exemple le cas du gène *APC* et du gène *CDKN2A* qui code, via des cadres de lecture alternatifs, les protéines $p16^{INK4a}$ et $p14^{arf}$. La protéine $p16^{INK4a}$ bloque le cycle cellulaire en phase G1 en inhibant les kinases dépendantes des cyclines (CDK) 4 et 6. Celles-ci ne peuvent alors plus former de complexe avec la cycline D, empêchant ainsi la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb). Normalement, le suppresseur de tumeur Rb séquestre le facteur de transcription E2F1. La phosphorylation de Rb entraine un changement de conformation qui permet le relargage d'E2F1. Celui-ci promeut alors la progression du cycle cellulaire vers la phase S *(Rayess et al., 2012 ; Kim & Sharpless, 2006)*. La protéine $p14^{arf}$ séquestre la protéine MDM2 (murine double minute 2), l'empêchant ainsi d'inhiber la protéine p53. Le suppresseur de tumeur *TP53* (Tumor Protein 53) code pour le facteur de transcription p53, impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, de l'autophagie, de la sénescence et de l'apoptose *(Zilfou & Lowe, 2009)*. La phosphatase PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) agit comme suppresseur de tumeur en déphosphorylant le PI3P (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphophate), inhibant ainsi l'effet des PI3K (Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase) connues pour être impliquées dans la croissance cellulaire. Les « caretaker » maintiennent l'intégrité du génome en réparant les

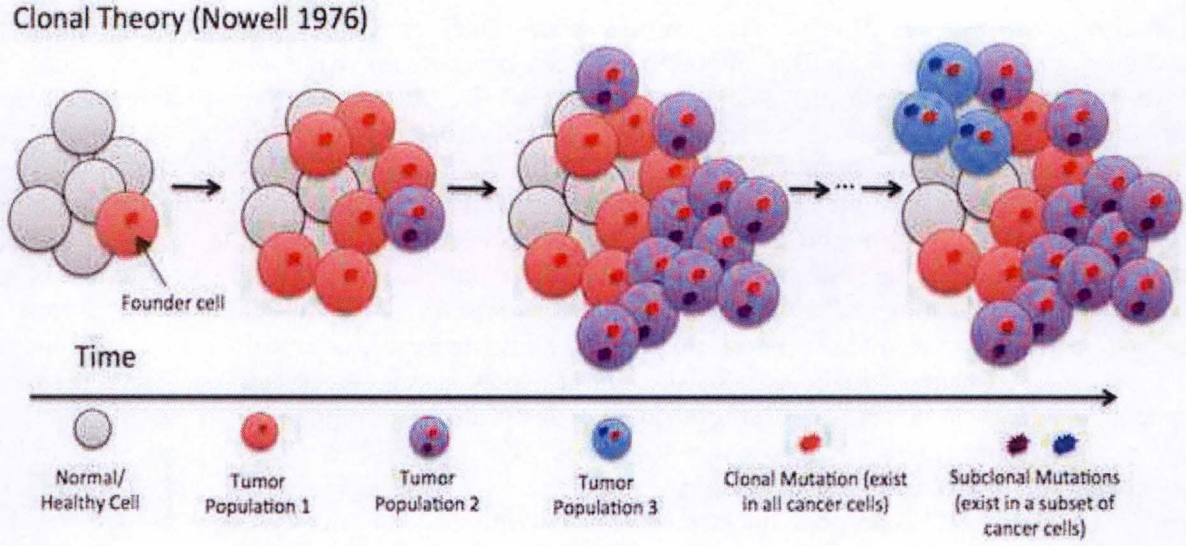


Figure I.3 : Hétérogénéité tumorale
Illustration de l'hétérogénéité tumorale comme imaginée par Nowell en 1976. Une cellule mutée va former un clone tumoral. En proliférant, les cellules issues de ce clone vont acquérir de nouvelles mutations. Si ces mutations leur confèrent un avantage sélectif, ces cellules vont former une nouvelle population clonale *(Nowell, 1976)*.

dommages subis par celui-ci, évitant ainsi l'apparition de mutations *(van Heemst, 2007)*. C'est par exemple le cas des protéines ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), BRCA (BReast CAncer) 1 et 2, MSH2 (MutS protein Homolog 2) et MLH1 (MutL Homolog 1) *(Vogelstein et al., 2013)*. L'inactivation de ces suppresseurs de tumeur entraîne donc une perte du contrôle du cycle cellulaire ainsi que des mécanismes de réparation de l'ADN, expliquant l'accumulation de nombreuses mutations dans les cellules cancéreuses.

1.3 Tumorigenèse et hétérogénéité tumorale

Comme décrit précédemment, un néoplasme peut apparaître suite à une unique mutation, entrainant la perte de fonction d'un suppresseur de tumeur ou l'activation d'un oncogène. Ces masses pré-tumorales, lorsqu'elles sont initiées par la suractivation d'un oncogène, semblent en être dépendantes quelques temps. De nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo* ont en effet montré que la seule inhibition de l'oncogène à l'origine du néoplasme était suffisante pour entraîner la régression de la lésion pré-tumorale *(Felsher, 2008)*, ce qui peut expliquer l'engouement de la recherche sur les thérapies ciblées ces dernières années. Il est cependant reconnu qu'une cellule ne peut être transformée et acquérir son caractère malin qu'après l'apparition d'au moins deux altérations géniques. L'activation prolongée d'un oncogène seul semble en effet plutôt induire un mécanisme de protection contre le développement de tumeurs : la sénescence induite par les oncogènes *(Serrano et al., 1997)*. Le gain de fonction d'un oncogène est donc généralement suivi de l'inactivation d'un ou plusieurs suppresseurs de tumeur. Les cellules cancéreuses doivent, de plus, être immortalisées pour se dupliquer de manière illimitée. Elles doivent aussi contourner certains programmes de sauvegarde comme l'apoptose et la sénescence et doivent s'adapter au microenvironnement tumoral pour résister, entre autres, à la diminution de l'apport en oxygène et en nutriments *(Hanahan & Weinberg, 2011)*. C'est l'émergence de mutations supplémentaires qui permet l'acquisition de ces diverses caractéristiques permettant d'échapper à la dépendance aux oncogènes. Les onco-protéines sont donc nécessaires mais pas suffisantes à la carcinogenèse *(Chan & McGee, 1987)*. Une tumeur évolue d'un caractère bénin vers un caractère malin en accumulant de nouvelles mutations. Une tumeur maligne est finalement le résultat d'un processus multi-étapes s'étalant sur plusieurs décennies et impliquant l'accumulation progressive de mutations touchant des gènes aux fonctions très diverses *(Weinstein & Joe, 2001)*. L'abondance de mutations détectées au sein des cellules cancéreuses provient de l'instabilité génomique due au stress de réplication induit par les oncogènes et/ou à des mutations dans les gènes codant pour les protéines de réparation de l'ADN *(Miron et al., 2015)*. Lorsque ceux-ci sont surexprimés, les cellules se divisent de façon anarchique et les protéines de points de contrôle ou de réparation de l'ADN ne peuvent exercer leur activité efficacement, permettant ainsi l'émergence de nombreuses mutations supplémentaires. Bien que certains cancers, comme les mélanomes, puissent avoir plusieurs centaines de mutations, d'autres comme les leucémies ne semblent en avoir qu'une petite dizaine en moyenne *(Vogelstein et al., 2013)*. Sur la totalité des altérations génétiques trouvées au sein des cellules transformées, un faible pourcentage seulement est responsable du développement et du maintien du cancer, ce sont les mutations dites « driver ». Une étude de plus de 3000 tumeurs ayant reporté pas moins de 300 000 mutations différentes n'a en effet mis en évidence que 125 mutations « driver » *(Vogelstein et al., 2013)*. La plus grande partie des mutations sont des mutations dites « passengers » et n'ont pas d'effet connu dans l'oncogenèse *(Greenman et al., 2007)*. Les mutations « driver » confèrent de nouveaux avantages sélectifs en termes de prolifération et de survie cellulaire et permettent la formation des sous-populations clonales au sein de la tumeur *(McGranahan & Swanton, 2015)*. Les populations clonales suivent ainsi les lois de la sélection naturelle de Darwin à la façon des populations animales *(Nowell, 1976)* **[Figure I.3]**. Cette évolution par embranchement explique que l'on retrouve automatiquement, au sein d'une même tumeur, des sous-populations génétiquement différentes et ce concept est aujourd'hui à la base des très nombreux cas de résistance aux thérapies

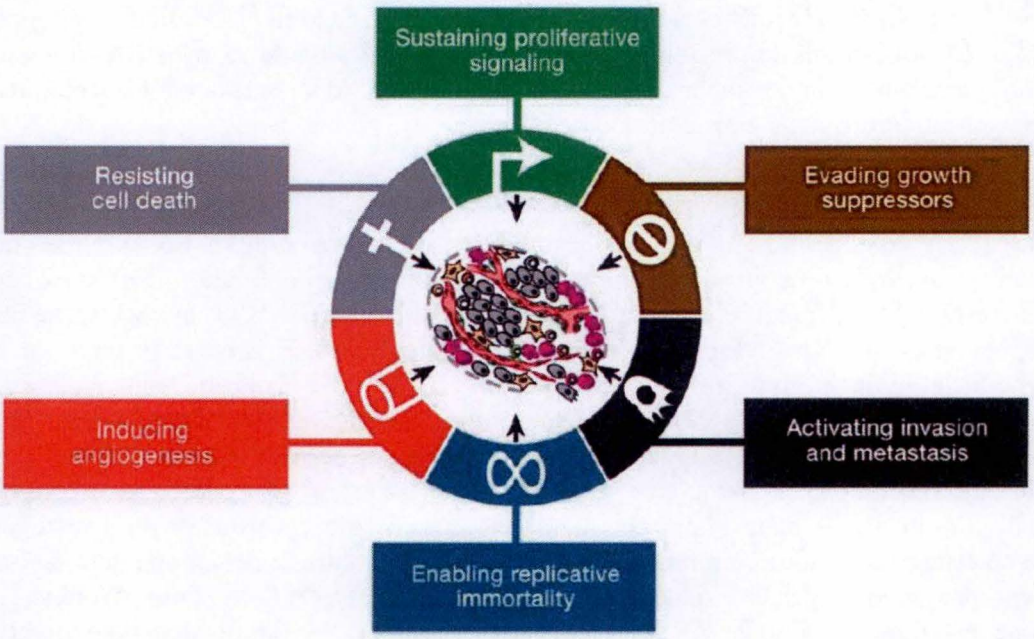


Figure I.4 : Les caractéristiques du cancer
Illustration des différentes caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses au cours de leur transformation *(Hanahan & Weinberg, 2011)*.

anticancéreuses et de rechutes de la maladie *(Fisher et al., 2013)*. La grande hétérogénéité inter-patient et intra-tumorale, ainsi que le haut taux de résistance aux traitements actuels, expliquent la nécessité de trouver rapidement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

1.4 Les caractéristiques du cancer

La tumorigenèse est un processus multi-étapes, reflétant de nombreuses altérations génétiques et conduisant à la transformation progressive d'une cellule normale vers une cellule maligne. Ces cellules transformées possèdent différents critères, trouvés de manière universelle dans les cellules cancéreuses, à savoir, l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, l'échappement à l'apoptose, à la sénescence et à la réponse immunitaire et finalement, l'invasion des tissus adjacents *(Hanahan & Weinberg, 2000, 2011)* **[Figure I.4]**.

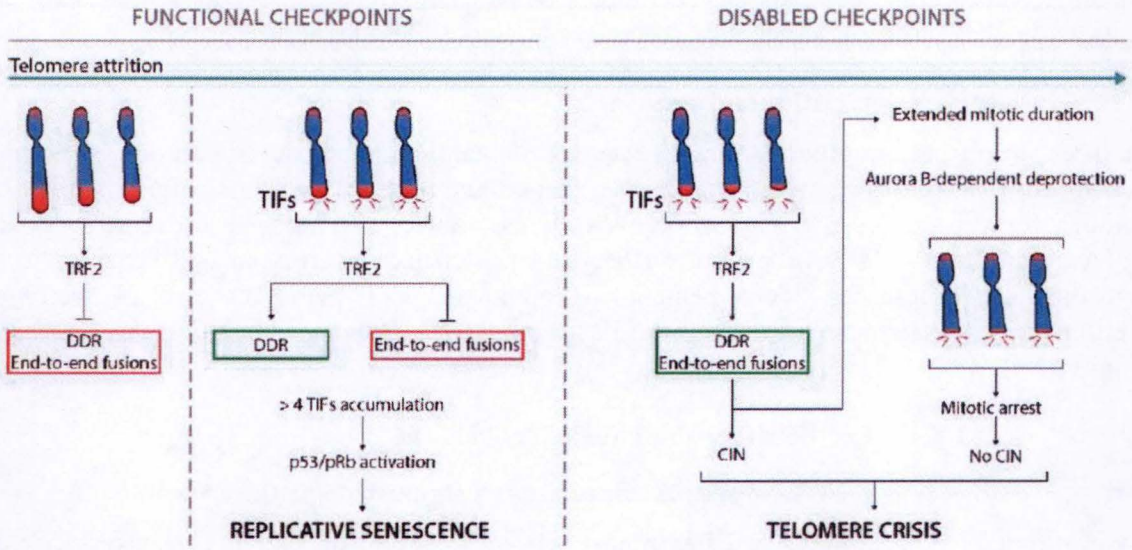
1.4.1 Prolifération soutenue et anarchique

1.4.1.1 Nouveaux rapports aux signaux de prolifération

La prolifération de cellules normales repose sur la réception de facteurs de croissance. Ces signaux moléculaires solubles sont détectés par des récepteurs transmembranaires situés à la surface des cellules et déclenchent une cascade de signalisation, comme la voie des MAP kinase, qui conduit, in fine, au passage de la cellule d'un état quiescent à un état prolifératif. Bien que la plupart des signaux de croissance proviennent de cellules voisines, les cellules cancéreuses sont capables de répondre à leurs propres stimuli. Cette autostimulation leur permet de ne plus être dépendantes des facteurs de croissance exogènes et donc de proliférer de manière autonome et totalement incontrôlée. Certaines mutations peuvent aussi entraîner une surexpression des récepteurs aux facteurs de croissance, entraînant une augmentation de leur concentration à la surface cellulaire et donc une sensibilité accrue des cellules aux signaux prolifératifs. Les cellules cancéreuses peuvent aussi acquérir le potentiel de proliférer sans stimulation par l'acquisition de différentes mutations touchant les récepteurs des facteurs de croissance ou les kinases en aval et entraînant ainsi l'activation constitutive des voies de signalisation menant à la prolifération de la cellule *(Hanahan & Weinberg, 2000 et 2011)*. En plus de ne plus être dépendantes des signaux prolifératifs des cellules voisines, les cellules cancéreuses deviennent insensibles aux signaux anti-prolifératifs comme le TGFβ (Transforming Growth Factor β). Le TGFβ agit en induisant la synthèse des protéines $p15^{INK4b}$ et p21 qui empêchent la phosphorylation de la protéine Rb en bloquant le complexe cyclineD-CDK4. Rb peut alors séquestrer le facteur de transcription E2F1 responsable de l'expression de nombreux gènes essentiels pour la progression de la phase G1 vers la phase S. L'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs peut venir d'une diminution d'expression ou d'une mutation des récepteurs au TGFβ ainsi que de mutations au niveau des gènes codant des protéines situées en aval de la voie de signalisation comme les protéines SMAD4 (Mothers against decapentaplegic homolog 4), $p15^{INK4b}$, Rb ou CDK4. L'inhibition de contact, qui permet de conserver l'homéostasie tissulaire, peut être supprimée via la perte de fonction des suppresseurs de tumeur NF2, qui renforce les adhésions cellule-cellule, et LKB1, une protéine de polarité qui contribue à l'organisation des épithéliums et qui protège les cellules de la transformation par l'oncogène c-Myc. Les cellules cancéreuses peuvent aussi échapper à la différenciation via la sur-expression de l'oncogène c-Myc. La compétition entre les protéines Myc et Mad pour former un complexe avec la protéine Max penche alors en faveur de l'oncogène et promeut la prolifération plutôt que la différenciation *(Hanahan & Weinberg, 2000 et 2011)*.

1.4.1.2 Immortalité réplicative

La plupart des cellules ont une capacité de prolifération limitée dans le temps *(Hayflick, 1997)*. Cette limite est due au raccourcissement progressif des télomères au cours de chaque cycle



<u>Figure I.5</u> : Raccourcissement des télomères et sénescence réplicative
Les télomères protègent l'extrémité des chromosomes et raccourcissent à chaque cycle cellulaire. Lorsqu'ils atteignent une taille critique, la DDR est activée au sein de la cellule et celle-ci entre en sénescence réplicative. Si la sénescence n'est pas induite et que les télomères continuent de s'éroder, la cellule atteint alors un état de « crise » *(Bernal & Tusell, 2018)*.

réplicatif, comme expliqué dans la *section 2.2.1*. Une fois que les télomères ont atteint une taille critique, les cellules ne sont plus capables de se répliquer et entrent en sénescence dite réplicative (RS). Si la sénescence est contournée et que les télomères continuent de s'éroder, la cellule atteint alors un état de « crise » durant lequel a lieu la fusion des extrémités chromosomiques, déclenchant le processus de mort cellulaire *(Bernal & Tusell, 2018)* **[Figure I.5]**. Les cellules peuvent sortir de cette crise en réactivant la télomérase. Cette protéine, hTert, est une enzyme responsable de l'élongation des télomères, leur permettant de rester au-dessus de la limite de taille critique. La grande majorité des cellules cancéreuses présentent une sur-expression de cette enzyme et acquièrent alors une capacité de prolifération illimitée *(Hanahan & Weinberg, 2000 et 2011)*. Le faible pourcentage de cellules cancéreuses n'exprimant pas hTert sont immortalisées via un processus de prolongation alternatif des télomères (ALT), reposant sur un allongement des télomères par recombinaison *(Muntoni & Reddel, 2005)*.

1.4.1.3 Echappement des programmes de sauvegarde

Lors de la détection d'un stress, comme des dommages à l'ADN, un stress mitotique ou oxydatif, une absence de signaux de survie ou de l'hypoxie, les cellules déclenchent des programmes de sauvegarde comme la mort cellulaire programmée, appelée apoptose, ou l'arrêt irréversible de la prolifération, appelée sénescence prématurée, en opposition à la RS.
La sénescence sera présentée en détails dans la *section 2*.
La protéine p53 est un facteur de transcription activé en réponse à de nombreux stress, qui régule positivement l'expression de différentes protéines pro-apoptotiques dont Bax (Bcl-2-associated X protein). Celle-ci est responsable d'une perméabilisation transitoire de la membrane externe des mitochondries, ce qui permet la translocation du cytochrome C (Cyt-C) de l'espace inter-membranaire vers le cytoplasme. Le Cyt-C active alors une cascade de caspases, des protéases à cystéine, reconnaissant des séquences particulières au sein des protéines et les clivant à cet endroit. Les caspases peuvent aussi être activées via les récepteurs de mort comme le FAS (First Apoptotique Signal receptor). Une fois activées, les caspases détruisent des organites et des éléments de structure et fragmentent le matériel génétique *(Elmore, 2007)*. Une sur-expression des facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-XL est retrouvée dans la moitié des cancers. Ces protéines sont des antagonistes de Bax et l'empêchent alors d'exercer son action même lors de la détection d'un stress. Les protéines p53 et PI3K, impliquées dans la transduction des signaux pro-apoptotiques sont retrouvées mutées dans une grande majorité de cancers. Les récepteurs FAS peuvent être sous-exprimés ou mutés. Les cellules peuvent aussi sécréter une forme soluble du récepteur qui va alors séquestrer les ligands, les empêchant de se lier à la surface de la cellule *(Hassan et al., 2014)*. L'autophagie, qui consiste en l'autodigestion de la cellule, semble aussi, à un stade précoce, être une barrière, qui doit être contournée pour que la tumorigenèse ait lieu. Un autre type de mort cellulaire, appelé nécrose, semble quant à lui, être plutôt pro-tumoral en relâchant des cytokines pro-prolifératives et en induisant le recrutement de cellules immunitaires, qui activent l'angiogenèse, la prolifération et l'invasion cellulaire *(Hanahan & Weinberg, 2011)*.
Le système immunitaire permet d'éliminer les corps étrangers potentiellement dangereux pour l'organisme tels que les virus ou les bactéries. Les cellules cancéreuses sont initialement considérées comme ne faisant pas partie du soi et sont éliminées par les cellules immunitaires qui servent alors de barrière contre la progression tumorale. Pour pouvoir progresser, les cellules cancéreuses déjouent cette barrière immunitaire via la réduction de l'expression d'antigènes tumoraux et de molécules co-stimulatrices pour empêcher l'activation des lymphocytes T (LT) ou via l'expression de molécules de surface inhibitrices comme PD-L1 (Programmed death-ligand 1) et CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) qui désactivent les LT et empêchent la destruction des cellules cancéreuses *(Vinay et al., 2015)*.

1.4.2 Adaptation à l'environnement tumoral

1.4.2.1 Angiogenèse

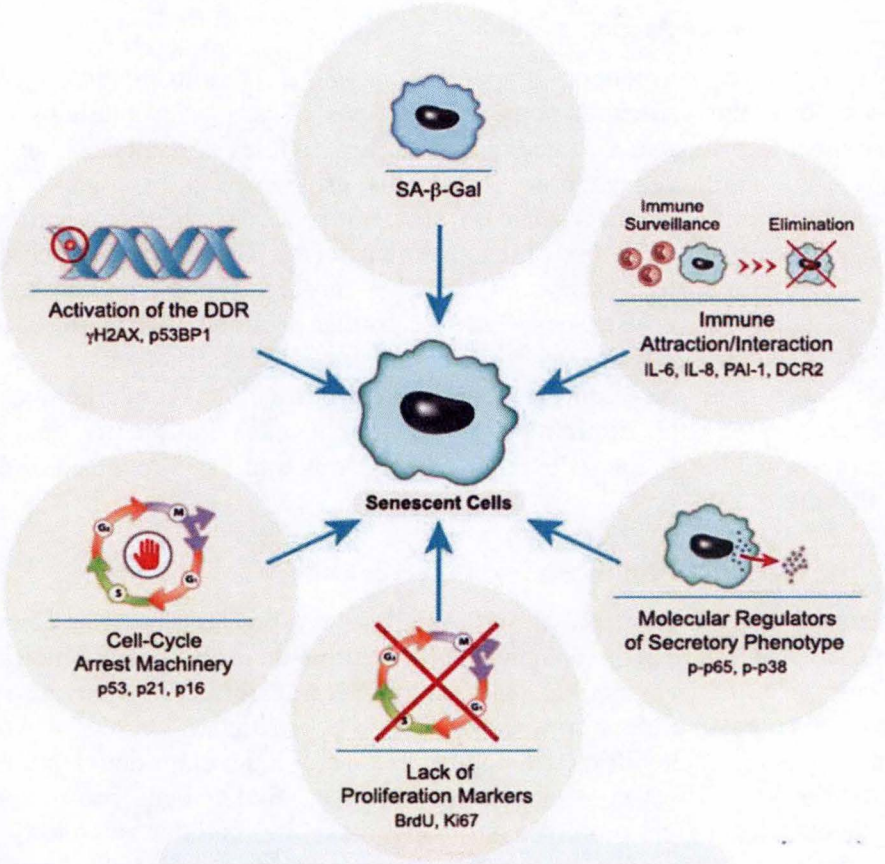
Les vaisseaux sanguins permettent d'apporter oxygène et nutriments aux cellules de l'organisme. Ces éléments, cruciaux pour les fonctions et la survie cellulaire ne permettent l'approvisionnement que sur une distance restreinte. Les cellules doivent donc se trouver à 100 µm maximum d'un capillaire sanguin. Lors de la croissance d'un organe, l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) est un processus très soutenu mais devient étroitement régulé une fois que le tissu est totalement formé. Les cellules cancéreuses doivent donc induire et soutenir l'angiogenèse au fur et à mesure que la tumeur croît. Une sur-expression des facteurs de croissance VEGF (Vascular Epithelial Growth Factor) et FGF (Fibroblast Growth Factor) est souvent observée dans les cellules cancéreuses. Ces protéines se lient à leurs récepteurs et induisent la prolifération des cellules endothéliales et donc la croissance des vaisseaux. Une diminution de l'expression des inhibiteurs de l'angiogenèse, comme la thrombospondine-1, dont l'expression est régulée par p53, peut aussi être observée *(Hanahan & Weinberg, 2011)*.

1.4.2.2 Modification du métabolisme

Pour assurer leur survie et leur prolifération, les cellules ont besoin d'énergie. Cette énergie est retrouvée, dans le cytoplasme, principalement sous la forme de molécules d'ATP (adénosine tri-phosphate). Dans des conditions normales, le glucose est transformé en pyruvate via la voie de la glycolyse pour être ensuite transformé en CO_2 avec la production couplée d'ATP grâce à la chaine respiratoire des mitochondries. En condition anaérobique, cette deuxième étape n'a pas lieu et la production d'ATP est considérablement réduite. Seules deux molécules d'ATP par molécule de glucose seront alors produites par la glycolyse. Les cellules en condition hypoxique et étonnamment, les cellules cancéreuses en général, semblent privilégier cette voie de la glycolyse au dépend de la chaine respiratoire. Les gènes codant pour des transporteurs du glucose et pour les enzymes de la glycolyse sont fortement exprimés dans les cellules cancéreuses. Ceci pourrait s'expliquer par l'apport important d'acides aminés et nucléiques via la glycolyse, éléments nécessaires aux cellules en division. Les cellules utilisant cette glycolyse aérobie secrètent du lactate, utilisé ensuite par les cellules voisines comme source de production énergétique. En absence d'un niveau de nutriments suffisants à la survie de la cellule, celle-ci peut augmenter son niveau d'autophagie. L'autophagie permet à la cellule de digérer ses propres organites et d'utiliser les métabolites résultants pour combler son déficit énergétique. L'inactivation des PI3K permet une régulation activatrice de l'autophagie dans les cellules cancéreuses *(Hanahan & Weinberg, 2011)*.

1.4.3 Invasion et métastases

Un cancer ne reste malheureusement jamais localisé très longtemps. Les cellules cancéreuses commencent par envahir les tissus environnants et finissent par atteindre les tissus éloignés en transitant via la circulation sanguine notamment. Pour cela, les cellules des carcinomes vont subir ce que l'on appelle une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) durant laquelle divers facteurs de transcription sont activés et entrainent la modulation de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire, la production de métalloprotéinases matricielles (MMP) et l'augmentation de la motilité et de la résistance à l'apoptose. Les cellules épithéliales acquièrent ainsi une forme plus fuselée, ressemblant aux fibroblastes. Les MMP digèrent la matrice extracellulaire (MEC) pour permettre la mobilité des cellules. Cette mobilité n'est possible que si les cellules cancéreuses se détachent de la MEC et des cellules voisines auxquelles elles adhérent. Les protéines d'adhérence cellule-cellule (surtout E-cadhérine) et cellule-MEC (intégrines) sont moins exprimées dans les cellules métastatiques. De plus, pour pouvoir migrer et coloniser un nouvel environnement, les cellules doivent s'adapter en exprimant des intégrines différentes. La



<u>Figure I.6</u> : Marqueurs biologiques de la sénescence
La sénescence peut être caractérisée par différents marqueurs biologiques tels que l'activité β-galactosidase, la sécrétion de protéines (SASP), l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire (p53, p21 ou p16) ou encore l'activation de la machinerie de réparation de l'ADN. L'ensemble de ces marqueurs biologiques permettent de déterminer l'entrée en sénescence d'une cellule *(Burton & Krizhanovsky, 2014)*.

N-cadhérine, impliquée dans la migration des cellules neuronales durant l'embryogenèse, est souvent un bon marqueur des cellules ayant effectuées une EMT *(Hanahan & Weinberg, 2000 et 2011)*.

2. La sénescence

La sénescence cellulaire est définie par un arrêt irréversible de la prolifération de la cellule. Elle a été mise en évidence pour la première fois, en 1961, par Leonard Hayflick et Paul Moorhead *(Hayflick & Moorhead, 1961)*. Ces derniers ont constaté que les fibroblastes primaires, contrairement aux cellules cancéreuses habituellement étudiées à l'époque, ne pouvaient se dédoubler qu'un nombre limité de fois. Cette quantité de dédoublements semblait dépendre uniquement du type cellulaire étudié *(Hayflick, 1965)* et fût nommée « limite de Hayflick ». L'hypothèse suggérant que cette sénescence naturelle, dite réplicative était impliquée dans le vieillissement et le cancer fut rapidement énoncée et des mécanismes d'induction prématurée de la sénescence, via différents stress, furent mis en évidence par la suite.

2.1. Les caractéristiques de la sénescence cellulaire

Les cellules sénescentes, contrairement aux cellules apoptotiques, sont toujours vivantes et métaboliquement actives. En opposition aux cellules quiescentes, l'arrêt de leur prolifération est défini comme irréversible car aucun des stimuli physiologiques connus n'est capable de la réactiver. Ces cellules présentent de nombreuses modifications morphologiques, physiologiques et d'expression des gènes, reflétant leur changement d'état. Bien que les bio-marqueurs de la sénescence soient nombreux, l'identification des cellules sénescentes reste complexe car aucun d'eux, pris individuellement, ne permet de caractériser ces cellules de manière certaine. Il est donc nécessaire de combiner plusieurs bio-marqueurs afin de s'assurer du caractère sénescent des cellules étudiées *(Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007)* **[Figure I.6]**.

2.1.1. Arrêt de la prolifération

L'une des principales caractéristiques de la sénescence est l'arrêt irréversible de la prolifération. Le cycle cellulaire est régulé par des sérine/thréonines kinases dépendantes des cyclines (CDK) qui nécessitent d'être associées à une petite protéine régulatrice, la cycline, pour être activées. L'association des CDK4/6 avec la cycline D initie en effet le passage de la phase G1 (croissance) à la phase S (synthèse de l'ADN) du cycle cellulaire tandis que l'association de CDK2 avec les cyclines A et E déclenche la réplication de l'ADN *(Bringold & Serrano, 2000)*. Afin de contrôler la prolifération de manière plus pointue, une régulation négative est effectuée par deux familles de protéines inhibitrices de CDK, les CKI, engendrées par les gènes INK4 et Cip/Kip. La famille INK4 est composée des protéines $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$ et $p19^{INK4d}$. Ces protéines inhibent l'interaction cycline D-CDK 4/6 en se liant spécifiquement aux CDK et empêchent ainsi la libération du facteur de transcription E2F de la protéine du rétinoblastome (pRB). E2F est impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes permettant la progression du cycle cellulaire *(Kim & Sharpless, 2006)*. Le gène CDKN2A, qui code pour la protéine $p16^{INK4a}$, code aussi, via un épissage alternatif, pour la protéine $p14^{Arf}$ (Alternatif Reading Frame). $p14^{Arf}$ forme un complexe stable avec la protéine MDM2, l'empêchant ainsi de dégrader la protéine p53 qui inhibe le cycle cellulaire en augmentant l'expression de la CKI $p21^{Cip}$ en aval de la voie. La famille Cip/Kip est composée des protéines $p21^{Cip}$, $p27^{Kip1}$ et $p57^{Kip2}$ qui inhibent le complexe cycline A/E-CDK2. Contrairement aux protéines de la famille INK4, celles-ci peuvent se lier aux CDK mais aussi aux cyclines. De plus, ces protéines peuvent aussi être activatrices du cycle cellulaire en stabilisant le complexe cycline D-CDK4/6 *(Bringold & Serrano, 2000)*. Les principales CKI impliquées dans la sénescence sont $p16^{INK4a}$, $p14^{Arf}$ et $p21^{Cip}$. Leur surexpression entraine l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et peut être utilisée comme bio-marqueur de la sénescence *(Besson et al., 2008)*. Il convient cependant de les

combiner avec d'autres biomarqueurs puisque l'arrêt du cycle cellulaire n'est pas spécifique des cellules sénescentes mais peut aussi être observé chez les cellules différenciées.

2.1.2. Morphologie

Les cellules sénescentes sont reconnaissables en culture de par leur forme large et aplatie. Elles présentent un agrandissement de leur compartiment cytoplasmique, qui comprend de nombreuses vacuoles ainsi qu'un élargissement du noyau qui peut devenir poly-nucléé. Il semble que la morphologie de la cellule sénescente puisse différer suivant le stress appliqué. En effet, l'induction de la sénescence, dans des fibroblastes humains (IMR90), via une surexpression de l'oncogène Ras semble entrainer une morphologie assez arrondie *(Serrano et al., 1997)* tandis que l'induction, plus spécifiquement, via la voie des MAPK entraine un allongement de la cellule et l'apparition de prolongements cytoplasmiques *(Zhu et al., 1998)*.

2.1.3. Activité β-galactosidase Associée à la Sénescence (SA- βgal)

Le bio-marqueur actuellement le plus utilisé lors de l'étude de la sénescence, est l'activité β-galactosidase des cellules. La β-galactosidase hydrolyse les β-galactosides dans les lysosomes. Son activité peut être suivie en apportant aux cellules un substrat incolore chromogène, le X-gal. Lors du clivage de ce substrat, un composé bleu est libéré permettant ainsi de détecter l'activité de l'enzyme *(Debacq-Chainiaux et al., 2009)*. En conditions normales, l'activité β-galactosidase est optimale à un pH de 4. Les cellules sénescentes présentent une augmentation de leur masse lysosomale permettant la détection de l'activité enzymatique à un pH sub-obtimal de 6 *(Kurz et al., 2000)*. L'activité β- galactosidase peut être augmentée suite à une trop forte confluence des cellules, ce marqueur ne peut donc pas être utilisé seul.

2.1.4. Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence (SASP)

Les cellules sénescence sécrètent de nombreux facteurs différents, incluant des cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8), des facteurs de croissance et des MMP ayant la capacité de dégrader la MEC. Ce phénotype sécrétoire associé à la sénescence est appelé SASP *(Gorgoulis et al., 2010)*. Les facteurs sécrétés par le SASP altèrent le microenvironnement tumoral et peuvent avoir un rôle aussi bien anti- que pro-tumoral comme nous le verrons dans la *section 2.2.4*.

2.1.5. Foyers d'Hétérochromatine Associés à la Sénescence (SAHF)

Les noyaux de cellules sénescentes, contrairement aux cellules normales, laissent apparaitre des zones ponctuelles de chromatine condensée, appelés foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF). Ces réarrangements chromatiniens semblent être établis suite à un stress mitotique ou génotoxique, via la voie $p16^{INK4a}$/Rb. Ils semblent être impliqués dans le maintien stable de la sénescence en bloquant l'accès du facteur de transcription E2F au promoteur de ses gènes cibles dans la réplication cellulaire. Suite au stress subi par la cellule, des modifications ont lieu au niveau des histones et des protéines non-histones associées à la chromatine, entrainant une condensation stable de celle-ci et une répression de la transcription des gènes cibles d'E2F *(Brondello et al., 2012)*.

2.1.6. Résistance à l'apoptose

L'apoptose est définie comme la mort propre et programmée des cellules. Les cellules sénescentes semblent être hautement résistantes aux signaux pro-apoptotiques dépendants de la voie p53 *(Seluanov et al., 2001)*. Ceci peut être dû à une altération de la voie p53 mais aussi à une surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules sénescentes *(Childs et al., 2014)*. Bien que les mécanismes d'apoptose et de sénescence semblent être interconnectés et

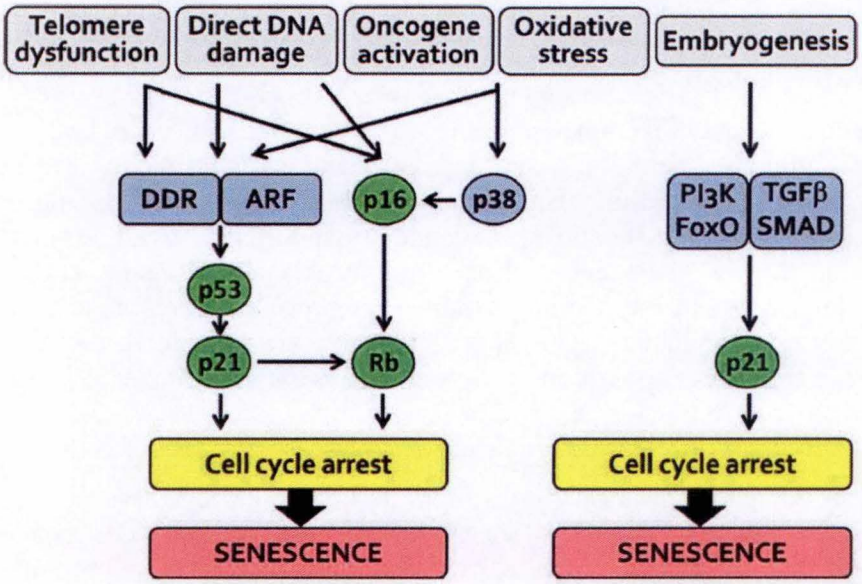


Figure I.7 : Différents inducteurs de la sénescence
Illustration des différents inducteurs de la sénescence et des voies de signalisation respectives qu'ils activent pour entrainer un arrêt du cycle cellulaire. La sénescence peut être induite par une dysfonction des télomères, des dommages à l'ADN, l'activation d'un oncogène ou un stress oxydatif. Elle semble aussi avoir un rôle important durant l'embryogenèse *(Aravinthan, 2015)*.

avoir tous deux un rôle de protection de l'homéostasie tissulaire, les raisons pour lesquelles les cellules vont évoluer plutôt vers l'un que vers l'autre suite à un stress ne sont pas encore clairement comprises. Il est possible que la réponse dépende du type cellulaire ou du type et de l'intensité des stimuli perçus par la cellule lors de l'entrée en sénescence *(Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007)*.

2.1.7. Altération de l'expression génique

Les cellules sénescentes présentent des modifications du profil d'expression de nombreux gènes expliquant leur changement de phénotype. Parmi eux, l'expression des CKI ($p16^{INK4a}$ et $p21^{Cip}$) est fortement augmentée et l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, comme les cyclines, est diminuée. Ces gènes peuvent être réprimés par la séquestration du facteur de transcription E2F via la protéine Rb ou par les SAHF. D'autres gènes codant pour des cytokines inflammatoires ou des protéines remodelant la MEC sont surexprimés dans les cellules sénescentes, reflétant le SASP *(Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007)*.

2.2. Inducteurs de la sénescence [Figure I.7]

2.2.1. Sénescence réplicative (RS)

Les extrémités chromosomiques sont protégées par plusieurs milliers de séquences répétées de 7 paires de bases non codantes, TTAAGGG, que l'on appelle les télomères. Ces longues séquences, de 5-15kb chez les humains, forment une structure en tige-boucle qui, à l'aide du complexe de protéines shelterin, protège et empêche les deux bras du chromosome de fusionner par recombinaison homologue, ce qui entrainerait la mort de la cellule *(Bernadotte et al., 2016)*. L'ADN polymérase, complexe enzymatique impliqué dans la synthèse de l'ADN, ne semble pas être capable de répliquer entièrement l'extrémité 3' du brin d'ADN lors de sa synthèse, entrainant ainsi un raccourcissement des télomères de 50-100pb lors de chaque cycle réplicatif. Lorsque les télomères atteignent une taille critique, ils ne sont plus capables de former cette structure en tige-boucle et les extrémités d'ADN ainsi mises à nu sont reconnues par la cellule comme cassure double brin, déclenchant une réponse classique aux dommages à l'ADN (DDR), activant la voie p53, et entrainant un arrêt du cycle cellulaire *(von Zglinicki, 2001)*.

2.2.2. Sénescence Induite par les Oncogènes (OIS)

Un autre type de sénescence a été découvert en 1997 par Serrano et al. Ces chercheurs ont constaté, que l'induction de l'expression de l'oncogène muté $HRas^{V12}$, dans des fibroblastes embryonnaires humains et murins, entrainait, contrairement à leurs attentes, un arrêt de la prolifération avec augmentation de l'expression de $p16^{INK4a}$ et $p19^{Arf}$ (équivalent murin de $p14^{Arf}$) *(Serrano et al., 1997)*. Cette sénescence prématurée, indépendante du raccourcissement des télomères, est appelée sénescence induite par les oncogènes (OIS). Il semble que suivant le type cellulaire, cette OIS puisse être soit dépendante, soit indépendante des voies $p14^{Arf}$/p53/$p21^{Cip}$ et $p16^{INK4a}$/Rb *(Bianchi-Smiraglia & Nikiforov, 2012)*. Il a depuis été démontré que d'autres oncogènes, codant pour des protéines situées en aval de Ras, pouvaient induire la sénescence, comme $BRaf^{V600E}$ *(Zhu et al., 1998 ; Michaloglou et al., 2005)* ou *MEK (Lin et al., 1998)*. La sénescence peut aussi être induite via d'autres oncogènes comme *c-Myc (Campaner et al., 2009)* ou par la sur-activation de la voie PI3K suite à la perte du suppresseur de tumeur *PTEN (Chen et al., 2005)*. Cet arrêt de prolifération semble agir comme mécanisme de sauvegarde suite au stress réplicatif subi par la cellule et aux dommages à l'ADN subséquents. De plus, la surexpression de Ras est connue pour entrainer une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), pouvant elles aussi induire des dommages à l'ADN *(Lee et al., 1999)*. La sénescence induite par les oncogènes est donc considérée comme une barrière à

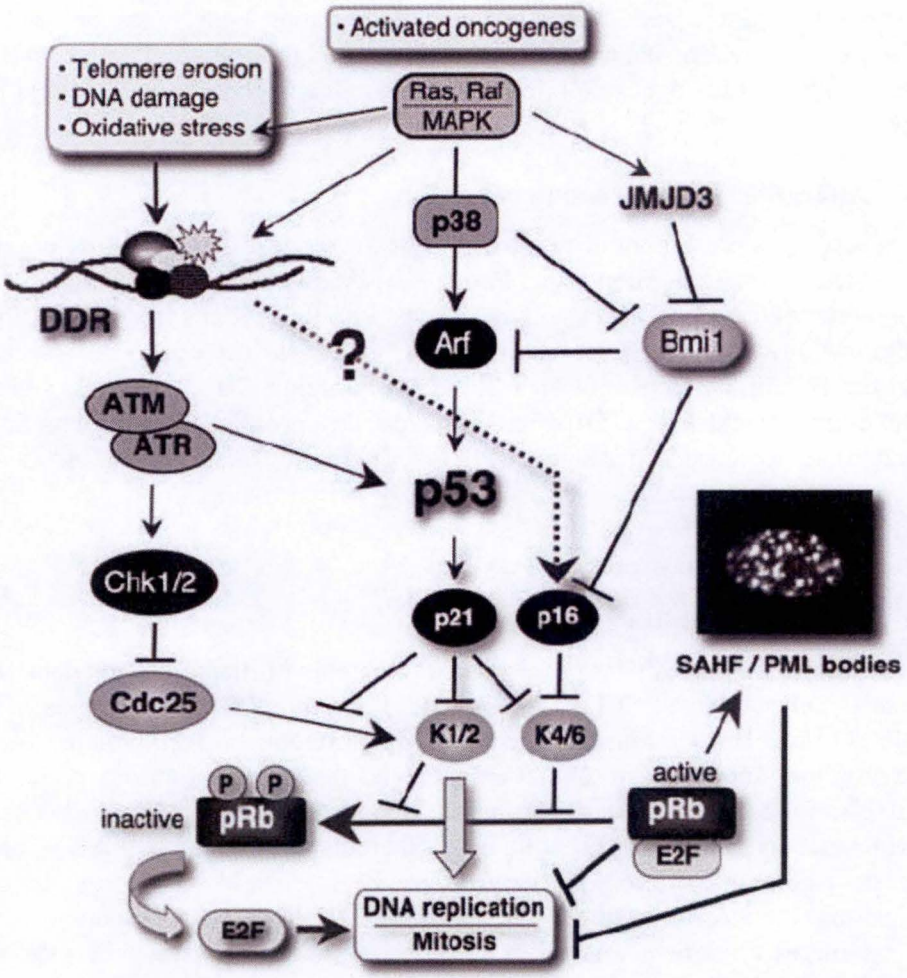


Figure I.8 : Différentes voies molécules impliquées dans le déclenchement de la sénescence
Illustration des cascades d'activation protéiques qui mènent à l'induction de la sénescence cellulaire. L'activation d'oncogènes, les dommages à l'ADN ainsi que le stress oxydatif peuvent induire les différents acteurs de la sénescence tels que p53, p16 ou p21. Au final, tous ces acteurs mènent à l'activation de la protéine Rb qui inhibe le cycle cellulaire *(Dulic, 2013)*.

la cancérogenèse et doit être contournée par les cellules dont l'ADN est endommagé pour permettre la transformation cellulaire.

2.2.3. Sénescence Induite Prématurément par les Stress (SIPS)

De la même manière que pour le stress réplicatif, la sénescence peut être induite prématurément via diverses autres sortes de stress. Parmi eux, le stress oxydatif, les substances génotoxiques (agents chimiothérapeutiques) ou les rayonnements (X, ultra-violets) responsables de dommages directs à l'ADN. L'augmentation de la quantité de ROS dans la cellule entraine une augmentation des dommages à l'ADN et est responsable de l'entrée en sénescence prématurée des cellules. La culture de cellules en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) induit en effet un arrêt de la prolifération *(Chen & Ames, 1994)* et l'utilisation d'antioxydants semble retarder l'entrée en sénescence. D'autres inducteurs connus sont l'activation chronique des cellules via le TGF-β ou d'autres cytokines *(Moiseeva et al., 2006)* mais aussi des modifications de la chromatine ou une réduction du pool de nucléotides.

2.3. Les voies de signalisation impliquées dans la sénescence

Les deux voies de signalisation principalement impliquées dans la sénescence, et généralement primordiales à son établissement et à sa maintenance, sont les voies p53 et Rb. Ces deux voies peuvent arrêter le cycle cellulaire en agissant aussi bien indépendamment que de concert suivant le type cellulaire et le mécanisme inducteur de la sénescence **[Figure I.8]**.

2.3.1. La protéine p53 et la sénescence

2.3.1.1. La réponse aux dommages à l'ADN (DDR)

La DDR est un mécanisme permettant d'arrêter temporairement le cycle cellulaire afin de permettre la réparation des dommages subis par l'ADN et éviter ainsi la propagation de cellules génétiquement altérées. Cependant, si les dommages sont trop importants, la cellule entre en sénescence ou en apoptose. Les protéines ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) ou ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad-3 related protein) sont recrutées au niveau du site d'ADN endommagé et phosphorylent les histones H2AX présentes sur le site. La phosphorylation de ces histones peut être utilisée comme bio-marqueur des dommages à l'ADN et par extension, de la sénescence. Les histones H2AX phosphorylées entrainent le recrutement et l'activation d'une plus grande quantité d'ATM/ATR formant ainsi une boucle d'amplification et une élongation du signal le long du brin d'ADN. Une fois que le niveau d'activité d'ATM/ATR atteint un certain seuil, ces protéines activent respectivement Chk2 et Chk1 par phosphorylation. Chk1/2 phosphorylés diffusent ensuite le signal vers le noyau afin que la protéine CDC25, un activateur des CDK, soit réprimé et que la protéine p53 soit stabilisée, entrainant un arrêt du cycle cellulaire *(Aravinthan, 2015)*.

2.3.1.2. La voie $p14^{Arf}$/p53/$p21^{Cip}$

Le suppresseur de tumeur p53 est l'une des protéines les plus étudiées et les mieux décrites dans la littérature car retrouvé muté dans la moitié des cancers. En conditions normales, cette protéine possède un temps de demi-vie très limité car constamment ciblée pour dégradation par l'ubiquitine ligase E3 HDM2 (MDM2 chez les souris). Lors de la DDR, p53 peut être directement stabilisée par phosphorylation ou acétylation via l'activation des voies ATM/ATR et Chk1/Chk2 *(Aravinthan, 2015)*. p53 est aussi stabilisée par la surexpression de $p14^{Arf}$. La protéine $p14^{Arf}$ forme un complexe stable avec la protéine HDM2, empêchant ainsi la dégradation de p53. L'augmentation du taux de p53 subséquent à sa stabilisation entraine l'augmentation de l'expression de $p21^{Cip}$ et donc l'arrêt du cycle cellulaire *(Bringold & Serrano, 2000)*. La protéine $p21^{Cip}$ est capable d'agir sur la voie $p16^{INK4a}$/Rb en inactivant la protéine Rb.

2.3.2. La voie p16^{INK4a}/Rb et la sénescence

La protéine p16^{INK4a} est un important suppresseur de tumeur inactivé dans plus de 30% des cancers. Son expression est progressivement augmentée au cours des dédoublements cellulaires et l'inactivation de la voie p16^{INK4a}/Rb entraine l'immortalisation des lignées de cellules. La CKI p16^{INK4a} interagit spécifiquement avec le complexe cycline D-CDK4/6, l'empêchant ainsi de phosphoryler la protéine Rb. La forme hypophosphorylée de la protéine Rb lui permet de se lier au facteur de transcription E2F, l'empêchant d'agir sur ses gènes cibles impliqués dans la progression du cycle cellulaire *(Bringold & Serrano, 2000)*. La protéine Rb peut aussi stabiliser la protéine p53 en se fixant à HDM2.

2.4. Rôles de la sénescence

La sénescence est impliquée dans divers processus physiologiques comme la réparation des tissus, le développement embryonnaire, ainsi que dans des processus pathologiques comme le cancer et les autres maladies liées à l'âge. La majorité de ces effets semble être liée à la sécrétion du SASP.

2.4.1. Sénescence et vieillissement

En mettant en évidence la sénescence, Hayflick et Moorhead avait rapidement émis l'hypothèse que celle-ci devait être liée au vieillissement. Depuis, de nombreuses preuves ont pu appuyer cette hypothèse. Les cellules sénescentes semblent en effet s'accumuler dans les tissus âgés comme démontré dans de la peau humaine *(Dimri et al., 1995)* ou de primates *(Herbig et al., 2006)* ainsi que dans les reins de rongeurs *(Melk et al., 2003)*. Elles semblent aussi être présentes sur le site des maladies liées au vieillissement comme la maladie d'Alzheimer *(Boccardi et al., 2015)* ou les maladies cardiovasculaires *(Olivieri et al., 2013)*. La plupart des maladies chroniques liées à l'âge pourraient être dues à la présence persistante des cellules sénescence au sein des tissus et aux cytokines inflammatoires présentes dans le SASP *(Rodier & Campisi, 2011)*. Il n'est pas encore déterminé si cette augmentation du nombre de cellules sénescentes avec l'âge est due à une augmentation de la quantité de cellules entrant en sénescence ou à une diminution de leur clairance par le système immunitaire. L'élimination de cellules sénescentes, p^{16INK4a} positives, dans des modèles murins a permis de montrer une diminution des maladies liées à l'âge *(Baker et al., 2012)* tandis que des modèles murins dont l'activité de p53 est augmentée montrent une accélération du phénotype lié à l'âge *(Tyner et al., 2002)*. Il semble donc que la sénescence et le vieillissement sont bien liés.

2.4.2. Sénescence et cancer

La sénescence est, de manière générale, considérée comme une barrière anti-tumorale qui doit être franchie pour permettre l'établissement de tumeurs. Comme nous l'avons vu dans la *section 2.2*, la sénescence peut être induite suite à divers stress responsables de dommages à l'ADN ou via la surexpression d'oncogènes, deux évènements pouvant conduire à l'émergence d'un cancer. De plus, des études ont montré la présence de cellules sénescentes durant les stades précoces du développement tumoral. Celles-ci étaient cependant absentes dans les stades tardifs *(Bartkova et al., 2006)*. Les interleukines 6 (IL-6) et 8 (IL-8) ainsi que l'IGFBP7 (insulin-like growth factor-binding protein 7), sécrétés lors du SASP permettent de renforcer l'arrêt du cycle cellulaire causé par les oncogènes Ras et Raf *(Wajapeyee et al., 2008 ; Kuilman et al., 2008)*. Ensemble, ces résultats soulignent l'aspect anti-tumoral de la sénescence.
Cependant, la sécrétion du SASP par ces mêmes cellules sénescentes semble, en opposition avec les observations décrites dans le paragraphe précédent, avoir un rôle pro-tumoral. La culture des cellules épithéliales pré-néoplasiques avec des fibroblastes sénescents favorise la transition épithélio-mésenchymateuse et entraine la formation de tumeurs, ce qui n'est pas le cas avec des fibroblastes normaux (Krtolica et al., 2001 ; Coppé et al., 2008). Ces résultats ont été validés

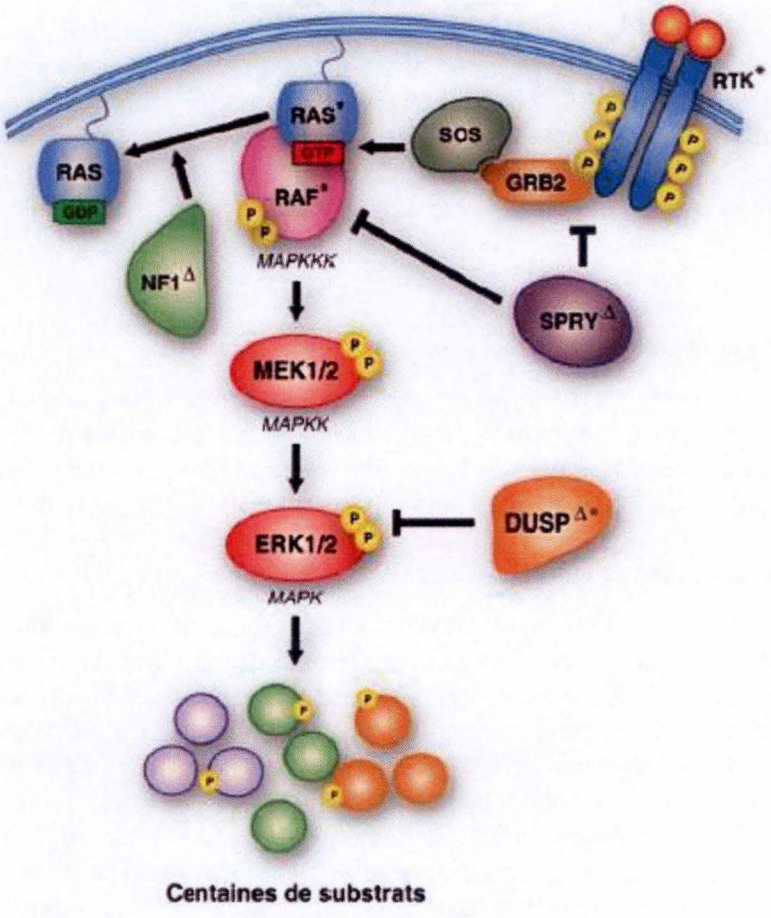


Figure I.9 : La voie des MAPK
Illustration de la voie des MAPK. La voie des MAPK est activée suite à la liaison d'un ligand sur le récepteur à activité tyrosine kinase. Une fois activé, ce récepteur permet le recrutement de protéines adaptatrices qui vont activer la protéine Ras. Celle-ci va à son tour activer les kinases Raf qui vont activer les kinases MEK. Les protéines ERK sont les dernières kinases de la voie et vont exercer leur action sur des centaines de cibles cytoplasmiques et nucléaires (Image tirée de la thèse de Deschênes-Simard, 2014).

dans des modèles murins de xénogreffe *(Liu & Hornsby, 2007)*. Les effets des cellules sénescentes semblent être liés aux facteurs du SASP. En effet, les facteurs de croissance stimulent la prolifération des cellules environnantes tandis que les MMP facilitent l'invasion des cellules malignes en dégradant la MEC. De plus, les cellules sénescentes aident les cellules cancéreuses à échapper au système immunitaire en clivant les récepteurs de surface des cellules Natural Killer (NK). Le VEGF, quant-à-lui, permet l'angiogenèse nécessaire à la croissance des tumeurs. L'accumulation des cellules sénescentes avec l'âge permet ainsi de créer un microenvironnement permissif à l'établissement et à l'évolution de tumeurs *(Campisi, 2013)*.
Ces diverses observations montrent que le SASP peut avoir une influence duale et complexe sur les cellules avoisinantes ainsi que sur leur microenvironnement et son rôle exact dans la cancérogenèse reste encore à déterminer.

2.4.3. Autres rôles de la sénescence

D'autres rôles de la sénescence ont été découverts par la suite. Le SASP pourrait aussi être impliqué dans la réparation des tissus grâce aux interleukines, qui permettent de recruter différents types de leucocytes et ainsi, d'éliminer les pathogènes et les cellules endommagées. Les facteurs de croissance permettent de reformer le tissu suite à la blessure et les protéases permettent de réduire la fibrose au sein du tissu hépatique *(Krizhanovsky et al., 2008)*. Des études ont aussi montré le rôle primordial de la sénescence dans le remodelage des tissus durant le développement embryonnaire *(Muñoz-Espín et al., 2013)*.

3. La voie des MAPK

La voie Ras/Raf/MEK/ERK, autrement appelée voie des MAPK (mitogen-activated protein kinases), est une chaine de protéines kinases impliquées dans la transduction du signal intracellulaire, de la membrane cytoplasmique vers le noyau **[Figure I.9]**. Bien qu'elle soit décrite, dans cette partie, de manière très linéaire, il existe, en réalité, de nombreuses interactions avec d'autres voies comme par exemple la voie PI3K. La voie des MAPK est impliquée dans la régulation de la croissance, la prolifération, la survie, la différenciation, la migration cellulaire ainsi que l'angiogenèse.

3.1. La voie canonique des MAPK

3.1.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase

La voie des MAPK est activée lors de la liaison de facteurs de croissance, d'hormones ou de cytokines sur les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Les RTK monomériques sont composés d'une chaine polypeptidique contenant un domaine de liaison au ligand extracellulaire, d'un domaine hélicoïdal hydrophobe transmembranaire ancrant le récepteur dans la membrane cytoplasmique ainsi que d'un domaine intracellulaire responsable de la transduction du signal vers l'intérieur de la cellule, via son activité kinase *(Li & Hristova, 2006)*.
Lors de la liaison d'un ligand, les récepteurs RTKs subissent des changements conformationnels permettant leur homodimérisation (à l'exception des récepteurs à l'insuline qui se trouvent déjà sous forme de dimère). Les domaines intracellulaires possèdent une activité tyrosine kinase ainsi que des domaines riches en tyrosine. Le rapprochement des récepteurs permet alors la transphosphorylation de ces domaines intracellulaires avec consommation d'une molécule d'ATP pour chaque tyrosine phosphorylée *(Lemmon & Schlessinger, 2010)*. La phosphorylation des récepteurs permet l'ancrage de molécules adaptatrices comportant un domaine de liaison aux phosphotyrosines comme les domaines SH2 (Src homology-2) ou PTB (phosphotyrosine-binding) *(Hubbard & Miller, 2007)*. Les RTKs sont impliqués dans des fonctions cellulaires essentielles comme la prolifération, la différenciation, la survie et la migration cellulaire ainsi que dans le métabolisme et le contrôle du cycle cellulaire *(Lemmon & Schlessinger, 2010)*. Il en existe 58, regroupées en 20 familles, suivant leur structure et leur fonction. Parmi elles se

trouvent la famille des récepteurs aux hormones et facteurs de croissances EGFR (epidermal growth factor receptors), FGFR (fibroblast growth factor receptors), IGFR (insulin-like growth factor receptors), PDGFR (platelet-derived growth factor receptors) et VEGFR (vascular endothelial growth factor receptors) *(Li & Hristova, 2006)*.

3.1.2. Les protéines Ras

Les protéines Ras (rat sarcoma) sont de petites protéines G monomériques, très conservées au cours de l'évolution et impliquées dans la transduction des signaux. Ces protéines, ancrées à la membrane via une molécule de farnésyl ou de géranylgéranyl, sont capables de lier du GDP (guanosine diphosphate), dans leur forme inactive, ou du GTP (guanosine triphosphate), dans leur forme activée, et sont impliquées dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Le passage d'un état à un autre est possible grâce aux protéines GAP (GTPases Activating proteins) qui favorisent l'activité GTPase intrinsèque des protéines Ras, conduisant à leur inactivation, et aux protéines GEF (Guanine Exchange Factor), qui favorisent la liaison avec le GTP et donc, l'activation des petites protéines G *(Hennig et al., 2015)*. Il existe, chez les mammifères, trois gènes Ras différents codant pour quatre isoformes : H-Ras (Harvey-Ras), N-Ras (Neuroblastoma-Ras) et K-Ras 4A et 4B (Kirsten-Ras). Ces isoformes ont une forte homologie mais subissent différentes modifications post-traductionnelles responsables de leur localisation subcellulaire. Les protéines K-Ras sont principalement localisées à la membrane plasmique tandis que H-Ras et N-Ras sont aussi trouvées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) ou de l'appareil de Golgi *(Chiu et al., 2002)*. Les protéines Ras sont activées suite à la phosphorylation des RTKs. La protéine Grb2 (growth factor receptor binding homology 2) possède un domaine SH2 lui permettant de reconnaitre et de se lier directement ou indirectement, via la protéine adaptatrice Shc, sur les résidus tyrosine phosphorylés des RTK. Ces protéines adaptatrices ne possèdent aucune activité enzymatique. La protéine Grb2 est constitutivement liée, grâce à ses domaines SH3, qui reconnaissent les régions riches en proline, à la GEF SOS (Son of Sevenless). Le recrutement de ce complexe Grb2-SOS au niveau de la membrane permet de rapprocher la protéine SOS de son substrat qu'elle va alors pouvoir activer. Celle-ci force la protéine Ras inactive à relâcher le GDP auquel elle est liée. Le GDP est alors rapidement remplacé par une molécule de GTP, présente en bien plus grande quantité dans le cytoplasme. La protéine Ras est ainsi activée et déclenche diverses cascades de phosphorylations dont la voie des MAPK *(Margolis & Skolnik, 1994)*.

3.1.3. Les protéines Raf

Les protéines Raf (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) sont les premières kinases de la voie des MAPK. Les monomères sont au nombre de trois : A-Raf, B-Raf et C-Raf (ou Raf1) et peuvent former jusqu'à six complexes différents par homo- ou hétérodimérisation. Les kinases Raf possèdent un domaine RBD (Ras-Binding Domain) leur permettant de se lier à la protéine Ras et un domaine riche en cystéines (CRD) leur permettant de s'ancrer dans la membrane, suivi d'un domaine riche en sérines et thréonines, qui doivent être phosphorylées pour permettre son activation. Les protéines Raf possèdent aussi un domaine catalytique tyrosine-kinase pour activer les enzymes en aval *(Roskoski, 2010)*. L'activation de la protéine Raf comprend plusieurs étapes. La forme inactive est issue d'une auto-inhibition de la protéine qui se replie sur elle-même. Sa région N-terminale entre alors en contact avec le site catalytique et entraine ainsi son inhibition. Ce repliement est effectué avec l'aide de la protéine chaperonne 14-3-3 qui se lie sur la protéine Raf suite à la phosphorylation de sérines spécifiques à chaque isoforme. De manière intéressante, ces sérines semblent faire partie des sites de phosphorylation des kinases ERK1/2 se trouvant en aval de la cascade des MAPK, suggérant un rétrocontrôle négatif de la voie. Une des étapes importantes de l'activation de la protéine Raf est son recrutement à la membrane plasmique grâce au domaine RBD qui permet sa liaison à la protéine Ras activée. Le domaine CRD quant à lui permet une liaison avec les phospholipides et donc son ancrage à la

membrane. Le site de liaison de la protéine chaperonne 14-3-3 est alors déphosphorylé directement par la protéine Ras ou par des phosphatases, ce qui permet le dépliement de la kinase Raf *(Lavoie & Therrien, 2015)*. Une autre étape importante est la dimérisation des protéines Raf, qui semble être nécessaire mais insuffisante à leur activation. La dernière étape est la phosphorylation de plusieurs sites au sein de la protéine dont, l'extrémité N-terminale, le site d'activation et un site de liaison à la protéine chaperonne 14-3-3 sur la partie C-terminale. Cette dernière permet, dans ce contexte, de stabiliser la dimérisation de la protéine Raf et de stimuler la liaison à l'ATP *(Lavoie & Therrien, 2015)*. La protéine Raf est ainsi activée.

3.1.4. Les protéines MEK

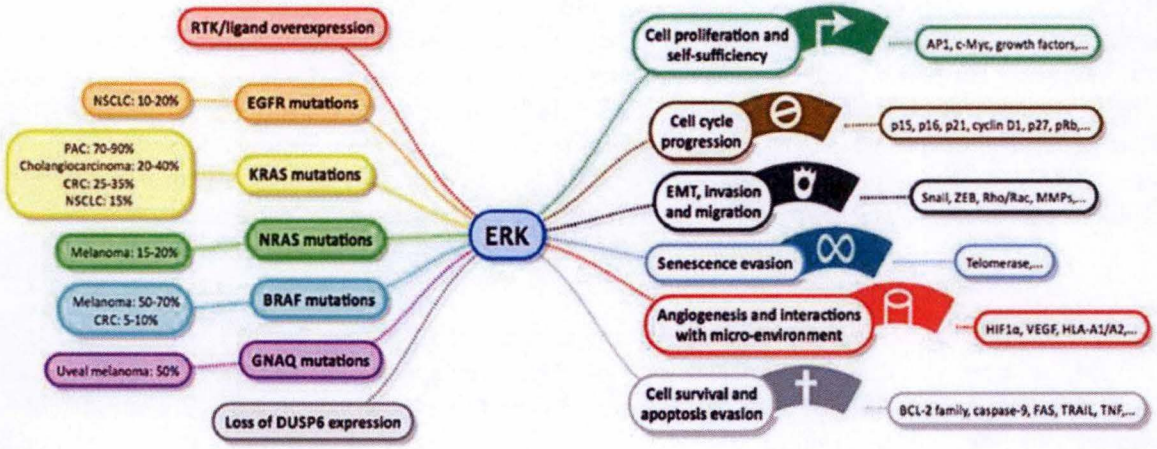
Les MAPK kinases (MAPKK) MEK (Mitogen-activated ERK kinase) font partie d'une famille de sept kinases à doubles spécificité, pouvant phosphoryler aussi bien des résidus sérines/thréonines que des résidus tyrosines. Les protéines MEK1 et MEK2 comportent un domaine riche en résidus basiques et hydrophobes appelé domaine D, qui leur permet de lier les MAPK ERK, un domaine NES (nuclear export signal) leur permettant d'être localisées dans le cytoplasme, un domaine riche en prolines, leur permettant d'interagir avec des protéines comportant un domaine SH3, ce qui pourrait influencer leur localisation cellulaire et enfin un domaine kinase *(Chen et al., 2001)*. Seules les MAPKK MEK1 et MEK2 sont capables d'activer les protéines ERK1/2. L'activation des protéines MEK1/2 a lieu suite à la phosphorylation, par les protéines Raf, de deux sérines spécifiques. Pour ce faire, deux protéines MEK se lient sur le dimère Raf formant ainsi un tétramère MEK-Raf-Raf-MEK. La phosphorylation des protéines MEK entraine un changement de conformation qui déstabilise le tétramère et conduit au relargage de ces deux kinases *(Haling et al., 2014)*. Ce changement de conformation pourrait aussi faciliter l'accès des kinases ERK au site de liaison des protéines MEK, le domaine D *(Akella et al., 2008)*. La protéine B-Raf semble être un activateur de MEK1/2 bien plus puissant que les deux autres kinases de la famille A-Raf et C-Raf *(Chen et al., 2001)*.

3.1.5. La protéine ERK

ERK1 (44 kDa) et ERK2 (42 kDa) (Extracellular signal-regulated kinase) sont les dernières sérine/thréonines kinases de la voie des MAPK. Ces protéines contiennent un domaine d'activation comprenant un motif TEY, qui doit être phosphorylé par les kinases à double spécificité MEK, ainsi qu'un domaine catalytique. L'interaction avec les protéines MEK a lieu grâce au domaine CD (common docking) de la protéine ERK, contenant des résidus acides. Ceux-ci forment en effet une liaison avec les résidus basiques du domaine D des protéines MEK *(Chen et al., 2001)*. Une fois phosphorylée, la protéine ERK peut aller, à son tour, phosphoryler plus de 80 cibles potentielles, aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau. La protéine ERK peut ainsi réguler l'expression de centaines de gènes, de manière directe en phosphorylant des facteurs de transcription comme Ets, Fos ou Myc qui contrôlent la transcription de gènes comme p21 ou la cycline D impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. La protéine ERK peut aussi réguler l'expression de gènes de manière indirecte en phosphorylant des protéines modificatrices d'histones ou activatrices de facteurs de transcription *(Chen et al., 2001)*.

3.2. La voie des MAPK et le cancer

La voie des MAPK étant, entre autres, impliquée dans la prolifération, la migration cellulaire et l'angiogenèse, elle joue un rôle important dans l'établissement et l'évolution de nombreux cancers. Diverses mutations touchant les récepteurs en amont ou les kinases de la voie sont en effet régulièrement détectées dans les tumeurs. Ces mutations entrainent la sur-activation de la voie des MAPK.



<u>Figure I.10</u> : Altérations moléculaires conduisant à l'activation de la protéine ERK
Illustration des différentes altérations moléculaires pouvant toucher la voie des MAPK et lien avec leur effet sur la cellule. La voie des MAPK peut être altérée à tous les niveaux. Des mutations peuvent toucher les récepteurs en amont ainsi que chacune des kinases de la voie. Celle-ci peut aussi être activée suite à la perte d'un régulateur négatif comme DUSP6 *(Neuzillet et al., 2014)*.

3.2.1. Les altérations de la voie des MAPK

La cascade des MAPK est l'une des voies les plus souvent altérées dans le cancer. Elle est en effet dérégulée dans environ 30 % des cas chez les humains. Ces altérations peuvent avoir lieu à plusieurs niveaux entrainant, dans tous les cas, une activation aberrante de la voie. Les mutations peuvent toucher les RTK en amont de la voie **[Figure I.10]**. Le récepteur EGFR est en effet muté dans 30 à 80% des cancers colorectaux, 50 à 60% des cancers pancréatiques et 60% des cancers du poumon non à petites cellules tandis que le récepteur HER-2 est muté dans 20% des cancers de l'estomac et du sein *(Regad, 2015)*. Les mutations peuvent entrainer une surexpression des récepteurs ou une activation constitutive de ceux-ci due à une dimérisation des RTK indépendante des ligands. La sur-activation de la voie peut aussi venir d'une activation indépendante des récepteurs de surface, via des mutations touchant essentiellement les protéines Ras et Raf. Ras est l'oncogène le plus souvent muté dans les cancers et les mutations de la protéine K-Ras étant beaucoup plus répandues que celles des protéines H-Ras et N-Ras. On les retrouve dans 90% des cancers du pancréas et 40% des cancers colorectaux. Parmi les mutations de K-Ras, la substitution d'une glycine en valine en position 12 ($K\text{-}Ras^{G12V}$) est la plus courante *(Maik-Rachline and Seger, 2016)*. Cette mutation entraine un changement de conformation de la protéine à proximité du site de liaison du GTP, et réduit l'activité hydrolase intrinsèque de la protéine K-Ras. Celle-ci devient, de plus, insensible aux protéines GAP et reste donc activée de manière constitutive *(Dhillon et al., 2005)*. La protéine B-Raf est plus souvent suractivée que les autres protéines de la famille, certainement dû à un taux basal d'activité supérieur en conditions normales. Elle est mutée dans 50 à 70% des mélanomes, 10 à 20% cancers colorectaux et 10% des cancers du pancréas. Il existe plus de 40 mutations des protéines B-Raf mais la plus répandue est la substitution d'une valine en acide glutamique en position 600 ($B\text{-}Raf^{V600E}$) conduisant à une activation de la kinase onze fois supérieure à la normale *(Santarpia et al., 2012)*. Les mutations des protéines Raf peuvent empêcher l'auto-inhibition de la kinase en touchant la partie N-terminale de la protéine ou les sites de liaison de la protéine chaperonne 14-3-3. Elles peuvent aussi conduire à une augmentation du nombre de dimères de Raf en créant un point de contact supplémentaire entre les monomères. Il semble que le dimère soit actif même si l'un des monomères possède un domaine kinase non fonctionnel et les monomères non fonctionnels semblent avoir un plus fort potentiel de dimérisation. Certaines mutations miment la phosphorylation de la protéine. La mutation V600E est située au milieu du segment activateur de la protéine B-Raf, entre deux résidus devant être phosphorylés pour son activation et agit comme une substitution phospho-mimétique. La conformation adoptée par ce mutant lui permet d'être activé de manière constitutive et ce, sans dimérisation *(Lavoie & Therrien, 2015)*. La protéine MEK est aussi mutée dans certains cancers mais à un taux bien inférieur que celui touchant les kinases en amont.

3.2.2. Rôle de la voie des MAPK dans le cancer

La voie des MAPK est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques. Une altération de celle-ci peut conduire à l'apparition d'un cancer. Parmi les facteurs de transcription cibles de la protéine ERK, un grand nombre contrôle la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire comme la cycline D. Une sur-activation de la voie des MAPK entraine donc une augmentation de la prolifération des cellules. De plus, celle-ci active de nombreux gènes codant pour des facteurs de croissance, conduisant à l'autosuffisance en signaux prolifératifs de la cellule *(McCubrey et al., 2007)*. La voie des MAPK contrôle aussi l'expression de facteurs anti-apoptotiques comme BCL-2 et BCL-XL tout en réprimant l'expression des facteurs pro-apoptotiques BIM et BAD, augmentant ainsi la survie cellulaire *(McCubrey et al., 2007)*. Les MAPK permettent l'expression de gènes mésenchymateux et répriment l'expression de gènes épithéliaux favorisant ainsi la transition épithéliaux-mésenchymateuse. Elle induit aussi l'expression des métalloprotéinases, permettant ainsi aux cellules cancéreuses d'envahir les tissus environnants *(Maurer et al., 2011)*. La cascade des

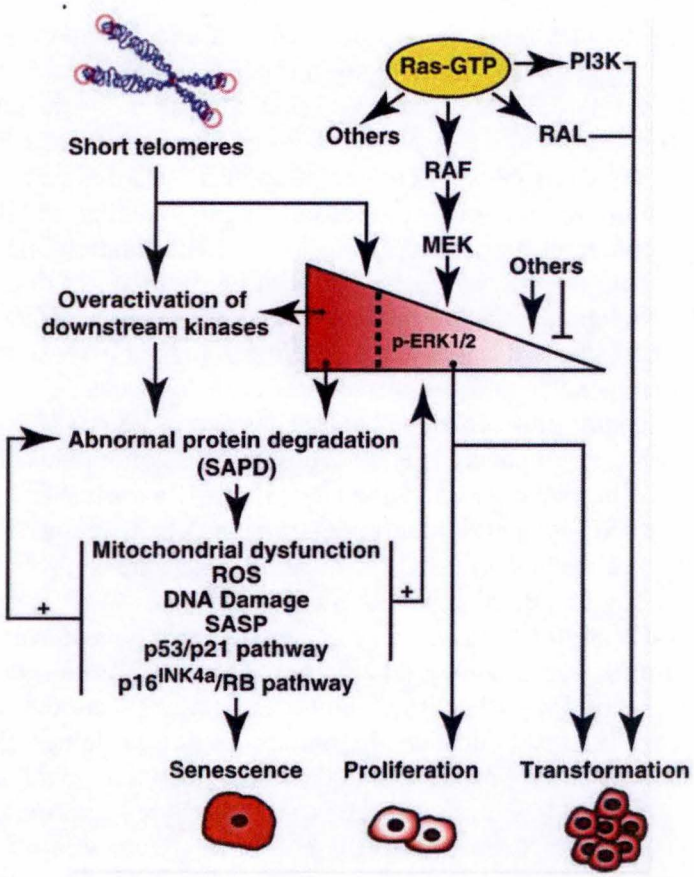


Figure I.11 : Implication de la voie des MAPK dans la sénescence et la tumorigenèse
Illustration de la voie des MAPK lors de la sénescence et de la tumorigenèse. Le niveau d'activation induit différentes réponses dans les cellules. Une forte activation de la voie conduit à l'induction de la sénescence par l'intermédiaire du SAPD. Lors d'une diminution de l'activité des protéines p42/p44, les cellules peuvent échapper à la sénescence et devenir des cellules transformées *(Deschênes-Simard et al., 2013)*.

MAPK est impliquée dans l'angiogenèse via la régulation de l'expression de HIF-1α et du VEGF *(McCubrey et al., 2007)*. Elle peut aussi permettre aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire en réprimant des gènes impliqués dans la présentation des antigènes. Cette répression empêche les cellules cancéreuses d'être reconnues et éliminées par les lymphocytes T cytotoxiques *(Schäfer & Sers, 2011)*.

3.2.3. La voie des MAPK et la sénescence

L'équipe de Manuel Serrano a montré, en 1997, que la surexpression de l'oncogène Ras, dans des fibroblastes primaires humains, conduit à un arrêt irréversible du cycle cellulaire : la sénescence induite par les oncogènes **[Figure I.11]**. Cette sénescence semble dépendre des voies p53 et $p16^{INK4A}$ et implique la réponse aux dommages à l'ADN *(Serrano et al., 1997)*. La sénescence induite par la surexpression de Ras a ensuite été confirmée dans des modèles murins et semble servir de barrière à la tumorigenèse *(Braig et al., 2005)*. Deschênes-Simard et al. ont montré, en 2013, que la signalisation aberrante de la voie des MAPK conduit à la dégradation, par le protéasome, des protéines requises pour la progression du cycle cellulaire, expliquant en partie l'entrée en sénescence des cellules *(Deschênes-Simard et al., 2013)*. La voie des MAPK a été identifiée comme un médiateur essentiel de la sénescence induite par l'oncogène Ras. L'atténuation de l'expression de la protéine ERK par des shRNA, dans des fibroblastes humains et murins, a permis de contourner la sénescence induite par l'oncogène Ras, visible par une diminution de l'activité β-galactosidase, une augmentation des marqueurs prolifératifs comme Ki67 et une reprise du cycle cellulaire *(Deschênes-Simard et al., 2013)*. Ce contournement de la sénescence a, de plus, entrainé la formation de colonies, indiquant une transformation des cellules exprimant l'oncogène Ras et combiné avec les shRNA contre la protéine ERK *(Deschênes-Simard et al., 2013)*. Ensemble, ces expériences montrent qu'une augmentation de la quantité de protéine ERK activée dans les cellules induit la sénescence des celles-ci et que la réduction de la quantité de p-ERK permet de contourner cette sénescence. Ce contournement semble être inversement proportionnel à la quantité de ERK activée *(Deschênes-Simard et al., 2013)*. Des expériences dans des fibroblastes murins ont montré que le contournement de la sénescence induite par l'oncogène $H\text{-}Ras^{V12}$ n'était possible qu'avec des shRNA visant la protéine ERK2 mais pas la protéine ERK1 *(Shin et al., 2013)*.

4. Pumilio 2

Le gène *pumilio* (*pum*) a été mis en évidence, à la fin des années 1980, lors de l'étude du développement embryonnaire de la drosophile *(Lehmann & Nusslein-Volhard, 1987 ; Barker et al., 1992)*. Ce gène fait partie d'une famille de régulateurs post-transcriptionnels très conservée au cours de l'évolution du règne animal et végétal, la famille des protéines PUF (Pumilio-Fem-3-binding factor). Chez les mammifères, à l'heure actuelle, seulement quatre éléments de cette famille ont été mis en évidence : Pumilio 1, Pumilio 2, Puf-A et NOP9 (nucleolar protein 9). Les protéines PUF se lient sur des séquences spécifiques, trouvées dans la région non transcrite 3'UTR (3' untranslated region) des ARN messagers (ARNm), et ce faisant, répriment leur traduction et induisent leur dégradation (*Wickens et al., 2002*). La protéine Pumilio 2 a des rôles connus dans le développement embryonnaire, le maintien des cellules souches et la fonction neuronale *(Galgano et al., 2008)*.

4.1. Structure de la protéine Pumilio 2

Pumilio 2 est une protéine de 115 kDa composée de trois domaines différents : un motif QA, riche en résidus glutamines et alanines, un motif S, riche en sérines et un domaine d'homologie de Pumilio, PUM-HD *(White et al., 2001)*. Les motifs QA et S, situés à l'extrémité N-terminale, ont été très peu étudiés et leur rôle au sein de la protéine reste encore à découvrir. Il semble cependant que ceux-ci ne soient pas nécessaires pour la liaison de la protéine à l'ARN *(Zamore*

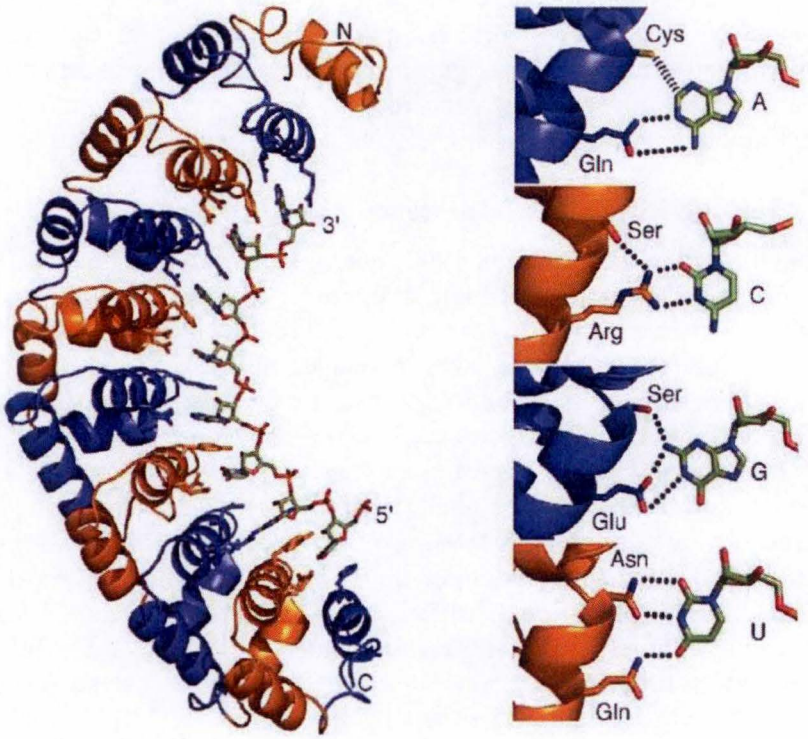


Figure I.12 : Structure cristalline de la protéine Pumilio 2
Illustration de la protéine Pumilio 2 liée à une séquence d'ARN et représentation des liaisons de chacun des nucléotides avec les hélices de la protéine. La protéine Pumilio 2 est constituée de 8 répétitions formant chacune une hélice α. Ces hélices sont alignées et forment une structure croisant. Chacune des répétition lie une base de l'ARN *(Filipovska & Rackham, 2011)*.

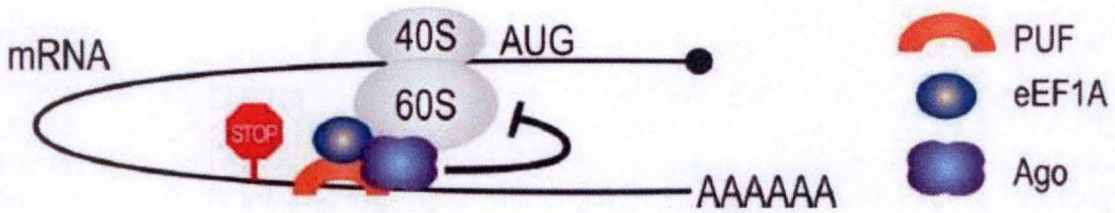


Figure I.13 : Mécanisme de répression de la traduction d'ARNm par la protéine Pumilio 2
Illustration de l'un des mécanismes de répression de la traduction des ARNm par la protéine Pumilio 2. La protéine se lie à la protéine Argonaute et au facteur d'élongation de la traduction, empêchant ainsi ce dernier d'exercer son activité *(Friend et al., 2012)*.

et al., 1999) et que la partie N-terminale de la protéine possède l'activité répressive majeure de celle-ci *(Weidmann & Goldstrohm, 2011)*. Le domaine QA pourrait être impliqué dans l'agrégation des protéines. Des domaines similaires, au sein d'autres protéines, sont en effet impliqués dans des maladies neurodégénératives provoquées par l'agrégation de protéines *(Zoghbi & Orr, 2000)*. Des agrégats incluant la protéine Pumilio 2 ont été mis en évidence dans des neurones murins *(Salazar et al., 2010 ; Vessey et al., 2006)*. Le domaine PUM-HD, en partie C-terminale, consiste en 8 répétitions imparfaites d'un motif de 36 acides aminés *(Wikens et al., 2002)* **[Figure I.12]**. Chaque répétition forme une triple hélice et l'alignement des celles-ci forme une structure en croissant avec une face concave et une face convexe *(Jenkins et al., 2009)*. La molécule d'ARN se lie sur la face interne, concave. Les huit hélices α de la protéine Pumilio 2 comprennent des résidus aromatiques et basiques faisant contact, en tout, avec huit bases de l'ARN. C'est l'acide aminé le plus conservé, qui se trouve au centre de chaque répétition, qui interagit avec un nucléotide particulier de l'ARN *(Wang et al., 2002)*. La face externe, convexe, de Pumilio 2 lie, quant-à-elle, ses partenaires protéiques comme les cofacteurs Nanos et BRAT (Brain Tumor) *(Wickens et al., 2002)*.

4.2. Mécanismes d'action de la protéine Pumilio 2

La protéine Pumilio 2 se lie sur une séquence consensus retrouvée dans la partie 3' UTR des ARN messagers qu'elle cible. Cette séquence, appelée élément de réponse de Pumilio (PRE), est composée de 8 acides aminés conservés 5'-UGUANAUA-3' (le N équivaut à un A, un U ou un C) liant chacun une des huit hélices α de Pumilio 2 *(Lu & Hall, 2011)*. Cette liaison va permettre de réprimer les transcrits en stimulant leur désintégration ou en inhibant leur traduction. La protéine Pumilio 2 est donc principalement localisée au niveau du cytoplasme des cellules, où se trouvent la majorité des ARNm matures mais elle a aussi été observée au sein de granules de stress dans des neurones murins. Ces granules semblent stocker des ARNm bloqués en début de traduction *(Vessey et al., 2006)*. La répression des transcrits peut s'effectuer via différents mécanismes. Le premier mécanisme est la désadénylation de l'ARNm. La maturation des ARNm comprend l'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5' et d'une queue polyA à l'extrémité 3'. Ces deux modifications permettent, entre autres, de stabiliser l'ARNm. Le raccourcissement de la queue polyA ou le décoiffage de l'ARNm permettent, quant-à-eux, sa dégradation, par des complexes protéiques spécifiques. Chez *D. melanogaster*, la répression par la protéine Pumilio, de l'ARNm du gène *hunchback*, est corrélée avec le raccourcissement de sa queue polyA *(Wreden et al., 1997)*. De plus, la protéine Pumilio 2 humaine semble être associée, au sein de complexes, avec des désadénylases comme les protéines CNOT7 et CNOT8. L'inhibition de la désadénylation via l'utilisation de mutants dominants négatifs de ces enzymes réduit la capacité de répression de la protéine Pumilio 2. Ceci suggère que Pumilio 2 recrute des enzymes responsables de la désadénylation des ARNm pour permettre leur dégradation *(Van Etten et al., 2012)*. D'autres études ont cependant démontré que la dégradation des ARNm peut aussi avoir lieu en absence de queue polyA, via un mécanisme indépendant de la désadénylation *(Chagnovich & Lehmann, 2001)*, certainement via le recrutement de protéines impliquées dans le retrait de la coiffe *(Quenault et al., 2011)*. La protéine Pumilio 2 peut aussi inhiber l'initiation de la traduction. C'est le cas, par exemple, dans les ovocytes de Xénope, où elle interagit directement avec la coiffe de l'ARNm, entrant ainsi en compétition avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4E, ce qui l'empêche alors de recruter le ribosome *(Cao et al., 2010)*. Des complexes comprenant la protéine Pumilio 2 humaine, la protéine Argonaute (AGO) (impliquée dans la répression de l'ARN) et le facteur d'élongation eEF1A ont été observés liés à des ARNm, avec une accumulation de ribosomes en aval du codon AUG. Les protéines Pumilio 2 et AGO semblent donc pouvoir inhiber l'élongation de la traduction en liant le facteur eEF1A, l'empêchant ainsi d'exercer son activité *(Friend et al., 2012)* **[Figure I.13]**. La protéine Pumilio 2 peut aussi coopérer avec les micros ARN (miR), de courtes séquences d'acides ribonucléiques impliquées dans la régulation de la traduction. Des motifs de liaison des protéines PUF ont été

trouvés enrichis, sur les ARNm, à proximité des sites de liaison prédictifs de miR et des sites de liaison de miR ont été mis en évidence dans la région 3' UTR d'ARNm cibles de Pumilio 2 dans des cellules humaines *(Galgano et al., 2008)*. La protéine Pumilio 1, qui partage 90% d'homologie avec la protéine Pumilio 2 semble être essentielle pour la répression de la protéine p27 via les miR221/222. Celle-ci entraine en effet un changement de conformation de l'ARNm de p27 qui expose son site de liaison aux miR *(Kedde et al., 2010)*. Le même mécanisme a pu être constaté lors de l'étude de la répression de l'oncogène E2F3 *(Miles et al., 2012)*. Certaines protéines PUF sont aussi impliquées dans l'activation de la traduction *(Kaye et al., 2009; Suh et al., 2009)*. Dans des ovocytes de Xénope, la protéine Pumilio 2 a été observée comme étant associée, sur des ARNm non matures, avec des protéines de polyadénylation. Suite à la maturation de l'ARNm, Pumilio2 se détachait de celui-ci, permettant sa traduction. Cette observation suggère un rôle activateur de la traduction de la protéine Pumilio 2 *(Padmanabhan & Richter, 2006)*.

4.3. Fonctions biologiques de la protéine Pumilio 2

La protéine Pumilio 2 peut réguler plus de 700 ARNm *(Galgano et al, 2008)*, suggérant que celle-ci puisse être impliquée dans la régulation d'un grand nombre de fonctions biologiques. Dans de nombreux modèles, la protéine Pumilio 2 a montré des rôles dans le développement embryonnaire, la maintenance des cellules souches et la neurogenèse. Chez *Drosophila melanogaster*, la protéine Pumilio 2 est requise pour l'établissement de l'axe antéro-postérieur dans les premiers stades de l'embryogenèse, en réprimant la traduction de l'ARNm du gène *hunchback* et permettant ainsi l'établissement de son gradient *(Murata & Wharton, 1995)*. Pour cela, la protéine Pumilio 2 semble être en collaboration étroite avec son cofacteur Nanos *(Barker et al., 1992)*. Durant le développement embryonnaire de la drosophile, Pumilio 2 semble aussi avoir un rôle clé dans la migration et le maintien de la lignée germinale *(Lin & Spradling, 1997)*. La protéine semble en effet retarder le cycle cellulaire de ces cellules souches en réprimant l'ARNm de la cycline B *(Parisi & Lin, 2000)*, elle semble aussi les empêcher de se différencier *(Forbes & Lehmann, 1998)*. Au contraire, dans une étude portant sur des cellules souches d'adipocytes humains, il a été montré que la protéine Pumilio 2 n'empêchait pas leur différenciation mais participait plutôt au contrôle positif de leur division et de leur prolifération *(Shigunov et al., 2012)*. Chez le poisson zèbre, la protéine Pumilio 2 a été observée comme impliquée dans le développement de la lignée germinale et du système nerveux *(Wang et al., 2012)*. La protéine Pumilio 2 a aussi, chez les souris, un rôle dans le maintien de la morphologie dendritique et de la fonction et de l'excitabilité synaptique via la régulation du facteur de traduction eIF4E *(Vessey et al., 2010)*. Le changement du taux de protéines Pumilio 2 dans des neurones de rat, entraine un changement d'influx de sodium et donc, du potentiel de membrane *(Muraro et al., 2008)*. Cette régulation de l'excitabilité de la membrane synaptique semble être effectuée en collaboration avec le miR-134 *(Fiore et al., 2014)*. Une augmentation du taux protéique de Pumilio 2 inhibe la traduction des ARNm codant pour les canaux sodiques, ce qui réduit l'excitabilité intrinsèque de la synapse *(Driscoll et al., 2013)*. De plus, la protéine Pumilio 2 semble réguler la traduction de l'acétylcholinestérase, responsable du clivage du neurotransmetteur acétylcholine au niveau des jonctions neuromusculaires des souris *(Marrero et al., 2011)*. Il a été montré, chez la drosophile, que la protéine Pumilio 2 était impliquée dans la mémoire à long terme. Durant l'apprentissage, l'expression de la protéine était sur-régulée et les mouches mutantes pour Pumilio 2 avaient des défauts de mémorisation sur le long terme *(Dubnau et al., 2003)*. Une étude récente, sur des tissus humains, a mis en évidence une diminution du taux protéique de Pumilio 2 dans le lobe frontal de patients épileptiques (Wu et al., 2015) suggérant une implication de la protéine dans la maladie. Les modèles murins déficients en Pumilio 2 sont viables mais les animaux sont hyperactifs et ont des troubles du comportement ainsi que des difficultés à s'adapter à un nouvel environnement. La protéine Pumilio 2 pourrait alors être impliquée dans des problèmes neuropsychiatriques *(Siemen et al.,*

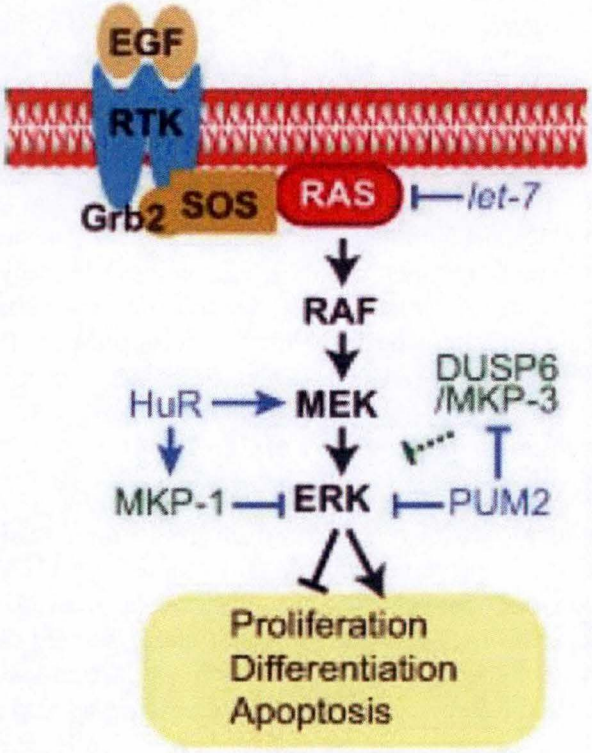


Figure I.14 : Voie des MAPK et possible régulation par la protéine Pumilio 2
Illustration de la voie canonicale des MAPK en présence de possibles régulateurs de ERK. Ces régulateurs interviennent à différents niveaux comme, au niveau de la phosphorylation pour DUSP6 ou MKP-1 ou au niveau de l'ARNm pour Pumilio 2 *(Whelan et al. 2012)*.

2011). Les souris mâles, mutantes pour Pumilio 2, ont aussi des testicules atrophiés bien que la fertilité ne semble pas être affectée *(Xu et al., 2007)*. D'autres études montrent cependant que la protéine Pumilio 2 est impliquée dans la fertilité et le contrôle de la spermatogenèse *(Van Etten et al., 2012)*.

4.4. La protéine Pumilio 2 et le cancer

La protéine Pumilio 2 a été très peu étudiée dans le contexte du cancer. D'après la base de données COSMIC, il semble pourtant que cette protéine soit mutée, dans un certain nombre de cancers, bien qu'en faible quantité (2% de tissus testés, mutés pour Pumilio 2, par type de cancer). Parmi les cancers présentant des mutations de la protéine, nous trouvons les cancers féminins (sein, col de l'utérus, endomètre, ovaire), les cancers gastro-intestinaux (œsophage, intestins, pancréas, estomac, foie), mais aussi les cancers du poumon, des reins, de la prostate, de la peau, des os, de la thyroïde, hématopoïétique et lymphoïdes. Les cancers du système nerveux semblent présenter un plus grand taux de mutations avec 10% des tissus testés comportant une mutation de la protéine Pumilio 2. Dans tous ces cancers, à l'exception de celui du pancréas, les mutations conduisent à une surexpression de la protéine *(COSMIC database)*. Une étude récente a montré que sur les 565 gènes répertoriés dans la base de données COSMIC comme étant des suppresseurs de tumeurs ou des oncogènes, 58% possèdent un ou plusieurs sites de liaison pour les protéines Pumilio, 37% ont été observés comme étant réellement liés aux protéines Pumilio et 8% étaient régulés par celles-ci *(Bohn et al., 2017)*. Le facteur de transcription E2F3, qui contrôle le cycle cellulaire, est parfois dérégulé durant la tumorigenèse et notamment dans le cancer de la vessie. Dans ce même cancer, certains de miR ciblant la protéine E2F3, qui se trouvent être en collaboration étroite avec les protéines Pumilio, semblent être sous-régulés. Certaines lignées cellulaires semblent de plus, empêcher la régulation de facteur de transcription E2F3 par la protéine Pumilio en rétrécissant la partie 3' UTR du transcrit *(Miles et al., 2012)*. Dans une étude récente, des chercheurs ont montré que les cellules leucémiques myéloïdes aigües (AML) exprimaient un plus haut niveau d'ARNm de Pumilio 2 que les cellules progénitrices hématopoïétiques. De plus, un knock-down de la protéine dans différentes lignées AML inhibait leur prolifération, suggérant que la protéine Pumilio 2 ait un rôle, dans la régulation de la croissance des cellules leucémiques *(Naudin et al., 2017)*.

4.5. La protéine Pumilio 2 et la voie des MAPK

Un petit nombre de recherches a pu mettre en évidence un lien entre la protéine Pumilio 2 et la voie des MAPK. Sachant que l'ARNm du gène ERK2 possède un site de liaison prédictif pour la protéine Pumilio 2 dans sa région 3' UTR, les chercheurs ont effectué un test triple hybride chez des levures. Ce test a permis de mettre en évidence une réelle interaction entre la protéine Pumilio 2 et l'ARNm de ERK2. Une construction contenant un gène rapporteur fluorescent couplé à la séquence 3' UTR de la protéine ERK2, et transfectée dans des cellules souches embryonnaires humaines, a ensuite pu prouver que la protéine Pumilio 2 était bien un régulateur direct de la traduction de la MAPK ERK2 *(Lee et al., 2007)* **[Figure I.14]**. La phosphatase DUSP6 (dual specificity phosphatase 6) est un inhibiteur fortement spécifique des protéines ERK1/2 *(Bermudez et al., 2011)*. Galgano et al. ont pu mettre en évidence le fait que la protéine Pumilio 2 interagissait avec l'ARNm de DUSP6 *(Galgano et al., 2008)* qui contient deux sites de liaison potentiel dans sa région 3' UTR. Récemment, l'équipe de Bermudez et al. a démontré, en utilisant la même technique que décrite précédemment, que la protéine Pumilio 2 était bien capable de réguler la traduction de la protéine DUSP6. Ceci nous indique que la protéine Pumilio 2 pourrait aussi réguler indirectement la voie des MAPK.

OBJECTIFS

Durant la tumorigenèse, les cellules doivent contourner un certain nombre de mécanismes de sauvegarde. Parmi ceux-ci, la sénescence est considérée comme l'une des principales barrières contre la formation de tumeurs. Le stress oncogénique est connu pour induire la sénescence de manière prématurée et ainsi empêcher la prolifération des cellules endommagées. Des oncogènes comme les protéines Ras et Raf sont responsables d'une activation anormale de la voie des MAPK, impliquée dans la prolifération, et peuvent créer un stress mitotique susceptible d'induire la sénescence.

La protéine Pumilio 2 est un régulateur post-transcriptionnel. Il a été démontré que celle-ci pouvait réguler directement l'expression des MAPK ERK1/2 en se liant sur leur ARNm ou indirectement en se liant sur l'ARNm de DUSP6. DUSP6 est une phosphatase connue pour réguler négativement la voie des MAPK, en déphosphorylant spécifiquement les protéines ERK.

Ce mémoire repose sur l'hypothèse que la protéine Pumilio 2 pourrait permettre le contournement de la sénescence durant la tumorigenèse, et ce, en régulant négativement la voie des MAPK. Une diminution de l'activité des MAPK, sous un certain seuil, pourrait en effet inhiber le stress mitotique et donc empêcher les cellules d'entrer en sénescence, malgré la présence de l'oncogène.

Pour investiguer ce rôle potentiel de la protéine Pumilio 2 dans le contournement de la sénescence induite par les oncogènes, nous avons utilisé trois lignées cellulaires cancéreuses différentes. Afin d'induire la sénescence, les cellules ont été transduites avec l'oncogène Ras ou la kinase MEK. Pour voir si notre protéine d'intérêt avait un effet sur cette sénescence, certaines de ces cellules étaient, de plus, transduites avec le gène codant pour la protéine Pumilio 2.

Le premier objectif était de mettre en évidence un effet de Pumilio 2 sur la sénescence. Pour cela, des tests de β-galactosidase et de prolifération ont été réalisés. L'étude des ARNm a aussi été utilisée pour mettre en évidence un arrêt de la prolifération et une modification de l'expression des gènes liés au SASP. Le deuxième objectif était de mettre en évidence le fait que le contournement de la sénescence était dû à une diminution de l'activation de la voie des MAPK. Pour cela, l'expression des protéines ERK a été analysée par la technique de western blot.

Ensemble, ces résultats nous ont permis de mettre en évidence un effet modéré de la protéine Pumilio 2, qui semble pouvoir permettre aux cellules de contourner, dans certaines conditions, la sénescence induite par les oncogènes.

MATERIEL ET METHODES

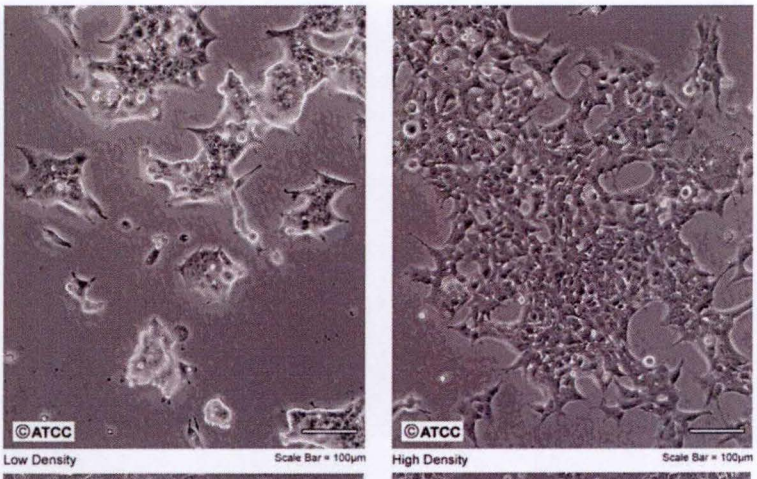


Figure II.1 : Cellules épithéliales Phoenix-ECO à faible (low) et à forte densité (high density)



Figure II.2 : Cellules épithéliales MDA-MB-468 à faible (low) et à forte densité (high density)

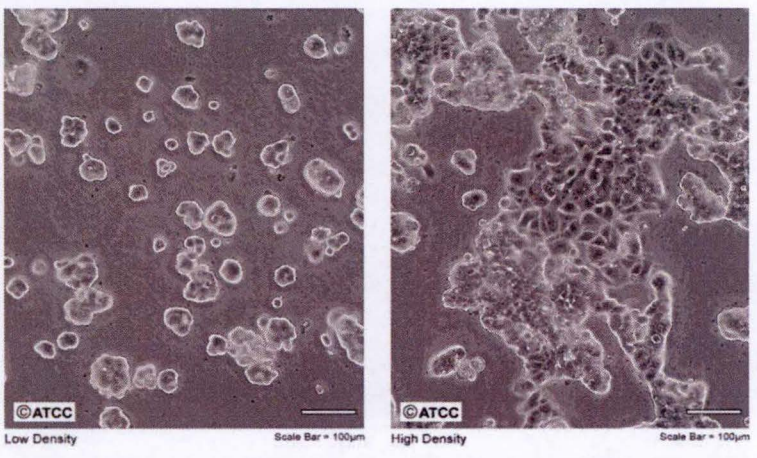


Figure II.3 : Cellules épithéliales MCF-7 à faible (low) et à forte densité (high density)

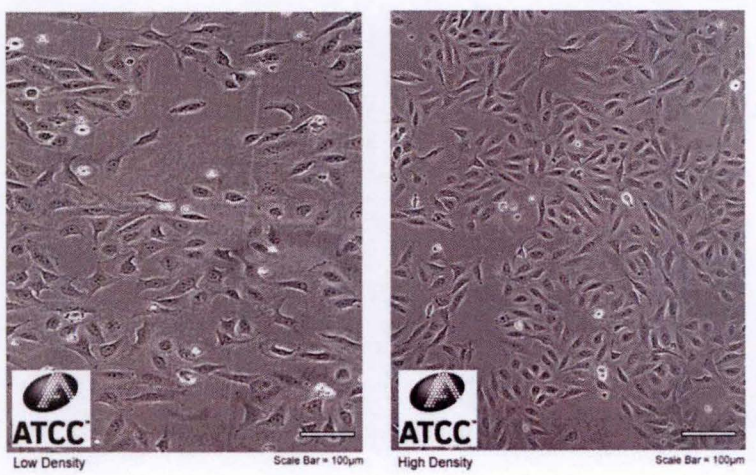


Figure II.4 : Cellules épithéliales U-2 OS à faible (low) et à forte densité (high density)

1. Culture cellulaire

1.1. Types cellulaires utilisés

Les lignées cellulaires utilisées lors de ce mémoire proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA).

1.1.1. Les cellules Phoenix-ECO

Les cellules Phoenix-ECO (ATCC® CRL-3214™) sont des cellules épithéliales embryonnaires humaines de rein, immortalisées grâce à l'adénovirus early region 1A (E1a). Elles sont principalement utilisées pour produire des particules rétrovirales car il a été intégré à leur génome, pour qu'elles les expriment de manière constitutive, les gènes de structure nécessaires à la production de virus (*gag*, *pol* et *env*) *(Pear et al., 1993)* **[Figure II.1]**.

1.1.2. Les cellules HEK293T

Les cellules HEK293T (ATCC® CRL-3216™) sont des cellules épithéliales humaines embryonnaires de rein. Cette lignée est utilisée pour la production de particules lentivirales du fait de la présence dans leur génome de l'exogène exprimant l'antigène grand T du SV40.

1.1.3. Les cellules MDA-MB-468

Les cellules MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™) sont issues de cellules épithéliales de glandes mammaires humaines. Cette lignée a été isolée à partir d'un épanchement pleural d'une femme noire de 51 ans atteinte d'un adénocarcinome métastatique *(Cailleau et al., 1978)* **[Figure II.2]**. Ces cellules présentent des mutations au niveau des gènes PTEN, RB1, SMAD4 et TP53.

1.1.4. Les cellules MCF-7

Les cellules MCF-7 (ATCC® HTB-22™) sont issues de cellules épithéliales de glandes mammaires humaines. Cette lignée cellulaire a été isolée d'un épanchement pleural d'une femme caucasienne de 69 ans atteinte d'un adénocarcinome métastatique *(Soule et al., 1973)* **[Figure II.3]**. Ces cellules expriment l'oncogène WNT7B *(Huguet et al., 1994)* ainsi que les récepteurs aux œstrogènes.

1.1.5. Les cellules U-2 OS

Les cellules U-2 OS (ATCC® HTB-96™) sont issues de cellules épithéliales osseuses humaines. Cette lignée cellulaire a été isolée à partir du sarcome modérément différencié du tibia d'une jeune fille caucasienne de 15 ans *(Ponten & Saksela, 1967)* **[Figure II.4]**. Ces cellules présentent une mutation au niveau du locus de p16.

Tableau II.1 : Réactifs et matériels nécessaires pour la culture cellulaire

Nom	Firme
Milieu de culture complet : DMEM + 4,5 $g.L^{-1}$ de glucose + L-glutamine + pyruvate + 10 % FBS + 1% pénicilline G / streptomycine	 Gibco, ThermoFisher scientific Gibco, ThermoFisher scientific Gibco, ThermoFisher scientific
PBS stérile : - 9 g de NaCl - 20 mL de Tampon PO_4^{3-} ajusté à pH6 ▪ 0,5 M KH_2PO_4 ▪ 0,5 M K_2HPO_4	 Merck Merck Merck
Trypsine-EDTA 0,05%	Gibco, ThermoFisher scientific
Cellules de comptage EVE	NanoEntek
Solution de bleu Trypan à 0,4%	Life Technology
Appareil Countess	Invitrogen
Boites de culture de 25cm^2 (T25) et de 75 cm^2 (T75)	Corning
Boite de Pétri de 60 mm de diamètre	Corning
Plaques de 12 puits et de 24 puits	Corning

Tableau II.2 : Densité d'ensemencement des cellules dans différentes boites de culture suivant les expériences réalisées

Expérience	Boîte de culture	Volume de milieu	Quantité de cellules ensemencées
Extraction de protéines	Boite de Pétri 60 mm	3 mL	1.10^6 cellules
Extraction d'ARN	Boite de Pétri 60 mm	3 mL	1.10^6 cellules
SA-βgal	Boite de Pétri 60 mm	3 mL	250 000 cellules
Test de prolifération	Plaques 12 puits	2 mL / puits	20 000 cellules / puits
Immunofluorescence	Plaque 24 puits	1 mL/ puits	75 000 cellules / puits

1.2. Repiquage et ensemencement des cellules

1.2.1. Réactifs et matériel [Tableau II.1]

Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant une concentration élevée de glucose (4,5 $g.L^{-1}$), de la L-glutamine et du pyruvate. Ce milieu est supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (FBS) et de 1% de pénicilline G et de streptomycine.

Pour décrocher les cellules des boites de culture, nous utilisons une solution de trypsine-EDTA (Ethylène Diamine Tétra-Acétique). La trypsine est une protéase hydrolysant les liaisons peptidiques, permettant ainsi de cliver les protéines membranaires d'adhérence. Dans le même temps, l'EDTA chélate le calcium nécessaire aux intégrines pour lier les protéines de la matrice extracellulaire.

Le bleu de Trypan est un colorant utilisé pour le comptage cellulaire. Celui-ci pénètre dans toutes les cellules mais est rejeté par les cellules vivantes. Seules les cellules mortes restent donc colorées en bleu.

1.2.2. Méthode de repiquage des cellules

Les cellules sont maintenues dans des boites de culture T75 contenant 12 mL de milieu et placées dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2. Les cellules sont réensemencées tous les 3 ou 4 jours (Phoenix, HEK293T, MDA-MB-468) ou une fois par semaine (MCF7, U-2 OS) à une dilution allant de 1/3 à 1/5ème suivant la confluence. Pour cela, le milieu est retiré et les cellules sont lavées avec 10 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile. 2 mL d'une solution contenant 0,05 % de trypsine-EDTA sont ensuite déposés sur le tapis cellulaire pendant 3 minutes, à 37°C, température idéale pour le fonctionnement de l'enzyme. Une fois les cellules en suspension, la trypsine est neutralisée en ajoutant au minimum deux fois son volume en milieu. L'excès de protéines et l'inhibiteur de trypsine contenus dans le FBS permettent de saturer la trypsine et d'inhiber son action sur les protéines membranaires. Les cellules sont ensuite réensemencées au ratio nécessaire dans de nouvelles boites T75.

1.2.3. Méthode de comptage et d'ensemencement des cellules

Afin de réduire les variations entre expériences et de les rendre comparables entre elles, le même nombre de cellules doit être ensemencé pour une même expérience **[Tableau II.2]**. Pour cela, 10 µL de suspension cellulaire sont collectés dans un tube Eppendorf et ajoutés à 10 µL de bleu de Trypan avant d'être déposés dans une cellule de comptage. Les cellules sont ensuite comptées automatiquement grâce à l'appareil Countess et le nombre de cellules désiré peut être ensemencé. Les boites sont ensuite gardées dans l'incubateur à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2 jusqu'au début de l'expérience.

2. Transfection

La transfection est le processus par lequel du matériel génétique exogène est introduit au sein d'une cellule eucaryote et ceci sans utiliser de vecteur viral. La transfection peut être transitoire, c'est-à-dire que l'ADN n'est pas introduit dans le génome de la cellule et qu'il est perdu au cours des mitoses successives. Si l'on veut que l'ADN introduit reste au sein du

Tableau II.3 : Matériel nécessaire à la transfection des cellules Phoenix-ECO

Nom	Préparation	Firme
$CaCl_2$	2,5 M	Sigma
HBS 2x	50% de Hepes 50 mM 30% de NaCl 280 mM 1.5% de Na_2HPO_4 1,5 mM H_2O distillée pH ajusté entre 7,00 et 7,05 Stérilisé avec filtre 0,22 µm	Sigma Merck Merck Système Ultrapure water, synergy Filtropur S 0,2, Sarstedt

Tableau II.4 : Plasmides utilisés pour la transfection des cellules Phoenix-ECO et HEK293T

Plasmide	Origine	Référence
PLPC- 3x flag -puro	Scott Lowe laboratory	
PLPC- 3x flag - Pum2	Addgene and subclone in pLPC with HindIII-EcoRI	40292
pWZL	Scott Lowe Laboratory	
pWZL-MEK DD	Scott Lowe Laboratory	
pNLC ΔMEK1 (DN3, S218E, S222D):ER	Scott Lowe Laboratory	
pWZL HRas:ER	Addgene	18749
pWZL-HRas (non inductible)	Scott Lowe Laboratory	
pBabe	Weinberg Laboratory	
pBabe-Pum2	Addgene and subclone in pBABE with XHOI-EcoRI	
Helper	Scott Lowe Laboratory	
pCMVR8.2	Addgene	12263
pCMV-VSV-G	Addgene	8454
pLenti-PGK-Hygro	Addgene	19066
pLenti-PGK-Hygro -KRas4B(G12V)	Addgene	35633

Tableau II.5 : Matériel nécessaire à la transduction des cellules réceptrices

Nom	Firme
Milieu de culture complet	Voir tableau II.1.
Polybrène (bromure d'hexadiméthrine)	Sigma Aldrich
Rétrovirus ou Lentivirus	Produits au laboratoire
Filtre 0,22 µm	Filtropur S 0,2, Sarstedt

génome au fil des divisions, il faut réaliser une transfection stable. Le gène transfecté se trouve dans un plasmide contenant un gène de résistance à un antibiotique, ce qui permet la sélection ultérieure des cellules.

2.1. Matériel nécessaire à la transfection au chlorure de calcium et plasmides [voir Tableaux II.3 et II.4]

2.2. Principe de transfection au chlorure de calcium

La transfection est réalisée grâce à l'ouverture transitoire de pores dans la membrane plasmique des cellules compétentes. Pour cela, nous utilisons du chlorure de calcium à une concentration de 2,5 M (Bacchetti & Graham, 1977). Celui-ci, combiné à une solution saline HBS (Hepes Buffered Saline), tamponnée à pH 7, et contenant des ions phosphates, forme un fin précipité liant l'ADN à transfecter. La solution contenant le précipité est alors déposée sur les cellules à transfecter, ici les cellules Phoenix-ECO ou les cellules HEK293T. Le Ca^{2+} neutralise la charge négative de l'ADN, lui permettant d'entrer plus facilement dans la cellule.

2.3. Méthode de transfection des cellules Phoenix-ECO

Les cellules Phoenix-ECO sont utilisées pour la production de particules rétrovirales. Celles-ci sont ensemencées dans des boites T75, la veille de la transfection, à un ratio permettant d'obtenir une densité d'environ 50 à 60% le jour suivant. Les réactifs de transfection sont préparés dans deux tubes Eppendorf. Le premier tube contient 20 µg du plasmide contenant le gène d'intérêt, 10 µg du vecteur accessoire Helper permettant de fournir les enzymes nécessaires à la réplication du génome du vecteur viral, 63 µL de $CaCl_2$ 2,5 M ajoutés à 430 µL d'eau stérile. Le tout est alors ajouté goutte à goutte dans un deuxième tube Eppendorf contenant 500 µL de HBS 2x. Ce second tube est immédiatement vortexé pendant 10 secondes. Les cellules Phoenix sont transfectées en ajoutant le mélange goutte à goutte, de manière homogène, dans la boite de culture. 24 heures après la transfection, le milieu est changé et remplacé par du milieu complet frais.

2.4. Méthode de transfection des cellules HEK293T

Les cellules HEK293T sont utilisées pour la production de particules lentivirales. Les cellules sont ensemencées dans des boites T75, la veille de la transfection, à un ratio permettant d'obtenir une densité d'environ 50 à 60% le jour suivant. Les réactifs de transfection sont préparés dans deux tubes Eppendorf. Le premier tube contient 3 µg du plasmide contenant le gène d'intérêt, 2 µg du vecteur accessoire pCMVR8.2 (codant pour les enzymes de réplication), 1 µg du vecteur pCMV-VSV-G (codant pour les protéines de l'enveloppe virale) et 60 µL de $CaCl_2$ 2,5 M ajoutés à 430 µL d'eau stérile. Le tout est alors ajouté goutte à goutte dans un deuxième tube Eppendorf contenant 500 µL de HBS 2x. Ce second tube est immédiatement vortexé pendant 10 secondes. Les cellules HEK293T sont transfectées en ajoutant le mélange goutte à goutte, de manière homogène, dans la boite de culture. 24 heures après la transfection, le milieu est changé et remplacé par du milieu complet frais.

3. Transduction rétrovirale et lentivirale

La transduction est le processus qui consiste à transférer du matériel génétique dans une cellule de vertébré par l'intermédiaire d'un vecteur viral.

3.1. Matériel nécessaire à la transduction rétrovirale et lentivirale [Tableau II.5]

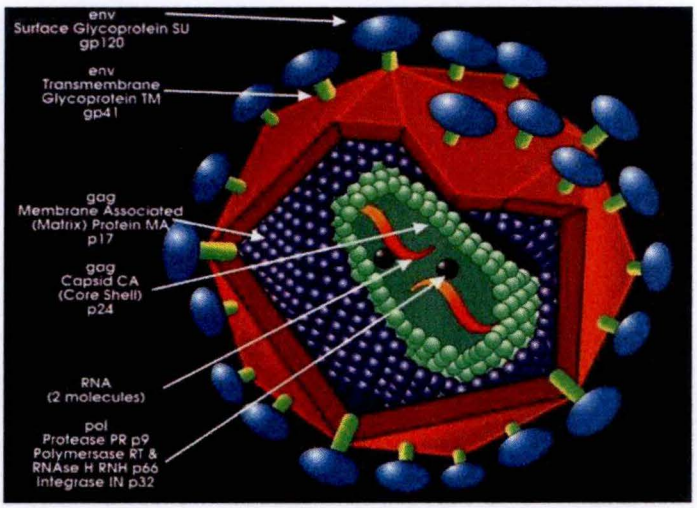


Figure II.5 : Représentation d'un rétrovirus
Le génome du rétrovirus contient un gène *pol*, codant pour une polymérase inverse, permettant de rétro-transcrire son ARN en ADNc, lorsque le rétrovirus est entré dans la cellule hôte. Le matériel génétique de ce rétrovirus est protégé par une capside (revêtement de protéines) encodée par le gène *gag*. Le gène *env*, quant à lui, encode la protéine de l'enveloppe qui protège le virus face aux composés chimiques et aux enzymes. Cette enveloppe est une membrane à double couche lipidique empruntée à la cellule hôte, dans laquelle s'insèrent des glycoprotéines encodées par le gène *gag*.
(Image issue du site : http://www.evolutionarymodel.com/apps/photos/photo?photoid=56959392

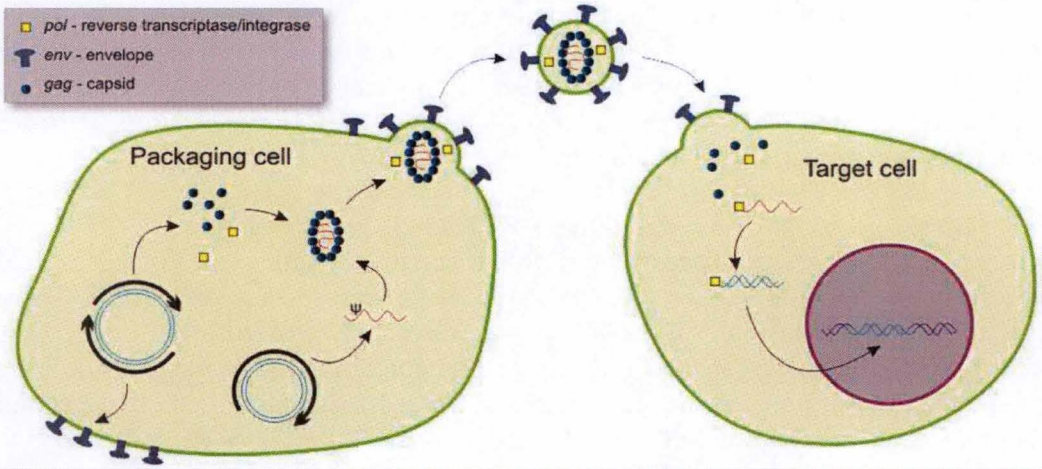


Figure II.6 : Empaquetage d'un rétrovirus et infection d'une cellule hôte
La cellule d'empaquetage permet de produire les rétrovirus contenant le matériel génétique d'intérêt mais incapables de se multiplier, afin d'éviter toute infection non contrôlée. Une fois créés, ces rétrovirus sont déposés sur les cellules cibles dans lesquelles ils peuvent rétro-transcrire et intégrer leur matériel génétique, intégrant ainsi notre gène d'intérêt, de manière stable, dans le génome de la cellule cible. (Schéma de Peter Znamenskiy)

Tableau II.6 : Antibiotiques utilisés pour la sélection après transduction

Antibiotique	Plasmide contenant le gène de résistance	Firme	Concentration
Hygromycine B	PWZL, p-Lenti	Roche	80 $\mu g.mL^{-1}$
Puromycine	pLPC, pBabe	Gibco	1,43 $\mu g.mL^{-1}$
Généticine (G418)	pNLC	Gibco	714 $\mu g.mL^{-1}$

3.2. Les rétrovirus

Les rétrovirus **[Figure II.5]** sont des virus enveloppés dont le génome est constitué d'ARN monocaténaire. Ces virus ont pour particularité de posséder une enzyme dénommée transcriptase inverse permettant de rétro-transcrire leur génome d'ARN en molécule d'ADN complémentaire pouvant être intégré à l'ADN de la cellule hôte *(Felder et al., 1994)*. Le virus utilise ensuite la machinerie cellulaire pour se multiplier et aller infecter les cellules voisines.

3.3. Principe de la transduction rétrovirale

Les rétrovirus sont produits à l'aide de cellules dites d'empaquetage. Pour cela, nous utilisons les cellules Phoenix-ECO que nous transfectons avec les plasmides d'intérêt et le vecteur auxiliaire (helper) qui fournit les enzymes nécessaires à la réplication du génome viral (voir section 2.3). Comme nous l'avons vu précédemment (section 1.1.1), les cellules Phoenix-ECO contiennent le matériel génétique nécessaire à l'empaquetage du virus (gènes *gag*, *pol* et *env*) mais ne contiennent pas le matériel lui permettant de se multiplier. Le gène *gag* code pour les protéines de constitution de la capside, le gène *pol* code pour les enzymes protéase, transcriptase inverse et intégrase et le gène *env* code pour la glycoprotéine de l'enveloppe du virus. Une fois les virions produits, ceux-ci sont déposés sur les cellules réceptrices qu'ils vont infecter et dans le génome desquelles ils vont introduire les gènes d'intérêt **[Figure II.6]**.

3.4. Méthode de la transduction rétrovirale

Le milieu conditionné des cellules Phoenix-ECO, contenant les particules rétrovirales, est collecté dans un tube 48h après la transfection et filtré avec un filtre de 0,22 µm afin d'éviter une contamination avec les cellules productrices. On y ajoute une quantité identique de milieu frais afin de diluer les virus, ainsi que du polybrène à 4 $\mu g.mL^{-1}$, un polymère cationique, pour augmenter l'efficacité de la transduction en neutralisant la répulsion de charges. Les cellules cibles (U-2 OS, MDA-MB-468, MCF7) ont été ensemencées le jour précédent et la première transduction est réalisée en remplaçant leur milieu par le milieu conditionné contenant les particules rétrovirales diluées et le polybrène. Du milieu frais est remis sur les cellules Phoenix-ECO afin de pouvoir réaliser une seconde infection, 24 heures après, en suivant le même protocole. Au minimum six heures après la seconde infection, le milieu contenant les particules virales est remplacé par du milieu frais contenant un antibiotique de sélection **[Tableau II.6]**. Un Killing Control (KC), consistant en une boite de cellules de la même lignée, non transfectées et traitées avec l'antibiotique, est utilisé pour contrôler la fin de la sélection.

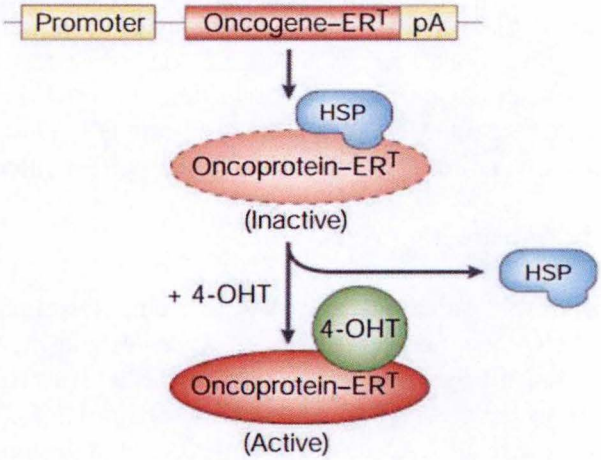


Figure II.7 : Représentation d'une protéine de fusion comme Ras:ER et MEK:ER (Image issus de *Jonkers & Berns, 2002*)

Tableau II.7 : Matériel nécessaire à l'induction de la sénescence

Nom	Firme
4-OHT (4-Hydroxytamoxifen) 0,05 µM	Sigma Aldrich

3.5. Les lentivirus

Les lentivirus sont des virus de la famille des *retrovidae* constitués d'ARN simple brin. Le virus le plus connu de cette famille est le virus HIV-1. Les lentivirus ont la particularité de pouvoir infecter les cellules qui ne se divisent pas à l'inverse, par exemple, de rétrovirus qui ont besoin de la disruption de la membrane nucléaire pour pouvoir intégrer leur génome à celui de la cellule hôte.

3.6. Principe de la transduction lentivirale

Les lentivirus sont produits à l'aide de cellules dites d'empaquetage, ici les HEK293T. Elles sont transfectées avec les plasmides d'intérêt et les vecteurs accessoires (pCMVR8.2 et pCMV-VSV-G) qui fournissent les enzymes nécessaires à la réplication du génome viral (voir section 2.4). Comme nous l'avons vu précédemment (section 1.1.2), les cellules HEK293T contiennent l'exogène codant pour le grand antigène grand T du SV40 mais ne contiennent pas le matériel lui permettant de faire un cycle viral complet. Les autres gènes sont donc apportés par les vecteurs accessoires. Une fois les particules virales produites, elles sont déposées sur les cellules destinatrices.

3.7. Méthode de la transduction lentivirale

Le milieu conditionné des cellules HEK293T, contenant les particules rétrovirales, est collecté dans un Falcon de 50ml 48h après la transfection et passé sur un filtre de 0,22 µm afin d'éviter les contaminations avec les cellules productrices. On y ajoute une quantité identique de milieu frais afin de diluer les virus et du polybrène à 4 $\mu g.mL^{-1}$, un polymère cationique, pour augmenter l'efficacité de la transduction en neutralisant la répulsion de charges. Les cellules cibles (MCF-7) ont été ensemencées le jour précédent et la première transduction est réalisée en remplaçant leur milieu par le milieu conditionné contenant les particules lentivirales diluées et le polybrène. Du milieu frais est remis sur les cellules HEK293T afin de pouvoir réaliser une seconde infection, 24 heures après, en suivant le même protocole. Au minimum six heures après la seconde infection, le milieu contenant les particules virales est remplacé par du milieu frais contenant un antibiotique de sélection **[Tableau II.6]**. Un KC est utilisé pour contrôler la fin de la sélection.

4. Induction de la sénescence

4.1. Les protéines de fusion MEK:ER et Ras:ER

MEK:ER et Ras:ER sont des protéines de fusion entre les oncogènes constitutivement actifs MEK-DD et H-RasV12 et une forme mutante du domaine de liaison du récepteur aux œstrogènes (ER pour œstrogen receptor) *(Narita, 2010)*. Cette protéine de fusion est inactive car repliée sur elle-même grâce à une protéine HSP (heat shock protein). Lors de la liaison de 4-OHT (4-hydroxytamoxifène), un dérivé d'œstrogène, sur le récepteur aux œstrogènes, la protéine HSP est relâchée et la protéine de fusion peut se déplier, activant ainsi l'oncogène **[Figure II.7]**.

4.2. Matériel et réactifs [Tableau II.7]

Tableau II.8 : Matériel et réactifs nécessaires au test de prolifération

Nom	Firme
PFA (paraformaldéhyde) 4%	Produit au laboratoire
PBS non stérile	Voir tableau II.1
Violet de Gentiane	Sigma

4.3. Méthode d'induction de la sénescence avec les protéines MEK:ER et Ras:ER

250 000 cellules transduites avec le vecteur pwzl-ΔMEK1:ER ou pwzl-HRas:ER et avec le vecteur vide plpc ou le vecteur plpc-Pum2 sont ensemencées dans des boites de culture de 60 mm. Le jour suivant, la moitié des cellules sont traitées avec du 4-OHT pendant 4 jours consécutifs, à une concentration finale de 400 ng.mL^{-1}, l'autre moitié est laissée non traitée pour servir des cellules contrôles, non sénescentes. Le cinquième jour, les cellules sont de nouveau réensemencées à 250 000 cellules par boite de culture et de nouveau traitées (ou non pour les contrôles) pendant 4 jours avant que les différents tests ne soient réalisés.

4.4. Expression constitutive de KRas4B(G12V)

Le vecteur pLenti-PGK-Hygro-KRas4B(G12V) permet une expression constitutive de la protéine mutante KRas4B(G12V). C'est à dire que dès que les cellules sont transduites avec l'exogène, l'expression, après la sélection avec l'hygromycine, devient permanente dans les cellules.

5. Test de prolifération

Le test de prolifération permet d'étudier la survie et la prolifération cellulaire suite, par exemple, à une irradiation, à un traitement, ou ici, à la surexpression d'un gène. Le principe a été développé en 1955 par T.T Puck et Philip I. Marcus et consiste à ensemencer un même nombre de cellules, quelle que soit la condition, dans plusieurs plaques, puis à fixer ces cellules tous les 2 ou 3 jours afin de voir si certaines conditions sont plus ou moins propices à la prolifération cellulaire. Les cellules fixées sont ensuite colorées au violet de gentiane pour mettre en évidence le nombre de clones ayant proliféré. Le violet de gentiane fonctionne comme agent intercalant, permettant la coloration des noyaux des cellules adhérentes.

5.1. Matériel et réactifs [Tableau II.8]

5.2. Méthode du test de prolifération

Les cellules sont ensemencées dans quatre plaques 12 puits, à raison de 20 000 cellules par puits et 3 puits par conditions. Elles sont ensuite fixées au jour J0 (lendemain de l'ensemencement), puis tous les 2 ou 3 jours, suivant la vitesse de prolifération. Pour cela, le milieu de culture est aspiré et les cellules sont rincées trois fois au PBS puis sont traitées avec 3mL de PFA 4% (paraformaldéhyde) pendant 10 minutes. Après la fixation, l'excès de PFA 4% est éliminé par trois rinçages successifs au PBS puis sont conservées à 4°C jusqu'à la coloration au cristal violet. Pour la coloration, 3 mL d'une solution de violet de gentiane sont déposés sur les cellules laissées sous agitation pendant 30 minutes. Celles-ci sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS avant d'être laissées plusieurs jours à l'air libre afin d'assécher entièrement les puits.

6. Activité β-galactosidase associée à la sénescence

6.1. Principe

La *β*-galactosidase est une enzyme lysosomale qui catalyse l'hydrolyse des *β*-galactosides, comme le lactose, en monosaccharides, à un pH optimal de 4. Lorsque les cellules deviennent sénescentes, la biogenèse lysosomale semble augmenter et le gène codant pour la *β*-galactosidase est sur-exprimé *(Dimri et al., 1995)*, permettant ainsi la détection de l'activité de

Tableau II.9 : Matériel et réactifs nécessaires au test de β-galactosidase

Nom	Firme
Solution de Fixation : Formaldéhyde (2%) Glutaraldéhyde (0,2%) Dans du PBS non stérile	 Sigma Sigma voir tableau II.1
PBS non stérile	voir tableau II.1
Solution de coloration : Tampon Phosphate, pH 6 (20%) Ferrocyanure de potassium 0,1 M (5%) Ferricyanure de potassium 0,1 M (5%) NaCl 2,5 M (12%) $MgCl_2$ 1 M (2%) H_2O distillée (51%) Solution X-gal (5%) : 1 20 mg.mL^{1} de poudre X-gal 2 dans du N,N,diméthylformamide	 voir tableau II.1 Merck Merck Merck Sigma Système Ultrapure water, synergy ThermoFischer Merck
Méthanol	Merck
H_2O distillée	Système Ultrapure water, synergy

Tableau II.10 : Temps de coloration pour le test de β-galactosidase suivant le type cellulaire

Type cellulaire	Temps de coloration
MDA-MB-468	48 h
U-2 OS	24-48 h
MCF-7	18 h

Tableau II.11 : Matériel et réactifs nécessaires à l'extraction et la purification d'ARN

Nom	Firme
SDS 1%	Carl Roth
Tampon RLT	Qiagene
Kit de Purification RNeasy Mini Kit	Qiagene
Qiacube	Biosystem
Spectrophotomètre Nanodrop ND 10 000	Isogen life science

l'hydrolase à un pH sub-obtimal de 6. Le principe de cette manipulation est donc de fournir un substrat chromogène, pouvant être facilement détecté lors de son clivage, à des cellules dont le pH a, préalablement, était abaissé à 6. Pour cela, nous utilisons un analogue du lactose, à savoir, le X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside), qui, lorsqu'il est clivé forme un précipité bleu dans les cellules. Ce test est considéré comme le biomarqueur de la sénescence par excellence.

6.2. Matériel et réactifs [Tableau II.9]

6.3. Méthode

250 000 cellules sont ensemencées dans des boites de Pétri de 60 mm de diamètre. Le lendemain, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS puis fixées avec 2 ml d'une solution de fixation contenant de la PFA et de la glutaraldéhyde **[Tableau II.9]** pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite rincées une nouvelle fois avec du PBS puis deux fois avec 2 mL de tampon phosphate à pH 6 afin d'abaisser le pH intracellulaire. Celles-ci sont ensuite colorées avec 3 mL de la solution de coloration contenant le X-gal **[Tableau II.9]**, pendant 16 à 48 heures (suivant le type cellulaire **[Tableau II.10]**) à 37°C sans CO_2, à l'abri de la lumière. Une fois les cellules colorées, celles-ci sont rincées deux fois avec du PBS et deux fois avec du méthanol avant d'être conservées dans de l'eau milliQ, à 4°C, à l'abri de la lumière jusqu'à leur comptage. La proportion de cellules SA-βGal positives est déterminée par le ratio entre le nombre de cellules colorées en bleu et le nombre total de cellules de la boite. Pour cela, environ 400 cellules sont comptées par boite *(Debacq-Chainiaux et al., 2009)*.

7. Analyse par RT-PCR quantitative

7.1. Extraction d'ARN total et purification

7.1.1. Réactifs et matériel [Tableau II.11]

7.1.2. Méthode

Cette étape a lieu en conditions RNAse-free par nettoyage de la zone de travail et de tout le matériel avec du SDS (dodécylsulfate de sodium) 1%. En effet, l'ARN est une molécule très fragile pouvant être facilement dégradée par les enzymes ribonucléases (dites RNAses) retrouvées sur la peau et donc sur tous les objets touchés à mains nues. Le milieu de culture est entièrement décanté et 350 µl de tampon de lyse RLT (RNeasy Lysis Buffer) sont déposés sur les cellules afin de les lyser. Les boites de culture sont alors raclées et le lysat cellulaire est récupéré dans des microtubes de 2 mL après de nombreux «up and down» afin que ce lysat soit le moins visqueux possible. Ces échantillons et tout le matériel nécessaire à la purification de l'ARN sont alors placés dans le Qiacube en suivant les instructions du fournisseur. La machine Quiacube permet l'automatisation de la purification de l'ARN en transférant le lysat sur des colonnes d'élution et en effectuant plusieurs étapes de centrifugation, rinçage et élution qui permettent au final de récupérer l'ARNm purifié dans 30 µl d'eau RNase-free. La concentration et la pureté des échantillons sont alors évaluées en utilisant le spectrophotomètre Nanodrop. Les échantillons sont conservés à -80°C.

7.2. Rétro-transcription de l'ARNm en ADNc

Tableau II.12 : Matériel et réactifs nécessaires à la rétro-transcription de l'ARNm en ADNc

Nom	Firme
Mix de réaction (8 µl par échantillon) : A partir du kit - Reverse Transcription kit Promega GoScript #A2791 : 1 Enzyme Mix (2 µl) 2 Buffer Mix oligo dT (4 µl) 3 Nuclease-free water (2 µl)	Promega
Blocs chauffants	
Thermocycleur	

Tableau II.13 : Matériel et réactifs nécessaires à la PCR quantitative

Nom	Firme
H_2O distillée	Système Ultrapure water, synergy
Plaque 96 puits	Corning
Power SYBR green PCR Master Mix	BioRad
Film plastique	
Centrifugeuse Centra CL3R	Thermo IEC
ViiA 7 real-time PCR system	Applied Biosystems
Amorces	Voir tableau 2.14

Tableau II.14 : Amorces utilisées pour la PCR quantitative

Gène	Amorce Forward	Amorce Reverse	Firme	Référence
GAPDH	ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC	GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA	Integrated DNA technologies	F: 62835412 R: 62835413
Ki-67	AGA AGA CAG TAC CGC AGA TGA	CGC CTC ACT AAT TTA ACG CTG G	Integrated DNA technologies	F: 73818930 R: 73818931
P16	CGAAGTCAGTTCC TTGTGGAG	CATGGGTTCTGAC GGACAT	Roche	
p21	CTG GAG ACT CTC AGG GTC GAA	CCA GGA CTG CAG GCT TCC T	Integrated DNA technologies	F: 66200127 R: 66200128
IL-8	TCT GTG TGA AGG TGC AGT TTT	GGG GTG GAA AGG TTT GGA GTA	Integrated DNA technologies	F: 72948431 R: 72948432

7.2.1. Réactifs et matériel [Tableau II.12]

7.2.2. Méthode

L'ARNm est rétro-transcrit en ADNc afin de pouvoir être analysé par PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative. Pour cela, 2 µg d'ARNm purifiés sont ajoutés à un volume final de 12 µl d'eau RNase-free et chauffés pendant 5 minutes à 70°C. Sont alors ajoutés 8 µl du mix de réaction **[Tableau II.12]** et le tout est incubé 5 minutes à 25°C pour permettre l'hybridation des amorces puis 60 minutes à 42°C pour permettre l'élongation et enfin 15 minutes à 70°C pour inactiver les enzymes. Les échantillons d'ADNc sont ensuite conservés à -80°C.

7.3. PCR quantitative

7.3.1. Principe

La technique de RT-qPCR (Reverse Transcription- quantitative PCR) permet de mesurer la quantité relative d'ARNm d'un gène donné par rapport à un gène endogène contrôle (HKG pour House Keeping Gene) dont le niveau d'expression ne varie pas dans les différentes conditions expérimentales. Cette méthode est dite «en temps réel» car l'augmentation de la quantité d'ADNc est suivie tout au long de la réaction. Le principe est d'amplifier l'ADNc du gène d'intérêt en utilisant des amorces (petites séquences nucléotidiques) complémentaires d'une séquence de cet ADNc. Un agent intercalant fluorescent, ici le SYBR Green, s'ajoute aux amplicons à chaque cycle de réplication et la fluorescence est détectée par l'appareil. La réaction d'amplification permet de former une quantité exponentielle de produits PCR, donnant lieu à une courbe d'amplification pour chaque gène. Un seuil de fluorescence, appelé Ct (Cycle Threshold), ici fixé à 0,2, coupe ces courbes d'amplification donnant le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence sorte du bruit de fond et soit détectable, pour chaque gène étudié. Plus la quantité d'ADNc d'un gène était élevée dans l'échantillon, plus le Ct sera faible pour ce gène car peu de cycles d'amplification seront nécessaires pour sortir du bruit de fond, et inversement. Il est ainsi possible de comparer l'expression d'un même gène dans plusieurs conditions en normalisant par le HKG, ici la GAPDH (codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase) (calcul du δCt) puis en soustrayant le δCt de la condition d'intérêt par celui de la condition contrôle (calcul du δδCt). Le niveau d'induction du gène est alors calculé en appliquant la formule $2^{-\delta\delta Ct}$ *(Schefe et al., 2006).*

7.3.2. Réactif et matériel [Tableau II.13 et II.14]

7.3.3. Méthode

La réaction d'amplification est effectuée dans des plaques 96 puits contenant par puits : 2 µl d'eau distillée, 2 µl d'amorce «forward» et 2 µl d'amorce «reverse» diluées à une concentration finale optimale de 300 nM, 10 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix et 4 µl d'ADNc dilué 100 fois dans de l'eau distillée. Chaque réaction est effectuée en duplicat. Une fois la plaque remplie, celle-ci est scellée et centrifugée à 1200 rpm durant 1 minute afin que tous les produits de réaction se retrouvent bien au fond des puits. La plaque est ensuite placée dans l'appareil ViiA7 et l'amplification est automatisée. Le processus débute par une étape de dénaturation à une température de 95°C pendant 10 minutes et est suivie de 40 cycles d'amplification : 15 secondes à 95°C (dénaturation), 1 minute à 60°C (hybridation des amorces et élongation). Les données sont ensuite traitées via la méthode des δδCt décrite ci-dessus.

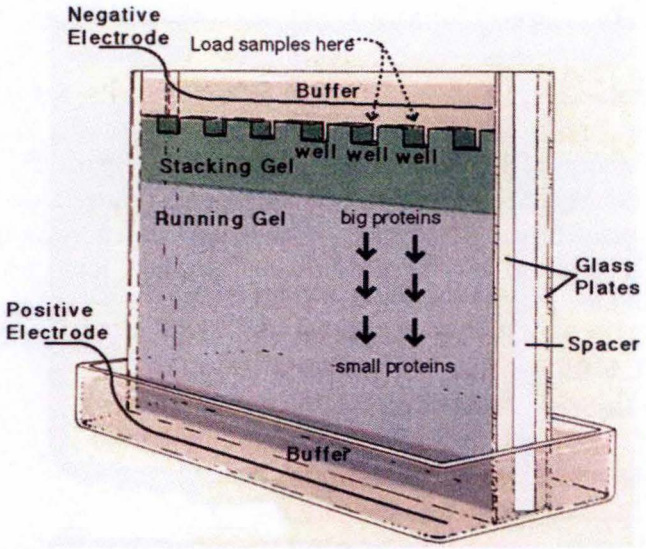


Figure II.8 : Schéma d'une cuve d'électrophorèse
(Image issue du site http://biotechbuster.blogspot.be/2008/08/sds-page_19.html)

Tableau II.15 : Tampon de lyse utilisé pour l'extraction protéique totale

Nom	Firme
Tampon de lyse Laemmli 2x (10 ml) : 2 120 mM Tris-HCl ajusté à pH 6,8 3 4% de SDS 10% (w/v) 4 20% glycérol 5 H_2O distillée	 Sigma Sigma Merck Système Ultrapure water, synergy
Spectrophotomètre Nanodrop ND 10 000	Isogen life science

Tableau II.16 : Matériel et réactifs utilisés pour l'électrophorèse

Nom	Firme
Gel « fait-maison »	Voir tableau II.18
Tampon de migration : 6 Tris Base 25 mM 7 Glycine 190 mM 8 SDS 0,1% 9 Dans 1L H_2O distillée	 Sigma Merck Carl Roth Système Ultrapure water, synergy
Bleu de charge 6X : - 143 mM Tris-HCl - 200 mM SDS - 2 M β-mercaptoéthanol - 25% Glycérol - 0,75 mM Bleu de bromophenol Ajusté à pH 8,0	 Carl Roth Carl Roth Gibco Merck Janssen
Marqueur de poids moléculaire	NEB
H_2O distillée	Système Ultrapure water, synergy
Cuve d'électrophorèse	BioRad
Générateur pour électrophorèse	Pharmacia Biotech

7.4. Western Blot

7.4.1. Principe

Le Western Blot est une technique permettant d'analyser l'abondance d'une protéine d'intérêt dans un lysat cellulaire. La première étape est une électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) permettant de séparer les différentes protéines suivant leur poids moléculaire en les faisant migrer, à l'aide d'un courant électrique, à travers les mailles du gel. Le pourcentage d'acrylamide, ici 12%, permet de définir la taille du maillage et le SDS est un détergent anionique permettant de charger les protéines négativement et donc, leur conférant la capacité de migrer, à travers le gel, vers la borne positive **[Figure II.8]**. Plus les protéines sont petites, plus elles pourront migrer rapidement à travers le maillage et donc loin dans le gel. La deuxième étape consiste à transférer les protéines sur une membrane de nitrocellulose par un transfert liquide. De la même manière que précédemment, un courant électrique est appliqué permettant de transférer les protéines du gel vers la membrane de nitrocellulose. La membrane est ensuite bloquée, à l'aide d'un excès de protéines, afin de limiter au maximum les interactions non spécifiques entre cette membrane et les anticorps reconnaissant la protéine d'intérêt. Une fois le blocage terminé, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire reconnaissant la protéine d'intérêt puis avec l'anticorps secondaire reconnaissant cet anticorps primaire et couplé à une protéine HRP (horseradish peroxidase). Cette protéine produit une luminescence lorsqu'elle est mise en contact du substrat correspondant, ce qui permet de révéler la présence de la protéine. Une échelle de poids moléculaire permet de vérifier que la protéine apparaît bien au niveau du poids moléculaire où elle est censée se trouver et qu'il ne s'agit donc pas d'une interaction non-spécifique de l'anticorps primaire.

7.4.2. Méthode

Extraction protéique totale et dosage de la concentration en protéines

Le milieu de culture est aspiré et les cellules sont rincées deux fois avec du PBS. Les boites sont ensuite bien asséchées, en retirant tous le PBS, avant d'être lysées avec 500 µL de tampon de lyse Laemmli 2x **[Tableau II.15]**. Les cellules sont alors raclées et récupérées dans des tubes Eppendorf puis chauffées à 90°C pendant 10 minutes. La concentration en protéines est mesurée grâce au spectrophotomètre Nanodrop (absorbance à 280 nm) et les lysats sont conservés à -20°C.

Électrophorèse **[Tableau II.16]**

25 µg de protéines sont diluées dans du tampon Laemmli 2x et du bleu de charge 6X **[Tableau II.16]** est ajouté avant que les échantillons ne soient déposés sur le gel. Le bleu de charge contient, entre autres, du β-mercaptoéthanol, un agent chimique permettant de réduire les ponts dissulfures et donc de dénaturer les protéines. Il contient aussi du bleu de bromophénol, un marqueur coloré, chargé négativement, qui migre en même temps que les protéines et permet de voir le front de migration sur le gel. Un marqueur de poids moléculaire est déposé dans un puits pour pouvoir comparer le poids moléculaire des protéines d'intérêt après révélation. Le gel à 12% d'acrylamide **[Tableau II.17]** est placé dans une cuve remplie de tampon de migration **[Tableau II.16]**.

Tableau II.17 : Réactifs utilisés pour la préparation du gel

Nom	Firme
Tampon de concentration : 1 Tris 0,5 M 2 SDS 0,4 % Ajusté à pH 6,8 avec du HCl	 Carl Roth Carl Roth
Tampon de séparation : 3 Tris 1,5 M 4 SDS 0,4 % Ajusté à pH 8,8 avec du HCl	 Carl Roth Carl Roth
Gel de concentration (3,75%) : 5 Tampon de concentration (1,25 ml) 6 Acrylamide (0,5 ml) 7 Eau purifiée (2,25 ml) 8 TEMED (5 □l) 9 APS 10% (50 □l)	 BioRad BioRad BioRad
Gel de séparation (12%) : 10 Tampon de séparation (1,2 ml) 11 Acrylamide (2 ml) 12 Eau purifiée (1,8 ml) 13 TEMED (5 □l) 14 APS 10% (25 □l)	 BioRad BioRad BioRad

Tableau II.18 : Matériel et réactifs utilisés pour le transfert liquide

Nom	Firme
Membrane de nitrocellulose	
Tampon de transfert : 15 Tris Base 25 mM 16 Glycine 190 mM 17 Méthanol 20% 18 Dans 1L H_2O distillée Ajusté à pH 8,3	 Sigma Merck Merck Système Ultrapure water, synergy
Papier Whatman	
Eponges	
Bloc de glace	
H_2O distillée	Système Ultrapure (type 1) water, synergy
Cuve de transfert	BioRad
Générateur pour électrophorèse	Pharmacia Biotech

Tableau II.19 : Matériel et réactifs utilisés pour le blocage de l'incubation des anticorps

Nom	Firme
Lait 5 % : 1 Lait en poudre (2,5g) 2 TBS tween (50 ml)	Nestlé
TBS-tween 1%	BioRad
Boite opaque d'incubation pour Western Blot	Licor
Balanceur Rocker/Shaker MR12	Biosan
BSA 1% + sodium azide	

Tableau II.20 : Anticorps utilisés pour le Western Blot et l'immunofluorescence

Anticorps	Firme	Clonalité	Source	Dilution	Référence
ERK 1/2 total	Cell signaling	polyclonal	Rabbit	1/1000	#9102S
p-ERK	Cell signaling	polyclonal	Rabbit	1/1000	#9101
β-actin	Sigma-Aldrich	monoclonal	Mouse	1/10 000	#A5441
Pumilio 2 (WB)	Cell signaling	polyclonal	Rabbit	1/500	#12323S
Goat-anti-Rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	Monoclonal	Goat	1/3000	#E0216
Goat-anti-Mouse IgG-HRP	Thermofisher Scientific	Polyclonal	Goat	1/3000	#31430
Pumilio 2 (IF)	Santa Cruz	Monoclonal	Mouse	1/200	sc-514108
Alexa 568 nm anti-mouse (anticorps secondaire IF)	Thermofisher Scientific	Monoclonal	Goat	1/1000	A-11004

Tableau II.21 : Matériel et réactifs utilisés pour la révélation des Western Blot

Nom	Firme
Western Blotting Luminal Reagent	Santa Cruz biotechnology
Film radiographique	Santa Cruz biotechnology
Fujifilm Medical film processor FPM 100A	Fujifilm corporation

Un courant électrique continu de 130V est d'abord appliqué, pendant 15 minutes, le temps que les échantillons entrent dans la partie du gel à 3,75%, dit gel de concentration, et s'y alignent. Cette étape permet de concentrer toutes les protéines en un même point de départ avant de commencer la migration à travers le gel de séparation. On applique ensuite un courant de 180V pour permettre aux protéines de migrer jusqu'au bas du gel.

Transfert liquide **[Tableau II.18]**
Une fois la migration terminée, le gel est déposé sur une membrane de nitrocellulose préalablement activée dans de l'eau distillée. Le tout est mis en sandwich entre deux feuilles de papier Whatman puis entre deux éponges et enfermé dans une cassette déposée dans une cuve remplie de tampon de transfert **[Tableau II.18]**. La migration des protéines allant de la borne négative vers la borne positive, il est important de s'assurer que la membrane se trouve bien du côté positif. Un courant de 130 V est alors appliqué pendant 1h30. La cuve de transfert est placée dans un bac de glace afin d'abaisser la température au maximum et de limiter les dégagements de chaleur.

Blocage et incubation des anticorps **[Tableau II.19]**
Une fois le transfert terminé, la membrane est déposée dans une boite opaque et incubée avec du TBS (Tris-Buffered Saline)-tween contenant 5% de lait pendant 1h afin de la saturer en protéines. On effectue ensuite 3 rinçages de 10 minutes au TBS-tween avant d'incuber la membrane une nuit entière, à 4°C, sous agitation, avec l'anticorps primaire reconnaissant la protéine d'intérêt. Les anticorps primaires sont dilués comme indiqué tableau II.20, dans une solution de TBS-tween contenant 0,1% de BSA (Bovine Serum Albumin) à 1% et du sodium azide. Le lendemain, la membrane est de nouveau rincée 3 fois 10 minutes avec du TBS-tween 0,1% avant d'être incubée 1h à température ambiante, sous agitation, avec les anticorps secondaires couplés à la HRP **[Tableau II.20]** dilués dans une solution de lait en poudre à 5%.

Révélation **[Tableau II.21]**
Une fois l'incubation avec les anticorps terminée, la membrane est rincée 3 fois avec du TBS-tween 0,1% puis incubée 5 minutes avec le réactif de révélation Western Blotting Luminol Reagent. Le réactif Luminol est oxydé, en présence de peroxyde d'hydrogène, par la HRP se trouvant sur les anticorps secondaires et émet ainsi de la lumière. Après ces 5 minutes, un film radiographique est déposé sur la membrane pendant 30s à 5 minutes, en chambre noire, avant d'être révélé à l'aide de l'appareil Fujifilm Medical film processor FPM 100A.

7.5. Immunofluorescence

7.5.1. Principe

Le marquage en immunofluorescence est une technique d'immunomarquage permettant de visualiser une protéine au sein de la cellule, à l'aide d'anticorps secondaires couplés à un fluorochrome et reconnaissant un anticorps primaire d'intérêt. Lorsque ce fluorochrome est excité par de la lumière, à une longueur d'onde donnée, il réémet de la lumière à une autre longueur d'onde connue et détectée par le microscope confocal. Afin de visualiser les cellules, du TO-PRO 3, un agent intercalant, visualisé en lumière bleue, est utilisé pour marquer les noyaux.

Tableau II.22 : Matériel et réactifs utilisés pour le marquage en immunofluorescence

Nom	Firme
Couvre-objets en verre stériles	Assistent
PFA 4%	Produit au laboratoire
PBS non stérile	Voir tableau 2.1
PBS-Triton 1%	Carl Roth
PBS-BSA 1%	Carl Roth
Anticorps	Voir tableau 2.21
TO-PRO 3	ThermoFischer
Chambre humide	Papier Whatman humide et parafilm dans une boite en plastique ou en verre
Lame porte-objet	VWR
Bloc Chauffant	
Mowiol	Sigma

7.5.2. Réactifs et matériel [Tableaux II.20 et 2.22]

7.5.3. Méthode

75 000 cellules sont ensemencées sur des couvre-objets en verre se trouvant dans des plaques 24 puits. Les cellules sont fixées, le lendemain matin, avec du PFA 4% pendant 10 minutes, à température ambiante, après que le milieu ait été retiré et que les cellules aient été lavées 3 fois avec du PBS. Une fois la fixation terminée, les cellules sont de nouveau rincées 3 fois avec du PBS avant d'être perméabilisées pendant 5 minutes, à température ambiante, avec du PBS-Triton 1%. La perméabilisation des cellules est nécessaire pour permettre l'entrée des anticorps dans le cytoplasme. Les cellules sont alors rincées 2 fois avec du PBS-BSA 1% avant d'être incubées une nuit entière, à 4°C, en chambre humide, dans l'obscurité, avec l'anticorps primaire dilué comme indiqué tableau 2.21, dans du PBS-BSA 1%. Le lendemain matin, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS-BSA 1% avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire dilué comme indiqué tableau 2.20, dans du PBS-BSA 1%, pendant 1h, à température ambiante, à l'abri de la lumière. Les cellules sont alors rincées 3 fois au PBS-BSA 1% avant d'être incubées pendant 15 minutes, à température ambiante, dans l'obscurité, avec du TO-PRO 3. Les cellules sont alors lavées 3 fois avec du PBS avant d'être montées sur des lames à l'aide de Mowiol préchauffé à 56°C, un alcool polyvinylique permettant de protéger les cellules et coller le couvre-objet sur la lame. Les lames sont laissées au minimum une nuit entière à 4°C avant lecture au microscope confocal, afin de laisser le tout solidifier.

RESULTATS

1. Modèles d'étude

Afin d'étudier l'influence de la protéine Pumilio 2 sur le phénotype de sénescence induit par les oncogènes, trois lignées cellulaires cancéreuses humaines, couramment utilisées dans la recherche sur le cancer, ont été utilisées au cours de ce mémoire. Les cellules épithéliales U-2 OS, sont issues d'un ostéosarcome modérément différentié *(Ponten & Saksela, 1967)* tandis que les lignées MDA-MB-468 et MCF-7 sont issues d'adénocarcinomes métastatiques de glandes mammaires *(Cailleau et al., 1978 ; Soule et al., 1973)*. Ces différentes lignées cellulaires ont été choisies pour permettre de mettre en évidence la capacité de la protéine Pumilio 2 à contourner ce phénotype de senescence. En effet, il s'agit de modèles faciles à manipuler et dans lesquelles il est possible d'induire de l'OIS, à l'inverse d'autres lignées tumorales humaines hautement transformées qui ne répondent plus à cette induction de sénescence.

Pour chacune des lignées cellulaires, la sénescence a était induite grâce aux oncogènes Ras ou MEK. Ceux-ci entrainent une sur-activation de la voie des MAPK, impliquée dans la prolifération. Le stress mitotique ainsi généré peut induire une sénescence cellulaire prématurée. Pour voir l'effet de la protéine Pumilio 2 sur le phénotype sénescent, celle-ci a été transduite dans chacune des lignées cellulaires afin d'y être surexprimée. Les vecteurs Plpc ou pbabe vides ont été utilisés comme contrôle pour avoir des cellules ne sur-exprimant pas la protéine Pumilio 2.

2. Induction de la sénescence

Afin d'induire la sénescence, les cellules ont étaient transduites avec les oncogènes Ras ou MEK, inductibles ou constitutivement actifs. Dans la première partie du mémoire, l'utilisation des oncogènes inductibles a été préférée pour permettre de maîtriser l'induction de la senescence. Les cellules ont alors étaient transduites, à l'aide d'un système rétroviral, avec les oncogènes HRas:ER ou ΔMEK1:ER. Les oncoprotéines résultant de leur traduction sont fusionnées avec le domaine de liaison du récepteur aux œstrogènes (ER) *(Narita, 2010)* et sont inactivées par le repliement de l'oncoprotéine sur elle-même. Ce repliement est médié par une protéine HSP et peut être défait par un traitement au Tamoxifène (4-OHT). Le 4-OHT, dérivé des œstrogènes, se lie sur le récepteur ER et retire ainsi l'inhibition, par la libération de la protéine HSP, des oncogènes HRas et ΔMEK1. Pour cette première partie, la lignée cellulaire U-2 OS a été préférée aux lignées du cancer du sein. Une majorité des cancers du sein sont hormonaux-dépendants et une partie d'entre eux sont sensibles aux œstrogènes. C'est plus particulièrement le cas des cellules MCF-7 chez qui l'utilisation du 4-OHT stimule la prolifération *(Osborne et al., 1985)* et aurait donc pu fausser nos résultats.

L'utilisation d'oncogènes inductibles nécessite le traitement répété des cellules avec le Tamoxifène, sous peine de perdre leur activation et donc, de limiter l'induction de la sénescence. De plus, ces traitements répétés induisent un stress supplémentaire aux cellules. Pour éviter ce désagrément et s'assurer que la sénescence n'était pas perdue au cours du temps, nous avons utilisé, dans la deuxième partie du mémoire, des oncogènes constitutivement actifs. Les cellules MDA-MB-468 et MCF-7 ont alors était transduites, à l'aide du système rétroviral, avec les oncogènes HRas et MEK DD, un phospho-mimétique de la protéine MEK. Dans ce cas-là, les oncogènes étaient constitutivement actifs et les cellules pouvaient être utilisées, sans traitement supplémentaire, dès la fin de la sélection avec les antibiotiques.

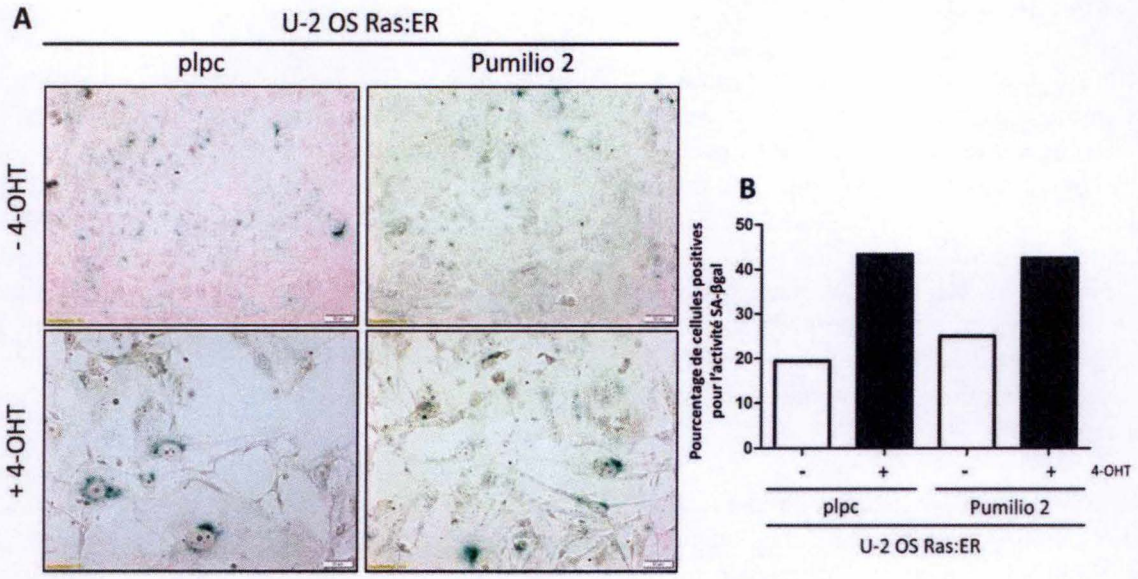


Figure III.1 : Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la morphologie et l'activité SA-βgal des cellules U-2 OS transduites avec l'oncogène inductible HRas:ER
Les cellules transduites avec le vecteur pwzl-HRas:ER et avec le vecteur Plpc-Pumilio 2 ou le vecteur vide Plpc ont été traitées (+), ou non (-), au 4-OHT durant 8 jours. A la fin du traitement, l'activité SA-βgal des cellules a été évaluée en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes » **A)** Micrographie des cellules U-2 OS, réalisée en utilisant un microscope à contraste de phase. Barre d'échelle : 50 µm **B)** Graphique réalisé à l'aide du logiciel GraphPad. Pour chaque condition, 300 cellules étaient comptées et le ratio du nombre de cellules positives pour l'activité SA- βgal sur le nombre de cellules totales était effectué.

Dans une dernière partie, afin de tenter d'améliorer le rendement de la transduction et d'accentuer la sénescence cellulaire, des cellules MCF-7 ont étaient transduites, à l'aide d'un système lentiviral, avec l'oncogène constitutivement actif KRas4B(G12V). La transduction rétrovirale d'oncogènes avait initialement été préférée, malgré un plus faible rendement connu, pour des raisons de biosécurité. Les rétrovirus ne sont en effet capables d'infecter que les cellules en division, contrairement aux lentivirus qui peuvent infecter les cellules à n'importe quelle étape du cycle cellulaire, les rendant efficaces.

3. Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la sénescence induite par l'oncogène inductible HRas:ER dans des cellules U-2 OS

Les cellules U-2 OS ont été transduites, à l'aide de rétrovirus, avec l'oncogène HRas:ER et avec le gène codant pour la protéine Pumilio 2 ou le plasmide vide Plpc, comme contrôle. Les cellules ont ensuite étaient sélectionnées avec les antibiotiques Puromycine (sélection des plasmides Plpc et Plpc-Pum2) et Hygromycine B (sélection du plasmide pwzl-HRas:ER) afin d'éliminer toutes les cellules n'ayant pas été correctement transduites.
Pour induire la sénescence, une fois la sélection terminée, une partie des cellules été traitées au 4-OHT durant une semaine avant d'être utilisées pour les différentes expériences. L'autre partie des cellules n'était pas traitée au 4-OHT afin de servir de contrôle pour l'expérience.

3.1. Morphologie des cellules U-2 OS transduites avec Ras:ER

Les cellules U-2 OS contrôle présentent une forme polygonale typique des cellules épithéliales. Chez les cellules traitées au 4-OHT, des changements morphologiques importants peuvent être observés. Ces cellules ont en effet une forme bien plus élargie et irrégulière, elles semblent s'arrondir et s'aplatir dans la boite de culture **[Figure III.1A]**. Certaines d'entre elles possèdent aussi de nombreuses vacuolisations. Ces changements morphologiques sont typiques de la sénescence cellulaire induite par l'oncogène Ras *(Serrano et al., 1997)*. Chez les cellules traitées au 4-OHT et transduites avec la protéine Pumilio 2, ces changements morphologiques sont aussi visibles mais en moins grande quantité et de manière moins marquée avec des cellules aux formes moins arrondies **[Figure III.1A]**. Ces observations peuvent laisser penser que la protéine Pumilio 2 permet de modérer la morphologie sénescente des cellules traitées au 4-OHT.

3.2. Activité SA-βgal des cellules U-2 OS transduites avec Ras:ER

Afin d'évaluer la proportion de cellules sénescentes, un test d'activité SA-βgal a été réalisé. Ce test permet de marquer, comme décrit dans l'introduction, les cellules sénescentes à un pH sub-optimal de 6. Nous pouvons voir, comme attendu, une augmentation de la proportion de cellules positives pour l'activité SA-βgal, chez les cellules traitées au 4-OHT. Le pourcentage de cellules marquées en bleu passe en effet de 43,3% chez les cellules traitées au Tamoxifène à 19,4% chez les cellules non traitées **[Figure III.1B]**. Ce pourcentage de 19,4% reste cependant élevé pour des cellules contrôle et peut s'expliquer par la confluence trop importante des cellules dans cette condition. La sur-expression de la protéine Pumilio 2 ne semble pas avoir d'effet sur l'activité SA-βgal des cellules traitées au 4-OHT. La proportion de cellules marquées passe en effet de 43,3% à 42,5% chez les cellules transduites avec le gène exprimant la protéine Pumilio 2 **[Figure III.1B]**. La grande quantité de marquage faussement positif dans les conditions contrôle, non traitées au 4-OHT nous oblige à prendre

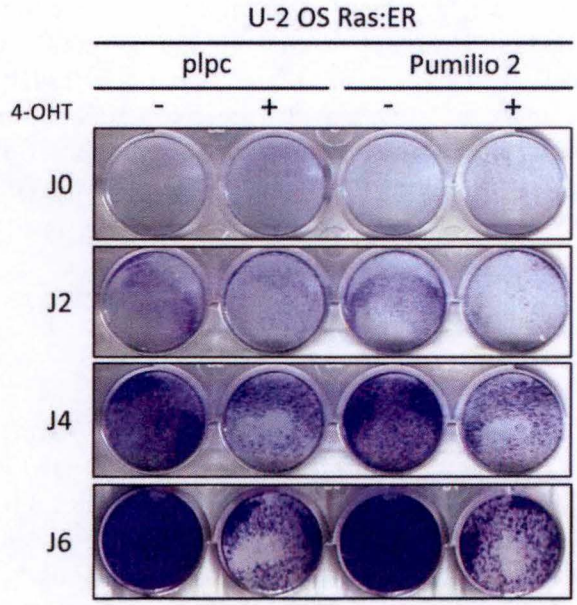


Figure III.2 : Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur le potentiel de prolifération des cellules U-2 OS transduites avec l'oncogène inductible HRas:ER
Les cellules transduites avec le vecteur pwzl-HRas:ER et avec le vecteur Plpc-Pumilio 2 ou le vecteur vide Plpc ont été traitées (+), ou non (-), au 4-OHT durant 8 jours. A la fin du traitement, des tests de prolifération ont été réalisés en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes »

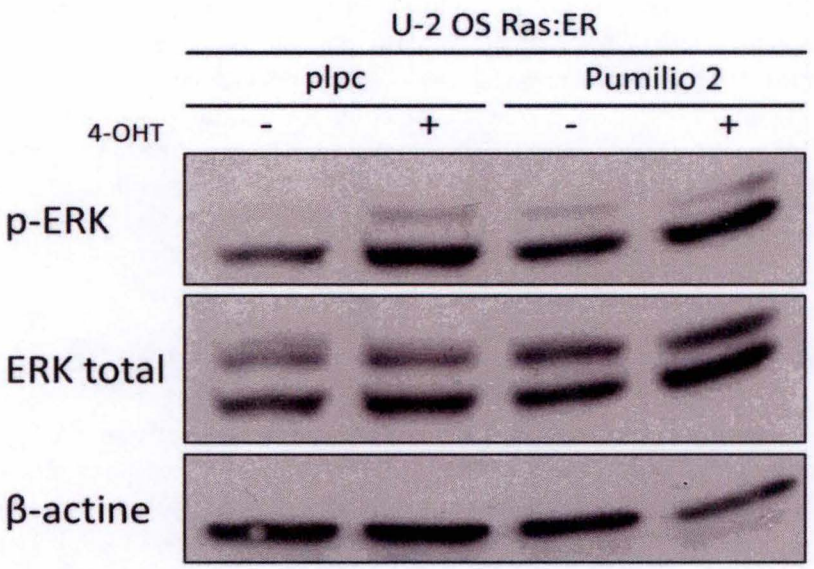


Figure III.3 : Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la voie des MAPK, dans des cellules U-2 OS transduites avec l'oncogène inductible HRas:ER
Les cellules transduites avec le vecteur pwzl-HRas:ER et avec le vecteur Plpc-Pumilio 2 ou le vecteur vide Plpc ont été traitées (+), ou non (-), au 4-OHT durant 8 jours. A la fin du traitement, l'extraction protéique a été réalisée en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes » et l'expression protéique de ERK et de sa forme phosphorylée ont été analysées par western blot. La protéine β-actine a été utilisée comme témoin de charge.

ces résultats avec beaucoup de prudence. Il semble cependant que la protéine Pumilio 2 n'ait ici pas d'effet sur l'activité SA-βgal des cellules sénescentes.

3.3. Potentiel prolifératif des cellules U-2 OS transduites avec Ras:ER

La sénescence est caractérisée par un arrêt de la prolifération cellulaire. Afin d'étudier l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la prolifération des cellules sénescentes, des tests de prolifération ont été réalisés. Ce test consiste à ensemencer un même nombre de cellules pour toutes les conditions et à observer les différences de prolifération sur plusieurs jours en fixant et en colorant les cellules avec du violet de gentiane. Nous pouvons voir, comme attendu, que les cellules traitées aux 4-OHT sont beaucoup moins prolifératives que les cellules contrôle non traitées **[Figure III.2]**, suggérant que l'induction de la sénescence à bien fonctionné. Les cellules traitées, qui sur-expriment Pumilio 2, ne présentent pas de différence de prolifération **[Figure III.2]**, suggérant que la protéine n'a pas d'effet, dans cette lignée, sur le contournement du phénotype de senescence.

3.4. Activation de la voie des MAPK dans les cellules U-2 OS transduites avec Ras:ER

Il a été publié, que la protéine Pumilio 2 était capable de réguler la traduction de la protéine ERK *(Lee et al., 2007 ; Galgano et al., 2008)*. Afin de voir si celle-ci était alors capable d'influencer l'activation de la voie des MAPK, nous avons observé l'expression protéique de ERK, dernière kinase de la voie, ainsi que de sa phosphorylation, par la technique du western blot. Les cellules traitées au 4-OHT présentent, comme attendu, une augmentation de la quantité protéique de p-ERK. Cette augmentation correspondant à l'activation de la voie des MAPK par l'oncogène Ras **[Figure III.3]**. Contrairement à nos attentes, la transduction de la protéine Pumilio 2 ne semble pas modifier l'expression protéique de ERK ni de sa phosphorylation **[Figure III.3]**, suggérant que la protéine n'a ici pas d'influence sur la voie des MAPK.

Ensembles, ces résultats permettent de dire que l'oncogène HRas:ER inductible est capable d'induire la sénescence prématurée des cellules U-2 OS et que la protéine Pumilio 2 n'a, dans ce modèle, aucune influence sur le contournement de la sénescence.

4. Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la sénescence induite par l'oncogène inductible ΔMEK1:ER dans des cellules U-2 OS

Comme précédemment, les cellules U-2 OS ont été transduites, à l'aide d'un système rétroviral, avec l'oncogène ΔMEK1:ER et avec le gène codant pour la protéine Pumilio 2 ou le plasmide vide Plpc, comme contrôle. Elles ont ensuite étaient sélectionnées avec les antibiotiques Puromycine (sélection des plasmides Plpc et Plpc-Pum2) et Généticine (sélection du plasmide pnlc-ΔMEK1:ER) et la sénescence a été induite par le traitement au 4-OHT.

4.1. Morphologie des cellules U-2 OS transduites avec MEK:ER

Les cellules U-2 OS transduites avec MEK :ER et traitées au 4-OHT présentent également des changements morphologiques importants bien que différents de ceux des cellules transduites

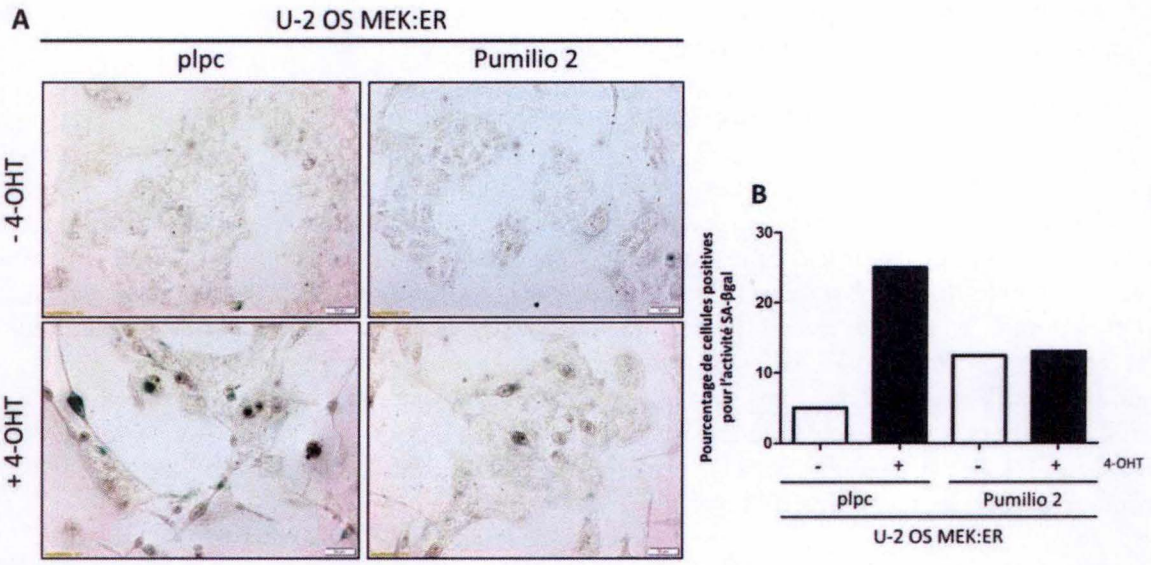


Figure III.4 : Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la morphologie et l'activité SA-βgal des cellules U-2 OS transduites avec l'oncogène inductible ΔMEK1:ER
Les cellules transduites avec le vecteur pnlc-ΔMEK1:ER et avec le vecteur Plpc-Pumilio 2 ou le vecteur vide Plpc ont été traitées (+), ou non (-), au 4-OHT durant 8 jours. A la fin du traitement, l'activité SA-βgal des cellules a été évaluée en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes » **A)** Micrographie des cellules U-2 OS, réalisée en utilisant un microscope à contraste de phase. Agrandissement 10X. **B)** Graphique réalisé à l'aide du logiciel GraphPad. Pour chaque condition, 300 cellules étaient comptées et le ratio du nombre de cellules positives pour l'activité SA- βgal sur le nombre de cellules totales était effectué.

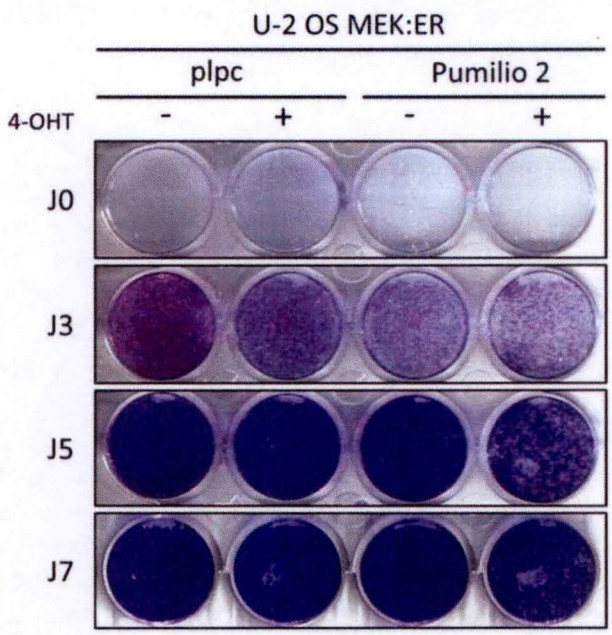


Figure III.5 : Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur le potentiel de prolifération des cellules U-2 OS transduites avec l'oncogène inductible ΔMEK1:ER
Les cellules transduites avec le vecteur pnlc-ΔMEK1:ER et avec le vecteur Plpc-Pumilio 2 ou le vecteur vide Plpc ont été traitées (+), ou non (-), au 4-OHT durant 8 jours. A la fin du traitement, des tests de prolifération ont été réalisés en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes ».

avec l'oncogène Ras. Nous pouvons voir que ces cellules à la forme irrégulière et aplatie, comme précédemment, n'ont pas tendance à s'arrondir mais plutôt à prendre une forme fuselée avec l'apparition de prolongements cytoplasmiques **[Figure III.4A]**. Ces changements morphologiques sont cependant, encore une fois, en accord avec la morphologie des cellules sénescentes trouvée dans la bibliographie *(Zhu et al., 1998)*. Cette fois-ci, nous pouvons voir, dans la condition traitée au 4-OHT et transduite avec la protéine Pumilio 2, émerger de petits ilots de cellules à la forme épithéliale au milieu des cellules à l'apparence sénescentes **[Figure III.4A]**. Cette observation suggère que certaines cellules ont pu contourner la sénescence induite par la protéine MEK et se mettre à proliférer.

4.2. Activité SA-βgal des cellules U-2 OS transduites avec MEK:ER

Comme précédemment, nous avons réalisé un test d'activité SA-βgal sur nos cellules. Nous pouvons voir, comme attendu, une augmentation de la proportion de cellules positives pour l'activité SA-βgal, dans la condition traitées au Tamoxifène. Nous trouvons, en effet, 5 fois plus de cellules marquées dans cette condition, en comparaison avec les cellules non traitées **[Figure III.4B]**. Les cellules traitées au 4-OHT et transduites avec Pumilio 2 présentent une réduction du pourcentage de cellules positives pour l'activité SA-βgal. Nous trouvons en effet deux fois moins de cellules marquées dans cette condition, en comparaison aux cellules traitées au 4-OHT ne sur-exprimant pas la protéine Pumilio 2 **[Figure III.4B]**. De plus, le pourcentage de cellules positives semble redescendre au même niveau que celui des cellules contrôle transduites avec Pumilio 2 et non traitées au 4-OHT **[Figure III.4B]**. La diminution de l'activité SA-βgal suggère que la protéine Pumilio 2 pourrait avoir une influence sur le phénotype sénescent des cellules U-2 OS transduites avec l'oncogène MEK.

4.3. Potentiel prolifératif des cellules U-2 OS transduites avec MEK:ER

Comme précédemment, nous avons réalisé un test de prolifération sur nos cellules U-2 OS transduites avec l'oncogène inductible ΔMEK1:ER et la protéine Pumilio 2. Cette fois-ci, nous ne constatons aucune différence de prolifération après traitement des cellules au Tamoxifène **[Figure III.5]**. Cette observation suggère que la sénescence n'a pas été induite correctement dans toutes les cellules. Ceci peut être dû au traitement réalisé avec le Tamoxifène ou à une transduction insuffisante pour maintenir le phénotype de sénescence stable dans le temps. Il est possible, qu'au cours du temps, l'induction soit perdue et que les cellules aient besoin d'être continuellement traitées au 4-OHT pour que l'oncogène puisse induire et maintenir la sénescence. Sachant que les cellules U-2 OS sont mutées pour la protéine p16 *(Al-Mohanna et al., 2004)*, il est aussi possible que la sénescence ait été contournée de manière naturelle par ces cellules. La protéine p16 est en effet un inhibiteur du cycle cellulaire et peut être importante dans le maintien de la sénescence. Les cellules transduites avec Pumilio 2 et traitées au 4-OHT semblent tout de même présenter un très léger retard de prolifération en comparaison aux autres conditions **[Figure III.5]**, suggérant que la protéine pourrait avoir, dans ce cas-là, un impact négatif sur la prolifération cellulaire.

4.4. Niveaux d'ARNm de marqueurs de prolifération et de la sénescence dans les cellules U-2 OS transduites avec MEK:ER

Nous avons ensuite voulu évaluer l'influence de la protéine Pumilio 2 sur le niveau d'ARN du marqueur de prolifération Ki-67. Ki-67 est une protéine nucléaire présente uniquement au moment de la mitose. Nous pouvons voir que les cellules traitées au 4-OHT présentent une diminution du taux de transcrits de Ki-67, de moitié, par rapport aux cellules non traitées

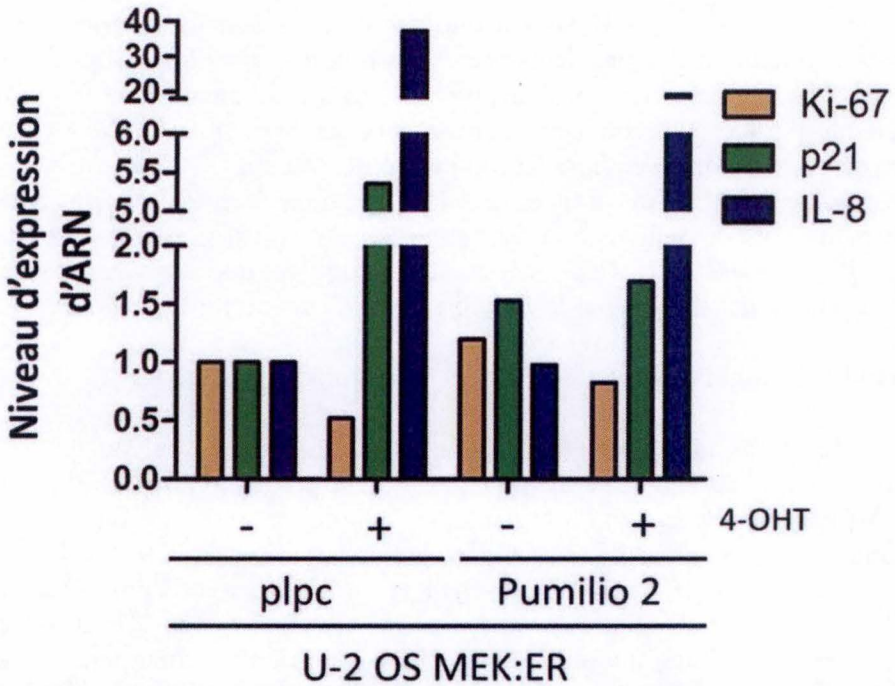


Figure III.6 : Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur les niveaux d'ARNm de marqueurs de prolifération et de la sénescence dans des cellules U-2 OS transduites avec l'oncogène inductible ΔMEK1:ER

Les cellules transduites avec le vecteur pnlc-ΔMEK1:ER et avec le vecteur Plpc-Pumilio 2 ou le vecteur vide Plpc ont été traitées (+), ou non (-), au 4-OHT durant 8 jours. A la fin du traitement, l'extraction d'ARN totale, la rétro-transcription et la PCR quantitative ont été réalisées en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes ». Les résultats ont été normalisés par la technique du δδCT en utilisant la GAPDH comme HKG et la condition transduite avec le vecteur Plpc et non traitée au 4-OHT comme référence. Le graphique a été réalisé à l'aide du logiciel GraphPad.

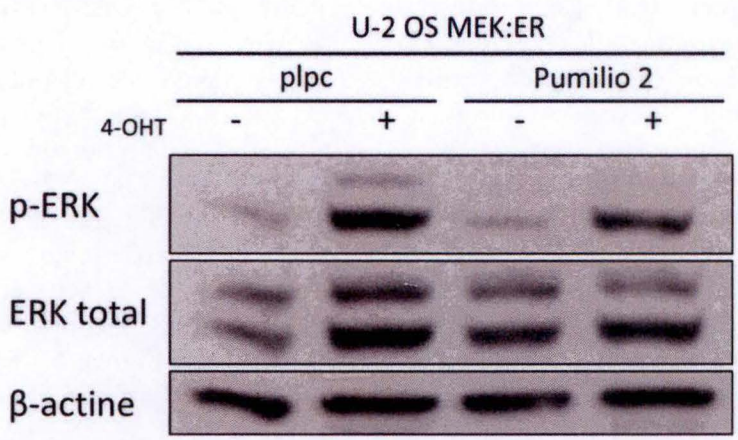


Figure III.7 : Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la voie des MAPK, dans des cellules U-2 OS transduites avec l'oncogène inductible ΔMEK1:ER

Les cellules transduites avec le vecteur pnlc-ΔMEK1:ER et avec le vecteur Plpc-Pumilio 2 ou le vecteur vide Plpc ont été traitées (+), ou non (-), au 4-OHT durant 8 jours. A la fin du traitement, l'extraction protéique a été réalisée en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes » et l'expression protéique de ERK et de sa forme phosphorylée ont été analysées par western blot. La protéine β-actine a été utilisée comme témoin de charge.

[Figure III.6]. Ceci est en accord avec le fait que les cellules sénescentes ne prolifèrent plus. Lorsque les cellules sont en plus transduites avec Pumilio 2, la quantité de transcrits de Ki-67 est légèrement plus élevée **[Figure III.6]** suggérant que ces cellules puissent être légèrement plus prolifératives. Nous avons aussi regardé le niveau d'ARNm de l'inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines, p21. La protéine p21 est connue pour inhiber le cycle cellulaire. Nous pouvons voir, comme attendu, qu'après traitement au Tamoxifène, le niveau de transcrits de p21 est multiplié par 5 suggérant que le cycle cellulaire est inhibé **[Figure III.6]**. Dans les cellules transduites avec Pumilio 2 et traitées au 4-OHT, la quantité de transcrits de p21 est largement inférieure et revient presque au niveau des cellules contrôles **[Figure III.6]**, suggérant que la surexpression de Pumilio 2 empêche l'arrêt du cycle cellulaire. Enfin, nous avons évalué le niveau de transcription de l'interleukine-8 (IL-8). L'IL-8 est une cytokine impliquée dans le SASP. Nous pouvons voir que le traitement au 4-OHT entraîne une très forte augmentation de la quantité de transcrits de l'IL-8. Le niveau d'ARNm est en effet multiplié par 37 **[Figure III.6]**. Avec la protéine Pumilio 2, le niveau de transcrits de l'IL-8 est lui aussi augmenté mais en moindre proportion avec un niveau d'ARNm multiplié par 19,5 par rapport aux cellules non traitées **[Figure III.6]**. Ensemble, ces résultats nous indiquent que les cellules U-2 OS transduites avec MEK:ER et traitées au Tamoxifène acquièrent, comme voulu, un phénotype sénescent et que la protéine Pumilio 2 semble influencer négativement ce phénotype.

4.5. Activation de la voie des MAPK dans les cellules U-2 OS transduites avec Ras:ER

Comme précédemment, nous avons observé l'expression protéique de la protéine p-ERK. Nous pouvons voir, comme attendu, que le traitement des cellules au 4-OHT entraine une forte augmentation de la quantité de p-ERK **[Figure III.7]**, indiquant que la voie des MAPK est bien sur-activée par l'oncogène inductible MEK:ER. Nous pouvons aussi constater une diminution de la quantité de p-ERK lorsque les cellules sont, en plus, transduites avec Pumilio 2 **[Figure III.7]**. Ces résultats suggèrent que la protéine Pumilio 2 permet de réguler négativement la voie des MAPK par l'intermédiaire de la régulation de ERK.

Ensembles, ces résultats permettent de dire que l'oncogène ΔMEK1:ER inductible est capable d'induire la sénescence prématurée des cellules U-2 OS et qu'une surexpression de la protéine Pumilio 2 permet aux cellules de contourner partiellement cette sénescence.

5. Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la sénescence induite par l'oncogène constitutivemet actif HRas dans des cellules MDA-MB-468

Les cellules MDA-MB-468 ont été transduites, à l'aide de rétrovirus, avec l'oncogène HRas constitutivement actif ou le plasmide vide pwzl comme contrôle et avec le gène codant pour la protéine Pumilio 2 ou le plasmide vide Plpc, comme contrôle. Les cellules ont ensuite étaient sélectionnées avec les antibiotiques Puromycine (sélection des plasmides Plpc et Plpc-Pum2) et Hygromycine B (sélection des plasmides pwzl et pwzl-HRas). L'oncogène étant constitutivement actif, les cellules pouvaient être utilisées dès la fin de la sélection, sans nécessiter de traitement supplémentaire au 4-OHT.

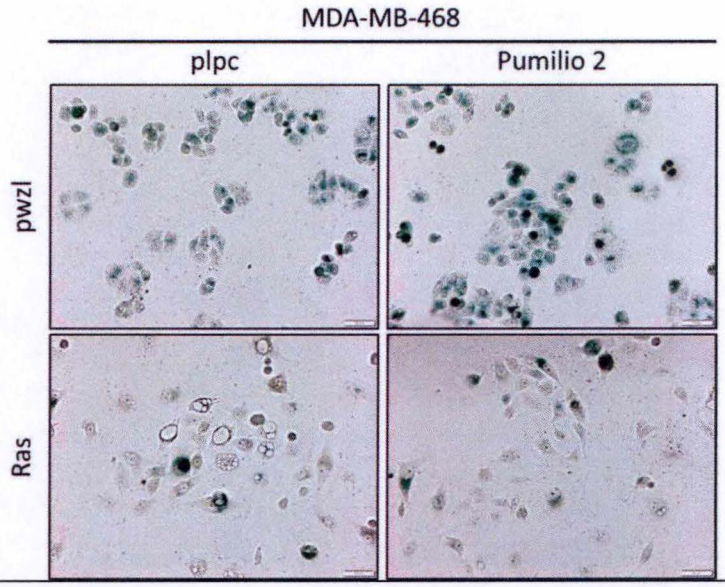


Figure III.8 : Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la morphologie des cellules MDA-MB-468 transduites avec l'oncogène constitutivement actif HRas

Les cellules transduites avec le vecteur pwzl-HRas ou le vecteur vide pwzl et avec le vecteur Plpc-Pumilio 2 ou le vecteur vide Plpc ont été traitées (+), ou non (-), au 4-OHT durant 8 jours. A la fin du traitement, l'activité SA-βgal des cellules a été évaluée en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes » **A)** Micrographie des cellules MDA-MB-468, réalisée en utilisant un microscope à contraste de phase. Agrandissement 10X.

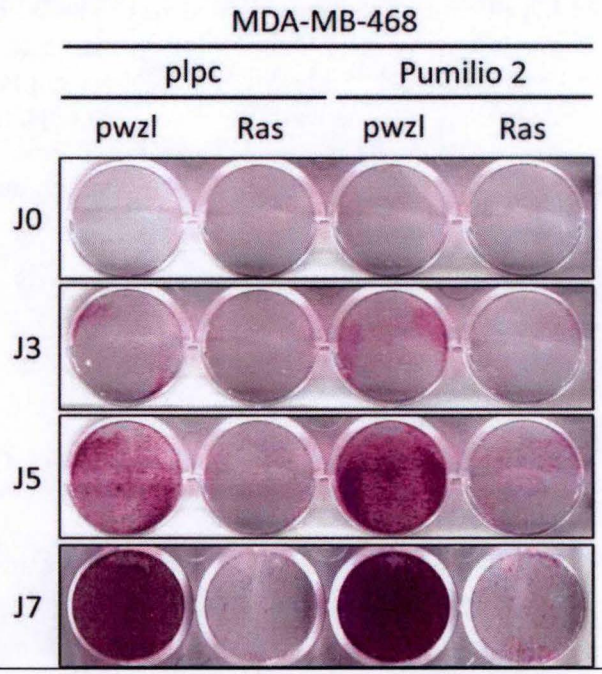


Figure III.9 : Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur le potentiel de prolifération des cellules MDA-MB-468 transduites avec l'oncogène constitutivement actif HRas

Les cellules ont été transduites avec le vecteur pwzl-HRas ou le vecteur vide pwzl et avec le vecteur Plpc-Pumilio 2 ou le vecteur vide Plpc. A la fin de la sélection par les antibiotiques, des tests de prolifération ont été réalisés en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes »

5.1. Morphologie des cellules MDA-MB-468 transduites avec l'oncogène constitutivement actif HRas

Les cellules MDA-MB-468 contrôle arborent une forme polygonale typique des cellules épithéliales. Nous pouvons voir que les cellules transduites avec l'oncogène HRas ont une forme un peu plus étendue et aplatie et présentent surtout une grande quantité de vacuoles **[Figure III.8]**, morphologie typique des cellules sénescentes. Les cellules transduites avec Ras et Pumilio 2 montrent toujours une forme un peu plus aplatie mais possèdent beaucoup moins de vacuoles. Dans cette condition, nous pouvons voir émerger, comme précédemment, de petits ilôts de cellules polygonales au milieu des cellules sénescentes **[Figure III.8]**, suggérant que la protéine Pumilio 2 leur a permis de contourner la sénescence et de proliférer.

5.2. Potentiel prolifératif des cellules MDA-MB-468 transduites avec l'oncogène constitutivement actif HRas

Comme précédemment, nous avons réalisé un test de prolifération sur nos cellules MDA-MB-468 transduites avec l'oncogène constitutivement actif HRas et la protéine Pumilio 2. Nous pouvons voir, dans les conditions transduites avec HRas, une très forte diminution de la prolifération **[Figure III.9]**, suggérant une forte induction de la sénescence pas l'oncogène Ras dans les cellules MDA-MB-468. Les cellules transduites avec HRas et Pumilio 2 semblent être légèrement plus prolifératives **[Figure III.9]**, suggérant que la protéine Pumilio 2 pourrait, dans ce cas, avoir permis à quelques cellules de contourner la sénescence et de se mettre à proliférer. Ces résultats sont très modérés mais pourraient être optimisés en ajustant les conditions du test de prolifération.

5.3. Niveau d'ARNm de marqueurs de prolifération et de la sénescence dans les cellules MDA-MB-468 transduites avec l'oncogène constitutivement actif HRas

Comme précédemment, nous avons regardé le taux de transcription du marqueur de prolifération Ki-67. Nous pouvons voir que les cellules transduites avec l'oncogène HRas ont un niveau d'ARNm de Ki-67 3,5 fois supérieur à celui des cellules contrôle **[Figure III.10]**, suggérant que ces cellules sont plus prolifératives. Cette observation est en contradiction avec le test de prolifération où nous avons pu voir un arrêt quasi complet de la prolifération des cellules **[Figure III.9]**. Les extractions d'ARNm ont été effectuées au jour 0 tandis que les tests de prolifération ont duré jusqu'au jour 7, il est donc possible, qu'au départ, l'activation de l'oncogène HRas ait entrainé une augmentation de la prolifération, due à une activation importante de la voie des MAPK, et que le stress mitotique engendré ait entrainé l'arrêt du cycle cellulaire dans les jours suivants, expliquant que le marqueur de prolifération Ki-67 soit encore présent à un niveau important au jour 0. Ce phénomène d'hyper prolifération est souvent observée dans les premiers jours après induction de la sénescence par des oncogènes *(Ogrunc et al., 2014)*. Les cellules transduites avec Pumilio 2 et HRas présentent une augmentation encore plus importante du niveau d'ARNm de Ki-67. Ce taux est en effet 4,7 fois supérieur à celui des cellules contrôle **[Figure III.10]**, suggérant que les cellules transduites avec Pumilio 2 sont plus prolifératives. Il est cependant difficile d'interpréter ces résultats et d'en tirer une conclusion scientifiquement solide. Nous avons ensuite regardé le taux de transcription de p16. Comme p21, p16 est un inhibiteur du cycle cellulaire. Nous pouvons voir que les cellules transduites avec HRas présentent, comme attendu, une augmentation des niveaux d'ARNm de p16 et p21. La quantité de transcrits est en effet, respectivement, multipliée par 4,4 et 3,3 **[Figure III.10]** suggérant que le cycle cellulaire de ces cellules puisse être arrêté. Ce résultat ne semble, encore une fois pas totalement

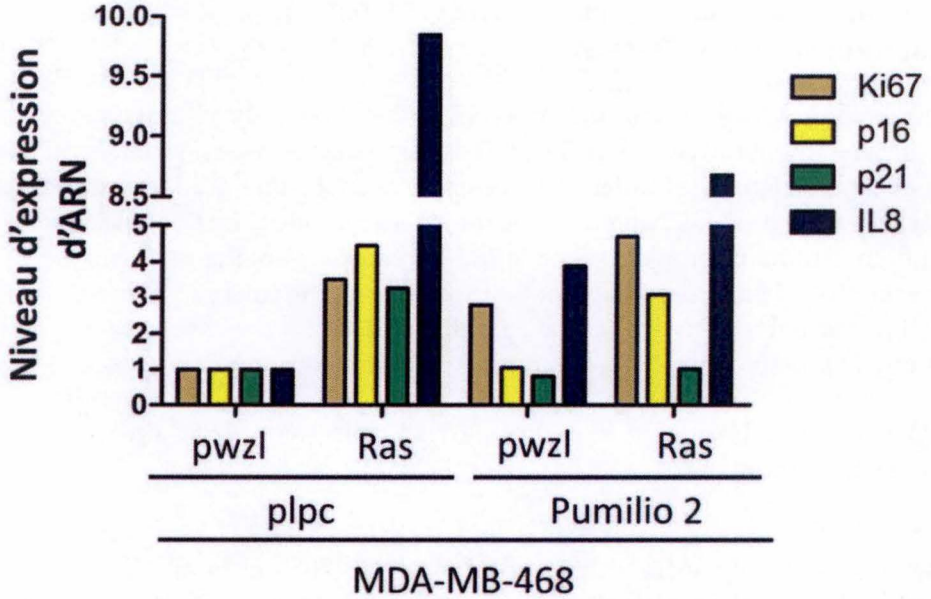


Figure III.10 : Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur les niveaux d'ARNm de marqueurs de prolifération et de la sénescence dans des cellules MDA-MB-468 transduites avec l'oncogène constitutivement actif HRas

Les cellules ont été transduites avec le vecteur pwzl-HRas ou le vecteur vide pwzl et avec le vecteur Plpc-Pumilio 2 ou le vecteur vide Plpc. A la fin de la sélection par les antibiotiques, l'extraction d'ARN totale, la rétro-transcription et la PCR quantitative ont été réalisées en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes ». Les résultats ont été normalisés par la technique du δδCT en utilisant la GAPDH comme HKG et la condition transduite avec le vecteur Plpc et non traitée au 4-OHT comme référence. Le graphique a été réalisé à l'aide du logiciel GraphPad.

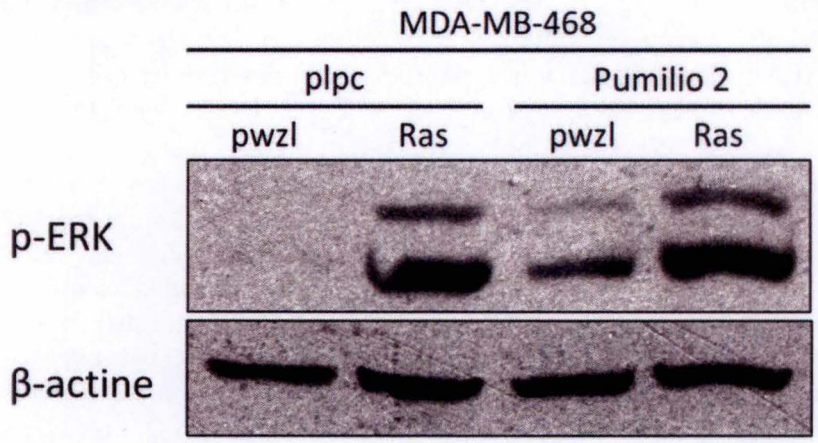


Figure III.11 : Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la voie des MAPK, dans des cellules MDA-MB-468 transduites avec l'oncogène constitutivement actif HRas

Les cellules ont été transduites avec le vecteur pwzl-HRas ou le vecteur vide pwzl et avec le vecteur Plpc-Pumilio 2 ou le vecteur vide Plpc. A la fin de la sélection par les antibiotiques, l'extraction protéique a été réalisée en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes » et l'expression protéique de la forme phosphorylée de ERK a été analysée par western blot. La protéine β-actine a été utilisée comme témoin de charge.

compatible avec les niveaux de transcrits de Ki-67 mais peut illustrer un état de transition où les cellules prolifératives sont en train d'arrêter leur cycle cellulaire par une augmentation des CKI. Ceci pourrait aussi s'expliquer par la présence de populations cellulaires avec des phénotypes hétérogènes. Nous pouvons voir que les cellules transduites avec HRas et Pumilio 2 présentent une diminution des niveaux de transcrits de p16 et p21, et particulièrement du niveau d'ARNm de p21 qui revient au niveau des cellules contrôles **[Figure III.10]**. Ceci suggère que la protéine Pumilio 2 réduit l'inhibition du cycle cellulaire. Enfin, nous avons regardé les niveaux d'expression de l'IL-8. Nous pouvons voir que les cellules transduites avec HRas présentent, comme attendu, une forte élévation du niveau d'expression des ARNm de l'IL-8 **[Figure III.10]**, suggérant que ces cellules aient un phénotype sécrétoire associé à la sénescence. Les cellules transduites, en plus, avec Pumilio 2 montrent une légère réduction de ce niveau de transcrits de l'IL-8 **[Figure III.10]**, suggérant que la protéine Pumilio 2 permet de réduire modérément le phénotype sécrétoire des cellules.

5.4. Activation de la voie des MAPK dans les cellules MDA-MB-468 transduites avec l'oncogène constitutivement actif HRas

Comme précédemment, nous avons observé l'expression protéique de la protéine p-ERK. Nous pouvons voir que les cellules transduites avec l'oncogène HRas présentent une forte augmentation de la quantité protéique de p-ERK **[Figure III.11]**, en accord avec l'activation supposée de la voie des MAPK par l'oncogène. Les cellules transduites avec HRas et Pumilio 2 ne présentent cependant aucune différence au niveau de l'expression protéique de pERK **[Figure III.11]**, suggérant que la protéine Pumilio 2 n'ait ici pas d'influence sur la voie des MAPK.

Ensemble, ces résultats permettent de dire que l'oncogène constitutivement actif HRas est un très bon inducteur de la sénescence dans le modèle cellulaire MDA-MB-468. De plus, la protéine Pumilio 2 semble avoir une légère influence sur le phénotype sénescent des cellules avec une morphologie sénescente moins prononcée, une légère reprise de la prolifération et une diminution du taux de transcrits de p16 et p21. Cette influence ne semble cependant pas être exercée via un contrôle négatif de la voie des MAPK.

6. Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la sénescence induite par l'oncogène constitutivement actif MEKDD dans des cellules MCF-7

Les cellules MCF-7 ont été transduites, à l'aide d'un système rétroviral, avec la kinase MEK DD constitutivement active ou le plasmide vide pwzl comme contrôle et avec le gène codant pour la protéine Pumilio 2 ou le plasmide vide Plpc, comme contrôle. Les cellules ont ensuite été sélectionnées avec les antibiotiques Puromycine (sélection des plasmides Plpc et Plpc-Pum2) et Hygromycine B (sélection des plasmides pwzl et pwzl-MEK DD).

6.1. Potentiel prolifératif des cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif MEK DD

Comme précédemment, nous avons réalisé un test de prolifération sur nos cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif MEK DD et la protéine Pumilio 2. Nous pouvons voir que la transduction de l'oncogène MEK DD n'a aucun effet sur la prolifération des cellules **[Figure III.12]**, suggérant que l'activation constitutive de la kinase ne permet pas

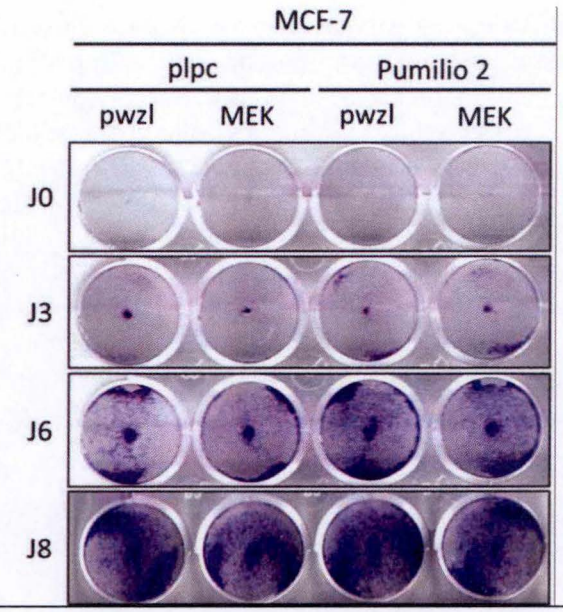


Figure III.12 : Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur le potentiel de prolifération des cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif MEK DD

Les cellules ont été transduites avec le vecteur pwzl-MEK DD ou le vecteur vide pwzl et avec le vecteur Plpc-Pumilio 2 ou le vecteur vide Plpc. A la fin de la sélection par les antibiotiques, des tests de prolifération ont été réalisés en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes »

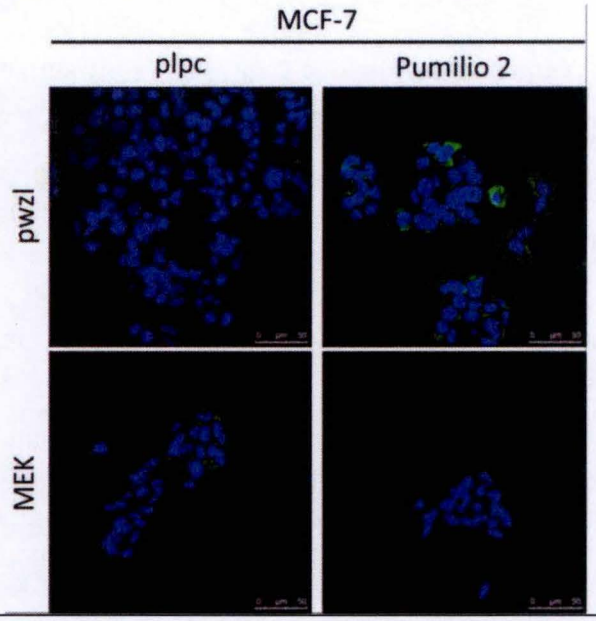


Figure III.13 : Evaluation de l'expression protéique de la protéine Pumilio 2 dans les cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif MEK DD

Les cellules ont été transduites avec le vecteur pwzl-MEK DD ou le vecteur vide pwzl et avec le vecteur Plpc-Pumilio 2 ou le vecteur vide Plpc. A la fin de la sélection par les antibiotiques, un marquage par immunofluorescence de la protéine Pumilio 2 a été réalisé en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes ». Les micrographies ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal. Barre d'échelle : 50 µm.

ici d'induire la sénescence. La protéine Pumilio 2 ne semble, elle aussi, avoir aucun effet sur la prolifération cellulaire **[Figure III.12]**.

6.2. Evaluation de l'expression protéique de Pumilio 2 dans les cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif MEK DD

Afin de s'assurer de la surexpression de la protéine Pumilio 2, suite à la transduction de son gène dans les cellules MCF-7, nous avons effectué un marquage de la protéine en immunofluorescence. Nous pouvons voir, dans les cellules non transduites avec Pumilio 2, une légère expression basale de la protéine **[Figure III.13]**. Nous observons aussi, comme attendu, une augmentation du marquage dans la condition transduite avec Pumilio 2 et le vecteur vide Plpc **[Figure III.13]**. Ce marquage ne semble cependant pas être homogène **[Figure III.13]**, indiquant que certaines cellules sur-expriment la protéine Pumilio 2 de manière plus importante. Etonnement, les cellules transduites avec l'oncogène MEK DD et Pumilio 2 retrouvent un marquage basal **[Figure III.13]**, suggérant que ces cellules ne sur-expriment plus la protéine Pumilio 2. Ceci peut laisser supposer l'existence d'un rétrocontrôle négatif de la voie des MAPK sur la protéine Pumilio 2.
Nous avons ensuite évalué l'expression protéique de Pumilio 2 par la technique du western blot. Nous pouvons, encore une fois voir apparaitre, dans les conditions non transduites avec Pumilio 2, un taux basal de la protéine **[Figure III.14]**. Nous voyons aussi que la transduction de la protéine Pumilio 2 entraine, comme attendu, une augmentation de son taux protéique **[Figure III.14]**. Contrairement à l'observation précédente, l'expression protéique semble être conservée dans la condition transduite avec l'oncogène MEK DD **[Figure III.14]**. Ce résultat illustre le fait que, dans la population totale, la protéine Pumilio 2 semble être surexprimée. Cependant, si l'on observe, plus spécifiquement les cellules, par l'intermédiaire de l'immunofluorescence, nous pouvons voir une hétérogénéité d'expression au sein de la population. En effet, toutes les cellules ne présentent pas le même niveau d'expression de la protéine Pumilio 2 et celui-ci semble être plus fortement altéré dans les cellules transduites avec l'oncogène, suggérant un possible rétrocontrôle dans certaines sous-populations.

6.3. Activation de la voie des MAPK dans les cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif MEK DD

Comme précédemment, nous avons observé l'expression de la protéine p-ERK. Nous pouvons voir que les cellules transduites avec MEK DD ne présentent pas d'augmentation de la quantité de p-ERK **[Figure III.14]**. Cette observation est en accord avec les tests de prolifération et indique que la kinase constitutivement active MEK DD n'a pas induit la sénescence dans les cellules MCF-7. Les cellules transduites avec Pumilio 2 semblent présenter une légère augmentation de la quantité de p-ERK **[Figure III.14]**.

Ensemble, ces résultats permettent de dire que la kinase constitutivement active MEK-DD n'est pas capable d'induire la sénescence prématurée des cellules MCF-7. Ces expériences nous ont aussi permis de nous assurer que la transduction de Pumilio 2 entrainait bien une surexpression de la protéine au sein des cellules.

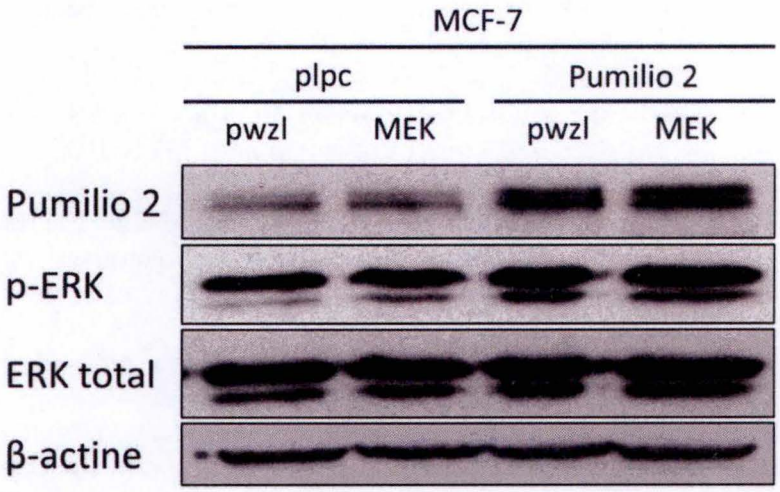


Figure III.14 : Evaluation de l'expression protéique de Pumilio 2 et analyse de son influence sur la voie des MAPK, dans des cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif MEK DD

Les cellules ont été transduites avec le vecteur pwzl-MEK DD ou le vecteur vide pwzl et avec le vecteur Plpc-Pumilio 2 ou le vecteur vide Plpc. A la fin de la sélection par les antibiotiques, l'extraction protéique a été réalisée en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes » et l'expression protéique de Pumilio 2, de ERK et de sa forme phosphorylée ont été analysées par western blot. La protéine β-actine a été utilisée comme témoin de charge.

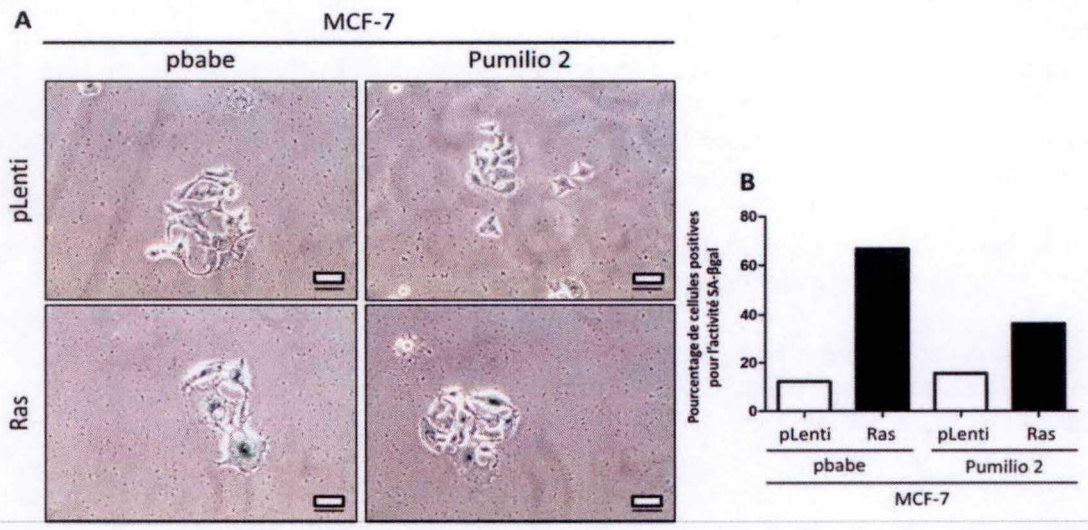


Figure III.15 : Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la morphologie et l'activité SA-βgal des cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif KRas4B(G12V)

Les cellules ont été transduites avec le vecteur pLenti-KRas4B(G12V) ou le vecteur vide pLenti et avec le vecteur pbabe-Pumilio 2 ou le vecteur vide pbabe. A la fin de la sélection par les antibiotiques, l'activité SA-βgal des cellules a été évaluée en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes » **A)** Micrographie des cellules MCF-7, réalisée en utilisant un microscope à contraste de phase. Barre d'échelle : 50µm. **B)** Graphique réalisé à l'aide du logiciel GraphPad. Pour chaque condition, 300 cellules étaient comptées et le ratio du nombre de cellules positives pour l'activité SA- βgal sur le nombre de cellules totales était effectué.

7. Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur la sénescence induite par l'oncogène constitutivement actif KRas4B(G12V) dans des cellules MCF-7

Les cellules MCF-7 ont été transduites, à l'aide d'un système lentiviral, avec l'oncogène KRas constitutivement actif ou le plasmide vide pLenti comme contrôle et avec le gène codant pour la protéine Pumilio 2 ou le plasmide vide Plpc. Les cellules ont ensuite étaient sélectionnées avec les antibiotiques Puromycine (sélection des plasmides Plpc et Plpc-Pum2) et Hygromycine B (sélection des plasmides pLenti et pLenti-KRas). L'oncogène étant constitutivement actif, les cellules pouvaient être utilisées dès la fin de la sélection, sans nécessiter de traitement supplémentaire au 4-OHT.

7.1. Morphologie des cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif KRas

Les cellules MCF-7 contrôle arborent une forme polygonale typique des cellules épithéliales. Chez les cellules transduites avec l'oncogène KRas, des changements morphologiques typiques de la sénescence peuvent être observés. Les cellules sont en effet élargies, arrondies et aplaties **[Figure III.15A]**. La transduction supplémentaire de Pumilio 2 semble diminuer légèrement cette morphologie sénescente avec l'apparition d'amas de cellules à la forme plus polygonale **[Figure III.15A]**, suggérant que la protéine ait permis aux cellules de contourner la sénescence.

7.2. Activité SA-βgal des cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif KRas

Comme précédemment, nous avons effectué un test d'activité SA-βgal. Les cellules transduites avec l'oncogène KRas présentent une augmentation du marquage, en comparaison aux cellules contrôles transduites avec le vecteur vide pLenti **[Figure III.15A]**. La proportion de cellules positives pour l'activité SA-βgal passe en effet de 12,3% dans la condition contrôle à 66,8% dans la condition transduite avec KRas **[Figure III.15B]**. Ceci nous indique que l'oncogène KRas a permis d'induire la sénescence dans les cellules MCF-7. Les cellules transduites avec KRas et Pumilio 2 semblent présenter une diminution de ce marquage **[Figure III.15A]**. La proportion de cellules sénescente est en effet diminuée à 36,2% dans les cellules transduites avec KRas et Pumilio 2 **[Figure III.15B]**. Ces résultats suggèrent que la protéine Pumilio 2 peut avoir, dans ce contexte, un impact sur le phénotype sénescent.

7.3. Potentiel prolifératif des cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif KRas

Comme précédemment, nous avons réalisé un test de prolifération sur nos cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif KRas et la protéine Pumilio 2. Nous pouvons voir que la transduction de l'oncogène KRas, dans les cellules MCF-7, entraine un arrêt quasi complet de la prolifération **[Figure III.16]**. Cette observation nous indique que la sénescence à bien était induite dans nos cellules. La transduction supplémentaire de Pumilio 2 entraine une reprise modérée de la prolifération **[Figure III.16]**, suggérant qu'une surexpression de la protéine permet aux cellules MCF-7 de contourner la sénescence et de reprendre leur prolifération.

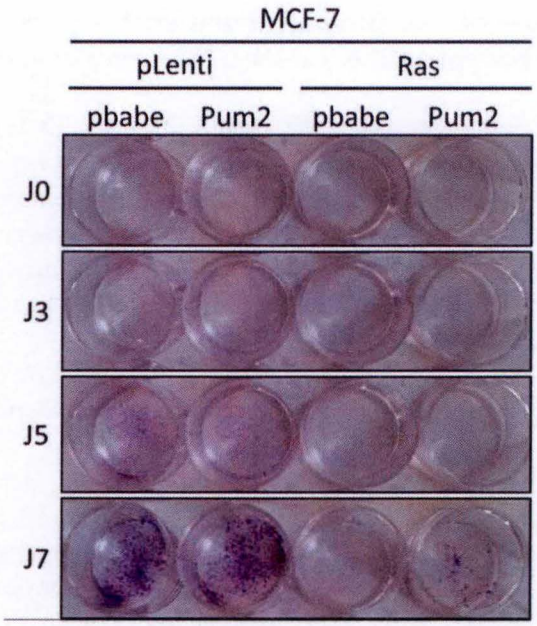


Figure III.16 : Analyse de l'influence de la protéine Pumilio 2 sur le potentiel de prolifération des cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif KRas

Les cellules ont été transduites avec le vecteur pLenti-KRas4B(G12V) ou le vecteur vide pLenti et avec le vecteur pbabe-Pumilio 2 ou le vecteur vide pbabe. A la fin de la sélection par les antibiotiques, des tests de prolifération ont été réalisé en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes »

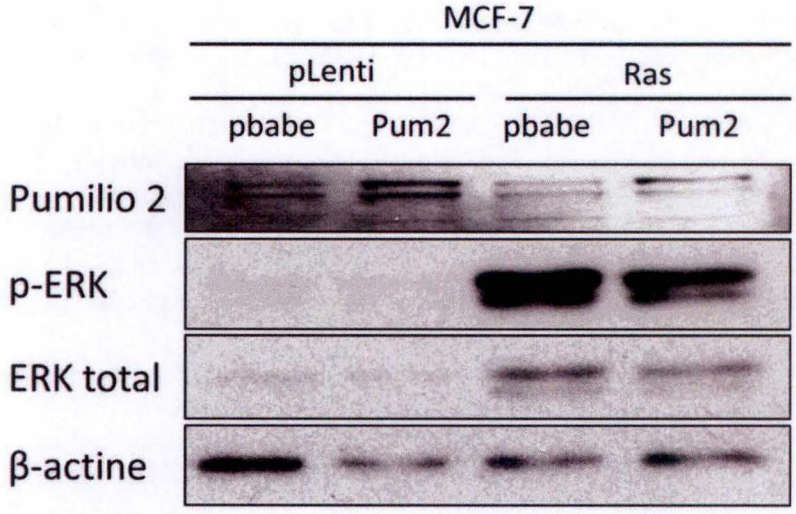


Figure III.17 : Evaluation de l'expression protéique de Pumilio 2 et analyse de son influence sur la voie des MAPK, dans des cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif KRas

Les cellules ont été transduites avec le vecteur pLenti-KRas4B(G12V) ou le vecteur vide pLenti et avec le vecteur pbabe-Pumilio 2 ou le vecteur vide pbabe. A la fin de la sélection par les antibiotiques, l'extraction protéique a été réalisée en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes » et l'expression protéique de Pumilio 2, de ERK et de sa forme phosphorylée ont été analysées par western blot. La protéine β-actine a été utilisée comme témoin de charge.

7.4. Evaluation de l'expression protéique de Pumilio 2 dans les cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif MEK DD

Comme précédemment, afin de nous assurer de sa surexpression, nous avons évalué le taux protéique de Pumilio 2 au sein des cellules MCF-7. Nous pouvons voir que les cellules transduites avec Pumilio 2 présentent bien, comme attendu, une augmentation de son expression protéique **[Figure III.17]**. De la même manière que précédemment, nous pouvons observer une diminution de la quantité de protéines Pumilio 2 dans les cellules transduites avec l'oncogène KRas **[Figure III.17]**. Ceci pourrait indiquer l'existence d'un rétrocontrôle négatif de la protéine Pumilio 2, peut-être pas la voie des MAPK.

7.5. Activation de la voie des MAPK dans les cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène constitutivement actif MEK DD

Comme précédemment, nous avons observé l'expression protéique de la protéine p-ERK. Nous pouvons voir, comme attendu, une forte augmentation de la quantité protéique de p-ERK dans les cellules transduites avec l'oncogène KRas **[Figure III.17]**, indiquant que celui-ci est bien capable de sur-activer la voie des MAPK. Lorsque les cellules sont aussi transduites avec Pumilio 2, nous pouvons voir une légère diminution de la quantité de p-ERK **[Figure III.17]**, suggérant que la protéine est potentiellement capable de réguler négativement la voie des MAPK.

Ensemble, ces résultats nous indiquent que l'oncogène KRas4B(G12V) est capable d'induire la sénescence des cellules MCF-7 et que la protéine Pumilio 2 permet aux cellules de contourner cette sénescence en régulant négativement la voie des MAPK.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

La sénescence est un mécanisme fondamental dans la régulation et la prévention de l'émergence des cancers. Celle-ci avait initialement été reliée au vieillissement des cellules mais il semblerait qu'elle soit aussi associée, depuis une vingtaine d'années, à leur protection, en empêchant l'apparition de cellules tumorales. Ce processus de sauvegarde est activé lors de l'exposition des cellules à différents stresses tels que les ultra-violets, certains produits chimiques ou encore l'activation d'oncogènes qui déclenchent l'OIS (Oncogene Induced Senescence). En association avec le système immunitaire, les cellules sénescentes sécrètent un grand nombre de cytokines (Senescence Associated Secretory Phenotype ou SASP), conduisant à leur élimination par les macrophages. Lors du processus de tumorigenèse, certains oncogènes sont activés de manière anormale ou, à l'inverse, certains gènes suppresseurs de tumeur sont inactivés. Dans ce cas, pour maintenir leur intégrité, les cellules peuvent déclencher le programme de sauvegarde qu'est la sénescence. Ce processus empêche alors les cellules altérées de proliférer et limite l'apparition de cellules transformées. Cependant, il semblerait que certaines cellules soient capables de contourner ce mécanisme de sauvegarde et de dériver, pour former des cellules tumorales. Les mécanismes par lesquelles ce contournement à lieu sont multiples et il est fondamental de mieux les identifier pour pouvoir comprendre le processus d'apparition des cancers.

Dans notre étude, nous avons décidé d'investiguer la fonction de la protéine Pumilio 2, membre de la famille des protéines PUF, comme possible régulateur de la sénescence induite par l'activation de la voie des MAPK. Il est déjà connu que l'induction de la voie des MAPK, par l'intermédiaire de la surexpression des protéines Ras, RAF ou encore MEK, peut induire la sénescence dans différentes lignées cellulaires humaines ou tumorales (*Serrano et al., 1997 ; Zhu et al., 1998*). De plus, il a déjà été montré que la protéine Pumilio 2 était un potentiel régulateur négatif de l'expression de ERK, la kinase la plus en aval de la voie des MAPK. Enfin, il a aussi été démontré, que la diminution de l'expression de ERK, dans le contexte de la sénescence, par l'utilisation d'une stratégie de shRNA, permettait de contourner la sénescence induite par l'oncogène Ras. Ce contournement, en association avec d'autres oncogènes, menait à la transformation de cellules normales *(Deschênes-Simard X et al., 2013)*. Tous ces éléments, pris ensemble, permettent de penser que, dans un contexte de sénescence induite par des oncogènes, l'expression de la protéine Pumilio 2 pourrait permettre de contourner ce phénotype de sénescence et ainsi mener vers la transformation des cellules.

Pour mener à bien notre travail, nous avons décidé d'utiliser des modèles cellulaires tumoraux d'origine histologique diverses mais tous dérivant de cellules épithéliales. En effet, la plus grande majorité des tumeurs provient de la transformation de cellules d'origine épithéliale. Ces cancers épithéliaux sont appelés carcinomes. Ici, l'utilisation des modèles U-2 OS, MCF-7 et MDA-MB-468, se justifient donc par leurs origines histologiques mais aussi par le fait que ces modèles dérivent de tumeurs faiblement transformées, c'est-à-dire, ayant une agressivité modérée. Ainsi, il a déjà été démontré qu'il était possible d'induire la sénescence dans ces différents modèles, grâce à la surexpression d'oncogènes *(Bihani et al., 2007)*.
L'utilisation de plasmides rétroviraux ou lentiviraux, codant pour des formes inductibles ou constitutivement actives des oncogènes Ras ou MEK, se justifie de par leur simplicité d'utilisation et de par leur facilité d'accès. Ceux-ci sont en effet disponibles au sein de nombreux laboratoires. Enfin, nous avons décidé d'utiliser un modèle de surexpression de la protéine Pumilio 2 pour tenter de contrebalancer l'activation de la protéine ERK par la voie des MAPK.

Tout d'abord, la plupart de nos modèles de sénescence, qu'ils soient induits par l'expression de l'oncogène Ras ou de la kinase MEK, inductibles ou constitutivement actifs, nous ont permis d'obtenir un phénotype de sénescence dans les différentes lignées cellulaires. En effet, dans les lignées U-2 OS, MCF-7, ou encore MDA-MB-468, l'expression des protéines Ras ou MEK nous a permis d'observer un phénotype, via l'apparition de différents marqueurs de la sénescence. Nous avons notamment pu voir une augmentation du nombre de cellules positives au test de SA-βgalactosidase et un arrêt de la prolifération, typiques des cellules sénescentes. De plus, l'investigation de différents marqueurs de l'arrêt du cycle cellulaire, tels que les CKI p16 ou p21, nous a permis de mettre en évidence une claire augmentation du niveau d'expression de leurs ARNm, suite à l'induction de la sénescence et en comparaison à la condition contrôle.

Trois résultats se sont cependant montrés contradictoires lors de nos expériences. Tout d'abord, l'induction de la sénescence dans les cellules MCF-7, avec la protéine MEK DD. Lors de cette expérience, nous n'avons pas pu observer de modification de la prolifération ni d'augmentation de la phosphorylation de la protéine ERK. Il pourrait s'agir d'un problème de transduction. Dans ce cas, les cellules n'auraient pas toutes intégré le plasmide. Cette hypothèse reste tout de même peu probable puisque les cellules ont été préalablement sélectionnées avec un antibiotique et que la pression de sélection a ensuite été maintenue tout au long des expériences. Il semblerait plus probable de supposer que les cellules MCF-7 présentent une ou plusieurs mutations qui empêchent l'expression de la protéine MEK et donc, l'activation de la voie des MAPK à ce niveau-là. Il est aussi possible que les cellules se soient adaptées, en réprimant l'expression de l'exogène, par l'intermédiaire de la méthylation du promoteur plasmidique. Ce phénomène peut en effet être régulièrement observé et notamment lors de l'expression de certains shRNA. Il conviendrait de répéter l'expérience pour voir si ce modèle peut être définitivement abandonné ou s'il s'agit d'une erreur expérimentale.

Le deuxième point en contradiction avec le phénotype observé, est l'expression de l'ARNm de Ki-67 dans le modèle de cellules MDA-MB-468 transduites avec l'oncogène HRas. La transcription du gène Ki-67 est normalement réprimée lors de l'arrêt de la prolifération *(Lawless et al., 2010)* et est considéré comme un bon marqueur de la sénescence. Dans notre expérience, l'expression de l'ARNm de Ki-67 augmente fortement entre la condition contrôle et la condition transduite avec l'oncogène HRas. Dans cette dernière condition, l'expression de l'ARNm de Ki-67 est en effet 3 fois supérieure, comme mesuré par qPCR. Ce résultat est contraire à nos attentes, surtout lorsqu'il est comparé au test de prolifération qui avait eu tendance à montrer un arrêt de la prolifération. Il a déjà été reporté dans la littérature que l'expression de Ki-67 pouvait augmenter malgré l'arrêt de prolifération des cellules *(van Oijen et al., 1998)*, et notamment lors de l'activation de p53 ou de p21. Or, nous avons pu observer, une augmentation de l'expression de l'ARNm de p21 concomitante avec celle de Ki-67. Il conviendrait de répéter l'expérience pour confirmer ce résultat et d'analyser l'expression de la protéine Ki-67 par western blot ou immunofluorescence.

Le dernier point de contradiction se trouve dans le modèle de cellules U-2 OS transduites avec la protéine de fusion MEK:ER. Ces cellules ont en effet montré, comme attendu, après traitement au 4-OHT, plusieurs marqueurs de la sénescence (changements morphologiques, augmentation de l'activité SA-βgalactosidase, augmentation de l'ARNm de p21 et de l'IL-8 et diminution de l'ARNm de Ki-67). Lors du test de prolifération, ces cellules n'ont cependant montré aucun signe de réduction de la prolifération. Il se pourrait que la pression du traitement au 4-OHT n'ait pas été assez importante. Pour les tests de prolifération, les cellules étaient en effet gardées en culture plusieurs jours après l'arrêt du traitement tandis que pour les autres expériences, les cellules étaient utilisées immédiatement après. Il conviendrait de recommencer les expériences en continuant de traiter les cellules au 4-OHT jusqu'à la fin des

tests de prolifération. C'est notamment ce qui a été fait avec les cellules U-2 OS transduites avec Ras:ER. Ces cellules, contrairement aux cellules U-2 OS transduites avec MEK:ER, présentent une diminution de la prolifération. Les cellules U-2 OS sont connues pour être mutées pour la protéine p16 *(Al-Mohanna et al., 2004)*. Celle-ci étant connue comme un régulateur négatif du cycle cellulaire important pour l'établissement et le maintien du processus de sénescence, nous pouvons supposer que les cellules aient pu, en l'absence de cette protéine, contourner naturellement la sénescence.

Pour surexprimer la protéine Pumilio 2 dans nos expériences, nous avons décidé d'utiliser un système rétroviral et de faire des co-transductions avec les oncogènes ou les plasmides vides associés. Nous avions décidé de contrôler le niveau de surexpression de la protéine par western blot, mais lors des premiers tests, l'anticorps n'a pu détecter la protéine ni au niveau endogène ni lors des surexpressions. La surexpression de Pumilio 2 n'a donc pas pu être validée lors des premières expériences. Après avoir recommandé un nouveau lot d'anticorps chez le même fournisseur, nous avons finalement pu valider la surexpression par immunofluorescence et par western blot, dans les derniers modèles. Il faudra bien entendu réaliser de nouveaux westerns blot pour valider la surexpression de la protéine Pumilio 2 dans les modèles où celle-ci n'a pas pu être observée pour raisons techniques. Les westerns blot réalisés avec les échantillons de nos derniers modèles nous ont cependant prouvé que le plasmide induisait bien une surexpression de Pumilio 2, quoique modérée.

Lors de l'analyse du phénotype liée à la co-transduction, dans les différents modèles cellulaires, de Pumilio 2 et des différents oncogènes utilisés, nous avons pu observer que la surexpression de Pumilio 2 pouvait, dans certains cas, modifier le pourcentage de cellules positives au test de l'activité de la β-galactosidase. Malgré les résultats plutôt positifs des tests de SA-β-galactosidase, les tests de prolifération n'ont pas montré de résultats très concluants. Les seuls modèles ayant en effet montré une reprise de la prolifération sont les cellules MDA-MB-468 et les cellules MCF-7, respectivement transduites avec les oncogènes HRas et KRas. Cependant, cette reprise de la prolifération était vraiment minime. Il est donc difficile, à ce niveau-là de conclure sur l'existence, ou non, d'un effet de la surexpression de la protéine Pumilio 2 sur le contournement la sénescence induite par les oncogènes Ras ou MEK. Dans le même temps, l'expression de certains marqueurs de la sénescence tels que p21 ou l'interleukine 8 (marqueur du SASP) semble être altérée et diminuer lors de l'induction de la sénescence en présence de Pumilio 2. Ces résultats contradictoires ne nous permettent pas de conclure définitivement sur l'effet de Pumilio 2 sur le phénotype de sénescence.
Le dernier modèle étudié nous laisse cependant entrevoir un potentiel effet de la protéine. Le test de prolifération des cellules MCF-7 transduites avec l'oncogène KRas montre en effet l'émergence de cellules dans la condition KRas/Pumilio 2, en comparaison à la condition KRas/Plpc où les cellules ne semblent pas capables de proliférer. Les tests d'activité de la β-galactosidase sont eux aussi encourageants avec l'observation d'une forte diminution du nombre de cellules positives dans la condition KRas/Pumilio en comparaison à la condition KRas/Plpc. Au final, ce modèle semble être le plus pertinent pour continuer l'étude de la protéine Pumilio 2 dans un contexte de sénescence.

Dans l'introduction, nous avions présenté la protéine Pumilio 2 comme un régulateur de la voie des MAPK, notamment via la régulation directe de l'ARNm de ERK (*Lee et al., 2007*). C'est d'ailleurs sur ces résultats que nous avions basé notre hypothèse sur la possibilité que la protéine Pumilio 2 pourrait permettre de contourner la sénescence induite par l'oncogène Ras, théorie déjà démontrée par l'utilisation de shRNA contre ERK *(Deschênes-Simard X et al., 2013)*. Lors de nos différentes expériences, nous n'avons pas observé ou observé un effet très

modéré, de la surexpression de la protéine Pumilio 2 sur le niveau protéique de ERK et de sa forme phosphorylée. Il est possible, que dans notre contexte, la protéine Pumilio 2 interagisse avec d'autres ARNm, sa cible principale ne serait alors celui de ERK. Il est aussi possible que dans le contexte d'une hyperactivation de la voie des MAPK, les différentes kinases exercent un rétrocontrôle sur la protéine Pumilio 2, notamment en la phosphorylant et en entraînant sa dégradation. De plus, les niveaux de surexpression que nous avons observés ne sont pas très important. L'utilisation d'un outil lentiviral pour surexprimer Pumilio 2 pourrait permettre de renforcer le phénotype de contournement de la sénescence en obtenant une meilleure induction de l'expression de la protéine.

Les principales perspectives de ce travail seront donc de continuer à chercher un meilleur modèle que ceux étudiés jusqu'à présent. Il semble que le vecteur lentiviral KRas soit pour l'instant le meilleur inducteur de la sénescence qui soit en notre possession et il semble judicieux de continuer à travailler avec celui-ci pour la suite de nos expériences. De plus, l'utilisation d'un vecteur lentiviral pour transduire le gène Pumilio 2 devrait être préféré par la suite. La transduction rétrovirale ne montre en effet qu'une surexpression trop limité de la protéine. Nous devrions aussi reproduire nos expériences dans des cellules non cancéreuses. L'utilisation de fibroblastes primaires comme les IMR-90 ou les WI-38 ou de cellules épithéliales non cancéreuses comme les MCF 10A pourrait permettre de faciliter l'étude de la sénescence. Ces cellules ne sont en effet pas immortalisées et ne possèdent pas de mutations génétiques susceptibles d'influencer les résultats.

Conclusion

En conclusion, nous pouvons dire qu'il est, à l'heure actuelle, impossible d'affirmer ou d'infirmer un effet de la protéine Pumilio 2 sur le phénotype sénescent induit par les oncogènes Ras ou MEK. Les résultats obtenus avec notre dernier modèle semblent tout de même suggérer un effet modéré de la protéine dans le contournement de la sénescence induite par l'oncogène KRas dans des cellules MCF-7. Le lien entre ce léger contournement de la sénescence et la régulation de la voie des MAPK par la protéine Pumilio 2 ne peut cependant pas clairement être établi.

BIBLIOGRAPHIE

A

Akella, R., Moon, T.M., and Goldsmith, E.J. (2008). Unique MAP Kinase binding sites. Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics *1784*, 48–55.

Al-Mohanna, M. a, Manogaran, P.S., Al-Mukhalafi, Z., A Al-Hussein, K., and Aboussekhra, A. (2004). The tumor suppressor p16(INK4a) gene is a regulator of apoptosis induced by ultraviolet light and cisplatin. Oncogene *23*, 201–212.

Aravinthan, A. (2015). Cellular senescence: a hitchhiker's guide. Hum. Cell *28*, 51–64.

B

Bacchetti & Graham. (1977). Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, *74*(4), 1590–1594.

Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonia, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., Sluis, B. Van De, Kirkland, J.L., and Deursen, J.M. Van (2012). Clearance of p16Ink4a -positive senescent cells delays ageing-associated disorders. Nature *479*, 232–236.

Barker, D.D., Wang, C., Moore, J., Dickinson, L.K., and Lehmann, R. (1992). Pumilio is essential for function but not for distribution of the Drosophila abdominal determinant Nanos. Genes Dev. *6*, 2312–2326.

Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V.F., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. Nature *444*, 633–637.

Baudino, T. (2015). Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. Curr. Drug Discov. Technol. *12*, 3–20.

Beard, J.R., Officer, A., Carvalho, I.A. De, and Sadana, R. (2016). The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. Lancet *387*, 2145–2154.

Bermudez, O., Jouandin, P., Rottier, J., Bourcier, C., Pagès, G., and Gimond, C. (2010). Post-transcriptional regulation of the DUSP6/MKP-3 phosphatase by MEK/ERK signaling and hypoxia. J. Cell. Physiol. *226*, 276–284.

Bernadotte, A., Mikhelson, V.M., and Spivak, I.M. (2016). Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. Aging (Albany. NY). *8*, 3–11.

Bernal, A., and Tusell, L. (2018). Telomeres: Implications for cancer development. Int. J. Mol. Sci. *19*, 1–21.

Besson, A., Dowdy, S.F., and Roberts, J.M. (2008). CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. Dev. Cell *14*, 159–169.

Bianchi-Smiraglia, A., and Nikiforov, M.A. (2012). Controversial aspects of oncogene-induced saenescence. Cell Cycle *11*, 4147–4151.

Bihani, T., Chicas, A., Lo, C. P. K., & Lin, A. W. (2007). Dissecting the senescence-like program in tumor cells activated by ras signaling. *Journal of Biological Chemistry, 282*(4), 2666–2675.

Bohn, J.A., Van Etten, J.L., Schagat, T.L., Bowman, B.M., McEachin, R.C., Freddolino, P.L., and Goldstrohm, A.C. (2018). Identification of diverse target RNAs that are functionally regulated by human pumilio proteins. Nucleic Acids Res. *46*, 362–386.

Boyle, P., and Ferlay, J. (2005). Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. Ann. Oncol. *16*, 481–488.

Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H.F.M., Schlegelberger, B., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. Nature *436*, 660–665.

Bringold, F., and Serrano, M. (2000). Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. Exp. Gerontol. *35*, 317–329.

Brondello, J.M., Prieur, A., Philipot, D., Lemaitre, J.M., Lenaers, G., Piette, J., and Dulić, V. (2012). La sénescence cellulaire: Un nouveau mythe de Janus? Medecine/Sciences *28*, 288–296.

Burton, D. G. A., & Krizhanovsky, V. (2014). Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(22), 4373–4386.

C

Cailleau, R., Olivé, M., & Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro, 14*(November), 911-915.

Campaner, S., Doni, M., Hydbring, P., Verrecchia, A., Bianchi, L., Sardella, D., Schleker, T., Perna, D., Tronnersjö, S., Murga, M., et al. (2010). Cdk2 suppresses cellular senescence induced by the c-myc oncogene. Nat. Cell Biol. *12*, 54–59.

Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. Annu Rev Physiol *75*, 685–705.

Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 729–740.

Cao, Q., Padmanabhan, K., and Richter, J.D. (2010). Pumilio 2 controls translation by competing with eIF4E for 7-methyl guanosine cap recognition. Rna *16*, 221–227.

Chagnovich, D., and Lehmann, R. (2001). Poly(A)-independent regulation of maternal hunchback translation in the Drosophila embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. *98*, 11359–11364.

Chan, V.T.W., and O'DMcGee, J. (1987). Cellular oncogenes in neoplasia. J. Clin. Pathol. *40*, 1055–1063.

Chen, Q., and Ames, B.N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *91*, 4130–4134.

Chen, Z., Gibson, T., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M. (2001). MAP Kinases. Chem. Rev. *101*, 2449–2476.

Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H., Zohar, A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Cordon-cardo, C., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. Nature *436*, 725–730.

Childs, B.G., Baker, D.J., Kirkland, J.L., Campisi, J., and van Deursen, J.M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? EMBO Rep. *15*, 1139–1153.

Chiu, V.K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J.B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson, R.L., Cox, A.D., and Philips, M.R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. Nat. Cell Biol. *4*, 343–350.

Coppé, J.P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. PLoS Biol. *6*, 2853–2868.

D

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., and Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. Nat. Protoc. *4*, 1798–1806.

Deschenes-Simard, X., Gaumont-Leclerc, M.-F., Bourdeau, V., Lessard, F., Moiseeva, O., Forest, V., Igelmann, S., Mallette, F.A., Saba-el-leil, M.K., Meloche, S., et al. (2013). Tumor suppressor activity of the ERK / MAPK pathway by promoting selective protein degradation. Genes Dev. *27*, 900–915.

Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. Oncogene *26*, 3279–3290.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 9363–9367.

Driscoll, H.E., Muraro, N.I., He, M., and Baines, R.A. (2013). Pumilio-2 Regulates Translation of Nav1.6 to Mediate Homeostasis of Membrane Excitability. J. Neurosci. *33*, 9644–9654.

Dulic, V. (2013). Senescence regulation by mTor. Methods Mol Biol., 965, 15-35.

Dubnau, J., Chiang, A.S., Grady, L., Barditch, J., Gossweiler, S., McNeil, J., Smith, P., Buldoc, F., Scott, R., Certa, U., et al. (2003). The staufen/pumilio pathway is involved in drosophila long-term memory. Curr. Biol. *13*, 286–296.

E

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol. Pathol. *35*, 495–516.

F

Felder, M., Eychène, A., Marx, M., & Calothy, G. (1994). Transduction d'oncogènes par les rétrovirus : étapes et mécanismes. *Médecine/Sciences*, *10*, 425–431.

Felsher, D.W. (2008). Oncogene addiction versus oncogene amnesia: Perhaps more than just a bad habit? Cancer Res. *68*, 3081–3086.

Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D., and Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. Eur. J. Cancer *49*, 1374–1403.

Filipovska, A., & Rackham, O. (2012). Modular recognition of nucleic acids by PUF, TALE and PPR proteins. *Molecular BioSystems*, *8*(3), 699–708.

Fiore, R., Rajman, M., Schwale, C., Bicker, S., Antoniou, A., Bruehl, C., Draguhn, A., and Schratt, G. (2014). MiR-134-dependent regulation of Pumilio-2 is necessary for homeostatic synaptic depression. EMBO J. *33*, 2231–2246.

Fisher, R., Pusztai, L., and Swanton, C. (2013). Cancer heterogeneity: Implications for targeted therapeutics. Br. J. Cancer *108*, 479–485.

Fogh, J., Trempe, G (1975). New human tumor cell lines. *Human Tumor Cells In Vitro,* 115–159.

Forbes, a, and Lehmann, R. (1998). Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of Drosophila germline stem cells. Development *125*, 679–690.

Friend, K., Campbell, Z.T., Cooke, A., Kroll-conner, P., Marvin, P., and Kimble, J. (2012). A conserved PUF/Ago/eEF1A complex attenuates translation elongation. Nat Struct Mol Biol *19*, 176–183.

G

Galgano, A., Forrer, M., Jaskiewicz, L., Kanitz, A., Zavolan, M., and Gerber, A.P. (2008). Comparative analysis of mRNA targets for human PUF-family proteins suggests extensive interaction with the miRNA regulatory system. PLoS One *3*, 1–16.

Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010). Oncogene-induced senescence: The bright and dark side of the response. Curr. Opin. Cell Biol. *22*, 816–827.

Greenman, C., Stephens, P.J., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G.R., Davies, H., Teague, J., Butler, A.P., Edkins, S., et al. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. Nature *446*, 153–158.

Grosclaude, P. (2007). De l'épidémiologie descriptive, registres et cohortes Situation française vue par les registres de population. *23*, 1–4.

H

Haling, J.R., Sudhamsu, J., Yen, I., Sideris, S., Sandoval, W., Phung, W., Bravo, B.J., Giannetti, A.M., Peck, A., Masselot, A., et al. (2014). Structure of the BRAF-MEK Complex Reveals a Kinase Activity Independent Role for BRAF in MAPK Signaling. Cancer Cell *26*, 1–12.

Hanahan, D., and Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell *144*, 646–674.

Hanahan, D., and Weinberg, R. a (2000). The Hallmarks of Cancer. Cell *100*, 57–70.

Hassan, M., Watari, H., Abualmaaty, A., Ohba, Y., and Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. Biomed Res. Int. *2014*, 1–23.

Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. *37*, 614–636.

Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. Biochemistry. (Mosc). *62*, 1180–1190

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. *25*, 585–621.

Hennig, A., Markwart, R., Esparza-Franco, M.A., Ladds, G., and Rubio, I. (2015). Ras activation revisited: Role of GEF and GAP systems. Biol. Chem. *396*, 831–848.

Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D., and Sedivy, J.M. (2006). Cellular senescence in aging primates. Science (80-.). *311*, 1257.

Hill, C. (2009). Analyse de l'augmentation de l'incidence des cancers en France. Medecine/Sciences *25*, 297–300.

Hill, C., Doyon, F., and Mousannif, A. (2009). Evolution de la mortalité par cancer en France de 1950 à 2006. L'Institut La Veill. Sanit. 1–275.

Hoos, A., Eggermont, A.M.M., Janetzki, S., Hodi, F.S., Ibrahim, R., Anderson, A., Humphrey, R., Blumenstein, B., Old, L., and Wolchok, J. (2010). Improved endpoints for cancer immunotherapy trials. J. Natl. Cancer Inst. *102*, 1388–1397.

Huang, M., Shen, A., Ding, J., and Geng, M. (2014). Molecularly targeted cancer therapy: Some lessons from the past decade. Trends Pharmacol. Sci. *35*, 41–50.

Hubbard, S.R., and Miller, W.T. (2007). Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. Curr. Opin. Cell Biol. *19*, 117–123.

Huguet, E. L., McMahon, J. A., McMahon, A. P., Bicknell, R., & Harris, A. L. (1994). Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Research*, *54*(May), 2615–2621.

J

Jenkins, H.T., Baker-Wilding, R., and Edwards, T.A. (2009). Structure and RNA binding of the mouse Pumilio-2 Puf domain. J. Struct. Biol. *167*, 271–276.

Jordan, B. (2016). Chronique génomiques « Explosion des cancers » : retour aux chiffres. Medecine/Sciences *32*, 1139–1144.

K

Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., Mcmichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., et al. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. Nature *502*, 333–339.

Kaye, J.A., Rose, N.C., Goldsworthy, B., Goga, A., and Noelle, D. (2009). A 3'UTR Pumilio binding element directs translational activation in olfactory sensory neurons. Neuron *61*, 57–70.

Kedde, M., Van Kouwenhove, M., Zwart, W., Oude Vrielink, J.A.F., Elkon, R., and Agami, R. (2010). A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3'2 UTR controls miR-221 and miR-222 accessibility. Nat. Cell Biol. *12*, 1014–1020.

Kim, W.Y., and Sharpless, N.E. (2006). The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. Cell *127*, 265–275.

Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R.A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., and Lowe, S.W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. Cell *134*, 657–667.

Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. Proc. Natl. Acad. Sci. *98*, 12072–12077.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2008). Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. Cell *133*, 1019–1031.

Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated beta-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. J. Cell Sci. *113*, 3613–3622.

L

Lavoie, H., and Therrien, M. (2015). Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *16*, 281–298.

Lawless, C., Wang, C., Jurk, D., Merz, A., Zglinicki, T. von, & Passos, J.F. (2010). Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Experimental Gerontology, 45*(10), 772–778.

Lee, A.C., Fenster, B.E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N.S., Hirai, T., Yu, Z., Ferrans, V.J., Howard, B.H., Chem, J.B., et al. (1999). Ras Proteins Induce Senescence by Altering the Intracellular Levels of Reactive Oxygen Species. J. Biol. Chem. *274*, 7936–7940.

Lee, E.Y.H.P., and Muller, W.J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*, 1–18.

Lee, M.H., Hook, B., Pan, G., Kershner, A.M., Merritt, C., Seydoux, G., Thomson, J.A., Wickens, M., and Kimble, J. (2007). Conserved regulation of MAP kinase expression by PUF RNA-binding proteins. PLoS Genet. *3*, 2540–2550.

Lehmann, R., and Nusslein-Volhard, C. (1987). Involvment of the pumilio gene in the transport of an abdominal signal in the Drosophila embryo. Nature *329*, 167–170.

Lemmon, M. a, and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor-tyrosine kinases Mark. Cell *141*, 1117–1134.

Li, E., and Hristova, K. (2006). Role of receptor tyrosine kinase transmembrane domains in cell signaling and human pathologies. Biochemistry *45*, 6241–6251.

Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., Van Aelst, L., Serrano, M., and Lowe, S.W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. Genes Dev. *12*, 3008–3019.

Lin, H., and Spradling, A. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the Drosophila ovary. Development *124*, 2463–2476.

Liu, D., and Hornsby, P.J. (2007). Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. Cancer Res. *67*, 3117–3126..

Lu, G., and Hall, T.M.T. (2011). Alternate modes of cognate RNA recognition by human PUMILIO proteins. Structure *19*, 361–367.

M

Maik-Rachline, G., and Seger, R. (2016). The ERK cascade inhibitors: Towards overcoming resistance. Drug Resist. Updat. *25*, 1–12.

Margolis, B., and Skolnik, E.Y. (1994). Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. J. Am. Soc. Nephrol. *5*, 1288–1299.

Marrero, E., Rossi, S.G., Darr, A., Tsoulfas, P., and Rotundo, R.L. (2011). Translational regulation of acetylcholinesterase by the RNA-binding protein pumilio-2 at the neuromuscular synapse. J. Biol. Chem. *286*, 36492–36499.
Maurer, G., Tarkowski, B., and Baccarini, M. (2011). Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. Oncogene *30*, 3477–3488.

Mccubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2007). Roles Of The RAS/MEK/ERK pathway in Cell Growth, Malignant Transformation and Drug Resistance. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. *1773*, 1263–1284.

McGranahan, N., and Swanton, C. (2015). Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. Cancer Cell *27*, 15–26.

Melk, A., Kittikowit, W., Sandhu, I., Halloran, K.M., Grimm, P., Schmidt, B.M.W., and Halloran, P.F. (2003). Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. Kidney Int. *63*, 2134–2143.

Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., Van Der Horst, C.M.A.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature *436*, 720–724.

Miles, W.O., Tschöp, K., Herr, A., Ji, J.Y., and Dyson, N.J. (2012). Pumilio facilitates miRNA regulation of the E2F3 oncogene. Genes Dev. *26*, 356–368.

Miron, K., Golan-Lev, T., Dvir, R., Ben-David, E., and Kerem, B. (2015). Oncogenes create a unique landscape of fragile sites. Nat. Commun. *6*, 1–7.

Moiseeva, O., Mallette, F.A., Mukhopadhyay, U.K., Moores, A., and Ferbeyre, G. (2006). DNA Damage Signaling and p53-dependent Senescence after Prolonged β-Interferon Stimulation. Mol. Biol. Cell *17*, 1583–1592.

Morris, L.G.T., and Chan, T.A. (2015). Therapeutic Targeting of Tumor Suppressor Genes. Cancer *121*, 1357–1368.

Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., et al. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. Cell *155*, 1104–1118.

Muntoni, A., and Reddel, R.R. (2005). The first molecular details of ALT in human tumor cells. Hum. Mol. Genet. *14*, 191–196.

Muraro, N.I., Weston, A.J., Gerber, A.P., Luschnig, S., Moffat, K.G., and Baines, R.A. (2008). Pumilio Binds para mRNA and Requires Nanos and Brat to Regulate Sodium Current in Drosophila Motoneurons. J. Neurosci. *28*, 2099–2109.

Murata, Y., and Wharton, R.P. (1995). Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in drosophila embryos. Cell *80*, 747–756.

N

Narita, M. (2010). Quality and quantity control of proteins in senescence. Aging, 2(5), 311–314.

Naudin, C., Hattabi, A., Michelet, F., Miri-Nezhad, A., Benyoucef, A., Pflumio, F., Guillonneau, F., Fichelson, S., Vigon, I., Dusanter-Fourt, I., et al. (2017). PUMILIO/FOXP1 signaling drives expansion of hematopoietic stem/progenitor and leukemia cells. Blood *129*, 2493–2506.

Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., De Mestier, L., Cros, J., Faivre, S., & Raymond, E. (2014). MEK in cancer and cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, *141*(2), 160–171.

Nichols, W. W., Murphy, D., Cristofalo, V. J., Toji, L. H., Greene, A. E., & Dwight, S. A. (1977). Characterization of a New Human Diploid Cell Strain, IMR-90. *Science*, *196*, 60–63.

Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. Science (80-.). *194*, 23–28.

O

Ogrunc, M., Di Micco, R., Liontos, M., Bombardelli, L., Mione, M., Fumagalli, M., Gorgoulis, V.G., and D'Adda Di Fagagna, F. (2014). Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation. Cell Death Differ. *21*, 998–1012.

Olivieri, F., Recchioni, R., Marcheselli, F., Abbatecola, A.M., Santini, G., Borghetti, G., Antonicelli, R., and Procopio, D.A. (2013). Cellular Senescence in Cardiovascular Diseases: Potential Age-Related Mechanisms and Implications for Treatment. Curr. Pharm. Des. *19*, 1710–1719.

Ortega-molina, A., and Serrano, M. (2013). PTEN in cancer, metabolism and aging. Trends Endocrinol Metab. *24*, 1–11.

Osborne, C.K., Hobbs, K., and Clark, G.M. (1985). Effect of Estrogens and Antiestrogens on Growth of Human Breast Cancer Cells in Athymic Nude Mice. Cancer Res. *45*, 584–590.

P

Padmanabhan, K., and Richter, J.D. (2006). Regulated Pumilio-2 binding controls RINGO/Spy mRNA translation and CPEB activation. Genes Dev. *20*, 199–209.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune Slide checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. *12*, 252–264.

Parisi, M., and Lin, H. (2000). Translational repression: a duet of Nanos and Pumilio. Curr. Biol. *10*, 81–83.

Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., & Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Cell Biology*, *90*(September), 8392–8396.

Ponten, J., Saksela, E. (1967). Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *Int. J. Cancer, 2,* 434-447.

Q

Quenault, T., Lithgow, T., and Traven, A. (2011). PUF proteins: Repression, activation and mRNA localization. Trends Cell Biol. *21*, 104–112.

R

Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M., and Matrisian, L.M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. Cancer Res. *74*, 2913–2921.

Rayess, H., Wang, M.B., and Sritvatsan, E.S. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. Int. J. Cancer *130*, 1715–1725.

Regad, T. (2015). Targeting RTK signaling pathways in cancer. Cancers (Basel). *7*, 1758–1784.

Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. J. Cell Biol. *192*, 547–556.

Roskoski, R. (2010). RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *399*, 313–317.

S

Salazar, A.M., Silverman, E.J., Menon, K.P., and Zinn, K. (2010). Regulation of synaptic Pumilio function by an aggregation-prone domain. J. Neurosci. *30*, 515–522.

Schäfer, R., and Sers, C. (2011). RAS oncogene-mediated deregulation of the transcriptome: From molecular signature to function. Adv. Enzyme Regul. *51*, 126–136.

Schefe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T., & Funke-Kaiser, H. (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's Ct difference" formula. *Journal of Molecular Medicine*, *84*(11), 901–910.

Seluanov, A., Gorbunova, V., Falcovitz, A., Milyavsky, M., Zurer, I., Shohat, G., Sigal, A., Goldfinger, N., and Rotter, V. (2001). Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. Mol. Cell. Biol. *21*, 1552–1564.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D.H., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). Cell *88*, 593–602.

Shigunov, P., Sotelo-Silveira, J., Kuligovski, C., de Aguiar, A.M., Rebelatto, C.K., Moutinho, J.A., Brofman, P.S., Krieger, M.A., Goldenberg, S., Munroe, D., et al. (2012). PUMILIO-2 Is Involved in the Positive Regulation of Cellular Proliferation in Human Adipose-Derived Stem Cells. Stem Cells Dev. *21*, 217–227.

Shin, J., Yang, J., Lee, J.C., and Baek, K.H. (2013). Depletion of ERK2 but not ERK1 abrogates oncogenic Ras-induced senescence. Cell. Signal. *25*, 2540–2547.

Shortt, J., and Johnstone, R.W. (2012). Oncogenes in cell survival and cell death. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *4*, 1–10.

Siemen, H., Colas, D., Heller, H.C., Brustle, O., and Pera, R.A.R. (2011). Pumilio-2 Function in the Mouse Nervous System Henrike. Curr. Sci. *6*, 1–14.

Soule, H. D., Vazguez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J Natl Cancer Inst, 51(November), 1409-1416.

Suh, N., Crittenden, S.L., Goldstrohm, A., Hook, B., Thompson, B., Wickens, M., and Kimble, J. (2009). FBF and its dual control of gld-1 expression in the Caenorhabditis elegans germline. Genetics *181*, 1249–1260.

Sun, Y., Liu, W.Z., Liu, T., Feng, X., Yang, N., and Zhou, H.F. (2015). Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. J. Recept. Signal Transduct. *35*, 600–604.

T

Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., et al. (2002). P53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. Nature *415*, 45–53.

U

Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Vinals, F., and Capella, G. (2010). Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. Curr. Pharm. Des. *16*, 3–10.

V

Van Etten, J., Schagat, T.L., Hrit, J., Weidmann, C.A., Brumbaugh, J., Coon, J.J., and Goldstrohm, A.C. (2012). Human pumilio proteins recruit multiple deadenylases to efficiently repress messenger RNAs. J. Biol. Chem. *287*, 36370–36383.

Van Heemst, D., den Reijer, P.M., and Westendorp, R.G.J. (2007). Ageing or cancer: A review. On the role of caretakers and gatekeepers. Eur. J. Cancer *43*, 2144–2152.

Van Oijen, M.G., Medema, R.H, Slootweg, P.J, Rijksen, G. (1998). Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol.* 110(1):24-31.

Vessey, J.P., Schoderboeck, L., Gingl, E., Luzi, E., Riefler, J., Di Leva, F., Karra, D., Thomas, S., Kiebler, M.A., and Macchi, P. (2010). Mammalian Pumilio 2 regulates dendrite morphogenesis and synaptic function. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 3222–3227.

Vessey, J.P., Vaccani, A., Xie, Y., Dahm, R., Karra, D., Kiebler, M.A., and Macchi, P. (2006). Dendritic Localization of the Translational Repressor Pumilio 2 and Its Contribution to Dendritic Stress Granules. J. Neurosci. *26*, 6496–6508.

Vinay, D.S., Ryan, E.P., Pawelec, G., Talib, W.H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W.K., Whelan, R.L., Kumara, H.M.C.S., et al. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. Semin. Cancer Biol. *35*, S185–S198.

Virginia Boccardi, Luca Pelini, Sara Ercolani, Carmelinda Ruggiero, P.M. (2015). From cellular senescence to Alzheimer's disease: The role of telomere shortening. Ageing Res. Rev. *22*, 1–8.

Von Zglinicki, T. (2001). Telomeres and replicative senescence: Is it only length that counts? Cancer Lett. *168*, 111–116.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L. a, and Kinzler, K.W. (2013). Cancer Genome Lanscapes. Science (80-.). *339*, 1546–1558.

W

Wajapeyee, N., Serra, R.W., Zhu, X., Mahalingam, M., and Green, M.R. (2008). Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. Cell *132*, 363–374.

Wang, H.N., Xu, Y., Tao, L.J., Zhou, J., Qiu, M.X., Teng, Y.H., and Deng, F.J. (2012). Identification and characterization of the pumilio-2 expressed in zebrafish embryos and adult tissues. Mol. Biol. Rep. *39*, 2811–2819.

Wang, M., Ogé, L., Perez-Garcia, M.D., Hamama, L., and Sakr, S. (2018). The PUF protein family: Overview on PUF RNA targets, biological functions, and post transcriptional regulation. Int. J. Mol. Sci. *19*, 1–13.

Wang, X., McLachlan, J., Zamore, P.D., and Hall, T.M.T. (2002). Modular recognition of RNA by a human Pumilio-homology domain. Cell *110*, 501–512.

Weinstein, I.B., and Joe, A. (2008). Oncogene addiction. Cancer Res. *68*, 3077–3080.

Whelan, J.T., Hollis, S.E., Cha, D.S., Asch, A.S., and Lee, M.H. (2012). Post-transcriptional regulation of the Ras-ERK/MAPK signaling pathway. J. Cell. Physiol. *227*, 1235–1241.

White, E.K., Moore-Jarrett, T., and Ruley, H.E. (2001). PUM2, a novel murine puf protein, and its consensus RNA-binding site. Rna *7*, 1855–1866.

Wickens, M., Bernstein, D.S., Kimble, J., and Parker, R. (2002). A PUF family portrait: 3′UTR regulation as a way of life. Trends Genet. *18*, 150–157.

Wreden, C., Verrotti, a C., Schisa, J. a, Lieberfarb, M.E., and Strickland, S. (1997). Nanos and pumilio establish embryonic polarity in Drosophila by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. Development *124*, 3015–3023.

Wu, X.L., Huang, H., Huang, Y.Y., Yuan, J.X., Zhou, X., and Chen, Y.M. (2015). Reduced Pumilio-2 expression in patients with temporal lobe epilepsy and in the lithium-pilocarpine induced epilepsy rat model. Epilepsy Behav. *50*, 31–39.

X

Xu, E.Y., Chang, R., Salmon, N.A., and Pera, R.A.R. (2007). A Gene Trap Mutation of a Murine Homolog of the Drosophila Stem Cell Factor Pumilio Results in Smaller Testes But Does Not Affect Litter Size or Fertility. Mol. Reprod. Dev. *74*, 912–921.

Z

Zamore, P.D., Bartel, D.P., Lehmann, R., and Williamson, J.R. (1999). The PUMILIO–RNA Interaction: A Single RNA-Binding Domain Monomer Recognizes a Bipartite Target Sequence. Biochemistry *38*, 596–604.

Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., and Bishop, J.M. (1998). Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. Genes Dev. *12*, 2997–3007.

Zoghbi, H.Y., and Orr, H.T. (2000). Glutamine Repeats and Neurodegeneration. Annu. Rev. Neurosci. *23*, 217–247.

Zilfou, J.T., and Lowe, S.W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *1*, 1–12.