



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Etude des effets de l'hypoxie sur l'apoptose induite par le taxol ou l'épirubicine dans des cellules du cancer du sein : rôle du facteur de transcription HIF-1

Notte, Annick

*Award date:*  
2009

[Link to publication](#)

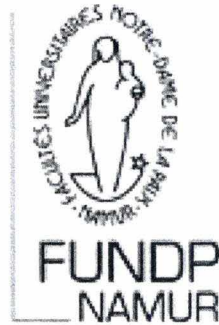
#### General rights

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

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

#### Take down policy

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



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

**Faculté des Sciences**

**Etude des effets de l'hypoxie sur l'apoptose induite par le taxol ou  
l'épirubicine dans des cellules du cancer du sein : rôle du facteur de  
transcription HIF-1**

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

Annick NOTTE

Janvier 2009

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
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@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Etude des effets de l'hypoxie sur l'apoptose induite par le taxol ou  
l'épirubicine dans des cellules du cancer du sein : rôle du facteur de  
transcription HIF-1.**

NOTTE Annick

Résumé

Suite à l'adoption du mode de vie occidental, à la croissance et au vieillissement de la population mondiale, le cancer devient une des causes principales de mortalité dans le monde entier. Il est donc fondamental de comprendre pourquoi et comment un cancer se développe afin de mettre au point de nouveaux traitements plus performants et plus appropriés. En effet, les traitements fournis aux patients ne sont pas toujours efficaces pour éliminer complètement les cellules tumorales et des phénomènes de résistance sont fréquemment observés. De nombreuses études ont déjà montré que la résistance des cellules cancéreuses est corrélée avec la présence d'un environnement hypoxique au sein des tumeurs.

Le principal facteur de transcription activé en hypoxie est appelé HIF-1 (hypoxia-inducible-factor). Ce facteur de transcription permet non seulement aux cellules cancéreuses de s'adapter à l'hypoxie mais également de résister à l'apoptose induite par certains agents chimiothérapeutiques. Cette résistance est rendue possible grâce à l'action de HIF-1 qui favorise la survie et la prolifération cellulaire en régulant l'expression d'une série de gènes impliqués dans divers processus permettant aux cellules tumorales d'échapper à l'apoptose et de former des métastases.

Au cours de ce travail, nous avons étudié les effets de l'hypoxie sur l'apoptose induite par le taxol ou l'épirubicine dans les cellules MDA-MB-231, issues d'un cancer du sein métastatique. Dans un premier temps, nous avons montré que l'hypoxie protège les cellules MDA-MB-231 de l'apoptose induite par le taxol. Nous avons ensuite étudié les variations d'expression de certains membres de la famille Bcl-2 afin de comprendre les mécanismes impliqués dans cette protection et afin d'investiguer un éventuel rôle de ces membres dans la protection apportée par l'hypoxie. Nous avons également étudié l'activité de HIF-1, dans les différentes conditions expérimentales, afin de savoir si HIF-1 est impliqué dans la protection. Les résultats obtenus n'ont pas exclu cette hypothèse et nous avons donc étudié les effets de l'inhibition de HIF-1, à l'aide de siRNA anti-HIF-1 $\alpha$ , sur l'apoptose induite par le taxol et l'épirubicine. Cette expérience nous a permis de confirmer que HIF-1 est en partie responsable de la protection, induite par l'hypoxie, face à l'apoptose induite par le taxol dans les cellules MDA-MB-231. Nous avons finalement étudié les effets de l'inhibition de HIF-1 à l'aide de siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  sur l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose. L'ensemble de ces résultats indique que HIF-1 est un acteur central de l'induction de la résistance des cellules cancéreuses aux agents utilisés en chimiothérapie.

Mémoire de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2009

**Promoteur:** Carine Michiels

## REMERCIEMENTS

---

Voici le moment de remercier tous ceux qui m'ont aidée et soutenue durant ce mémoire.

Tout d'abord, je remercie Mme Raes ainsi que l'URBC de manière générale pour m'avoir permis d'effectuer mon mémoire et toutes les manipulations intéressantes dans ce laboratoire. Ce mémoire m'a permis d'acquérir de la pratique dans le milieu de la recherche et m'a également appris à persévérer.

Je tiens à remercier Carine Michiels, ma promotrice, pour son aide précieuse, son soutien et ses corrections rapides.

Un tout grand merci également à Liounel qui m'a vraiment bien conseillée tout au long de mon mémoire. Merci pour ton aide quand j'en avais besoin, pour les réponses à mes questions, pour les chouettes moments passés au labo en ta compagnie et pour ta patience...

Merci aussi à l'équipe HIF et à tous les chercheurs du labo qui m'ont aidée de près ou de loin durant ce mémoire et qui m'ont permis de passer de bons moments dans le labo. Particulièrement merci à Emilie, Kayleen, Guillaume Gromollard, Guigui, Benoît ainsi qu'à Luc, le bricoleur pour ses discussions interminables.

Merci également à tous les techniciens pour leurs conseils surtout à Edouard et sa sagesse légendaire !

Enfin merci à tous les mémorants avec lesquels j'ai passé une excellente année qui restera gravée dans ma mémoire. Que de bons moments passés ensemble au bureau! Merci à Alex et Jérémy qui sont devenus inséparables, à mamy, à miniSeb et à PépitBoy. Merci à tous pour votre bonne humeur contagieuse !

The last but not the least, un tout grand merci à mes parents et ma famille, surtout à ma tante préférée, maman et Mélanie.

Annick alias Nicknick...

## ABREVIATIONS

---

(t)Bid	(troncated)BH3 interacting domain death agonist
ABC	ATP-binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AHR	Aryl hydrocarbon receptor
AIF	Apoptosis inducing factor
AMP	Adénosine monophosphate
ANT	Adenine nucleotide translocase
AP-1	Activator protein 1
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
ARN	Acide ribonucléique
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATF	Activating transcription factor
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xl	Basal cell lymphoma-extra large
Bcl-xs	Basal cell lymphoma-extra small
BER	Bbase-excision repair
BH	Bcl-2 homology domain
BHLH-PAS	Basic-helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim homology
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
BIR	Baculovirus IAP Repeat
Bnip3	Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
Bok	Bcl-2-related ovarian killer
BRCA1	Breast cancer 1
Brcp	Breast cancer resistance protein
CARD	Caspase activation and recrutement domain
CBP	Creb binding protein
Chk	Checkpoint homolog
CSF	Colony-stimulating factors
CXCR4	CXC chemokine receptor
DD	Death domain
DED	Death effector domain

## ABREVIATIONS

DISC	Death Inducing Signaling Complex
DLC1/LC8	Dyneine light chain1/light chain8
EGF	Epidermal growth factor
Endo G	Endonuclease G
EPO	Erythropoïétine
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
FADD	Fas-associated death domain
FIH-1	Factor inhibiting HIF
FLIP	FLICE-inhibitory protein
GLUT	Glucose transporter
HAT	Histone acetyl transferase
HBS	HIF-1 DNA binding site
HDM2	Human double minute 2
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HRE	HIF-1 responsive element
HUVEC	Human umbilical vascular endothelial cells
IAP	Inhibitor of apoptosis
ICAD	Inhibitor of caspase-activated DNase
IGF	Insulin-like growth factor
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL	Interleukine
JNK	c-Jun N-terminal kinases
kDA	kiloDalton
LOX	Lysyl oxydase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MDR	Multidrug resistance
MMR	Mismatch repair
MRP	Multidrug resistance-associated protein
mTor	Mammalian target of rapamycin
NER	Nucleotide-excision repair
NF $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLS	Nuclear localisation signal
NOS	Nitric oxyde synthase
ODDD	Oxygen dependent degradation domain
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PDGF	Platelet derived growth factor
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase
Pgp	P-glycoprotein
PHD	Proline hydroxylase

## ABBREVIATIONS

---

PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
PIDD	p53-induced protein with a death domain
PTP	Permeability transition pore
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
Pvhl	von Hippel-Lindau protein
RAIDD	(RIP)-associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain
RIP	Receptor-interacting kinase
ROS	Reactive oxygen species
SCF	Stem cell factor
SDF-1	Stroma cell derived factor-1
ser	sérine
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SOD	Superoxyde dismutase
SODD	Silencer of death domain
SRC-1	Steroid receptor coactivator-1
TAD	Transactivation domain
TM	Transmembrane
TNFR	Tumor necrosis factors receptor
TRADD	TNF receptor-associated via death domain
TRAF2	TNF receptor-associated factro 2
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
VDAC	Voltage-dependent anion channel
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

# TABLE DES MATIERES

## I. Introduction

---

<b>1. Le cancer</b> .....	<b>1</b>
1.1. Origine des cancers .....	1
1.2. Cancer du sein .....	2
<b>2. Les différents processus de mort cellulaire</b> .....	<b>3</b>
2.1. L'apoptose .....	4
2.1.1. Les caspases .....	4
2.1.2. La voie extrinsèque .....	5
2.1.3. La voie intrinsèque .....	6
2.1.4. Interaction entre les voies extrinsèque et intrinsèque .....	11
2.1.5. Cancer et apoptose .....	11
<b>3. L'hypoxie</b> .....	<b>11</b>
3.1. L'oxygène et l'hypoxie dans les cellules .....	11
3.2. Réponse systémique .....	12
3.3. Réponse cellulaire .....	12
3.4. Le facteur de transcription HIF-1 .....	12
3.4.1. Structure de HIF-1 $\alpha$ .....	13
3.4.2. Structure de ARNT .....	13
3.4.3. Régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 par l'oxygène .....	13
3.4.4. Régulation de HIF-1 indépendante de l'oxygène .....	14
3.5. Adaptation cellulaire à l'hypoxie .....	15
3.5.1. Métabolisme du glucose .....	15
3.5.2. Oxygénation des tissus .....	16
3.5.3. Néoangiogenèse .....	16
<b>4. Cancer et hypoxie</b> .....	<b>16</b>
4.1. Néoangiogenèse .....	17
4.2. Métastases .....	17
4.3. MDR (Multidrug resistance) .....	17
4.4. L'hypoxie et l'apoptose .....	18
4.4.1. HIF-1 pro-apoptotique .....	18

4.4.2. HIF-1 anti-apoptotique .....	18
4.5. Implication d'autres facteurs de transcription.....	18
4.5.1. NFκB .....	19
4.5.2. AP-1.....	19
<b>5. Objectifs .....</b>	<b>20</b>

## **II. Matériel et méthodes**

---

<b>1. Culture cellulaire.....</b>	<b>22</b>
1.1. Type cellulaire .....	22
1.2. Maintien des cultures et repiquage cellulaire.....	22
1.2.1. Matériel.....	22
1.2.2. Méthode.....	22
<b>2. Incubation en hypoxie.....</b>	<b>22</b>
2.1. Matériel.....	22
2.2. Méthode.....	22
<b>3. Extraction protéique totale.....</b>	<b>22</b>
3.1. Matériel.....	22
3.2. Méthode.....	22
<b>4. Fractionnement cellulaire par centrifugations différentielles .....</b>	<b>23</b>
4.1. Principe .....	23
4.2. Matériel.....	23
4.3. Méthode.....	23
<b>5. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford.....</b>	<b>24</b>
5.1. Matériel.....	24
5.2. Méthode.....	24
<b>6. Western Blotting.....</b>	<b>24</b>
6.1. Principe .....	24
6.2. Préparation des extraits .....	25
6.3. Migration (Gel Tris-Glycine).....	25
6.3.1. Matériel.....	25
6.3.2. Méthode.....	25
6.4. Transfert.....	25
6.4.1. Matériel.....	25
6.4.2. Méthode.....	25

6.5. Blocking et Révélation.....	26
6.5.1. Matériel.....	26
6.5.2. Méthode.....	26
<b>7. Dosage de l'activité caspase 3.....</b>	<b>26</b>
7.1. Principe.....	26
7.2. Matériel.....	26
7.3. Méthode.....	26
<b>8. Marquage en immunofluorescence.....</b>	<b>27</b>
8.1. Principe.....	27
8.2. Matériel.....	27
8.3. Méthode.....	27
<b>9. Mesure de la liaison à l'ADN (Trans-AM).....</b>	<b>28</b>
9.1. Principe.....	28
9.2. L'extraction nucléaire.....	28
9.2.1. Matériel.....	28
9.2.2. Méthode.....	28
9.3. Dosage colorimétrique.....	29
9.3.1. Matériel.....	29
9.3.2. Méthode.....	29
<b>10. Système rapporteur.....</b>	<b>29</b>
10.1. Principe.....	29
10.2. Matériel.....	30
10.3. Méthode.....	30
10.4. Révélation.....	30
<b>11. Transfection de siRNA.....</b>	<b>31</b>
11.1. Principe.....	31
11.2. Matériel.....	31
11.3. Méthode.....	31
<b>12. Extraction d'ARN total.....</b>	<b>31</b>
12.1. Matériel.....	31
12.2. Méthode.....	31
12.2.1. Dosage.....	31
<b>13. Transcription inverse.....</b>	<b>32</b>

13.1.	Principe .....	32
13.2.	Matériel .....	32
13.3.	Méthode.....	32
<b>14.</b>	<b>PCR en temps réel.....</b>	<b>32</b>
14.1.	Principe .....	32
14.2.	Matériel .....	33
14.3.	Méthode.....	33
14.4.	Analyse des résultats .....	33
<b>15.</b>	<b>Cartes microfluidiques.....</b>	<b>33</b>
15.1.	Principe .....	33
15.2.	Matériel .....	34
15.2.1.	Pour l'extraction d'ARNm .....	34
15.2.2.	Pour la transcription inverse .....	34
15.2.3.	Pour la PCR en temps réel (cartes microfluidiques).....	34
15.3.	Méthode.....	34
15.3.1.	Extraction d'ARN total.....	34
15.3.2.	Transcription inverse .....	34
15.3.3.	Cartes microfluidiques.....	34

### **III. Résultats**

---

<b>Partie I :</b>	<b>Effets de l'hypoxie sur l'apoptose induite par le taxol ou l'épirubicine .....</b>	<b>35</b>
<b>1.</b>	<b>Mesure de l'activité de la caspase 3 .....</b>	<b>35</b>
1.1.	Description de l'expérience .....	35
1.2.	Analyse des résultats.....	35
<b>Partie II :</b>	<b>Effets de l'hypoxie et des agents chimiothérapeutiques sur l'expression de certains membres de la famille Bcl-2 .....</b>	<b>35</b>
<b>1.</b>	<b>Description de l'expérience.....</b>	<b>36</b>
<b>2.</b>	<b>Analyse des résultats .....</b>	<b>36</b>
2.1.	Bax et Bak.....	36
2.2.	Mcl-1.....	37
2.3.	Bim.....	37
2.4.	Bnip3.....	38
2.5.	Conclusion .....	39

<b>Partie III : Etude du rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la protection apportée par l'hypoxie .....</b>	<b>40</b>
<b>1. Effets de l'hypoxie et des agents chimiothérapeutiques sur l'activité de HIF-1 .....</b>	<b>40</b>
1.1. Etude de l'expression protéique de HIF-1 $\alpha$ .....	40
1.1.1. Description de l'expérience .....	40
1.1.2. Analyse des résultats.....	40
1.2. Etude de l'expression de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$ .....	41
1.2.1. Description de l'expérience .....	41
1.2.2. Analyse des résultats.....	41
1.3. Etude de l'activité de liaison à l'ADN de HIF-1.....	41
1.3.1. Description de l'expérience .....	41
1.3.2. Analyse des résultats.....	41
1.4. Etude de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 .....	41
1.4.1. Description de l'expérience .....	42
1.4.2. Analyse des résultats.....	42
1.5. Conclusion .....	42
<b>2. Effets des siRNA anti-HIF-1<math>\alpha</math> sur l'apoptose induite par le taxol ou l'épirubicine .</b>	<b>43</b>
2.1. Bref rappel du principe de fonctionnement des siRNA .....	43
2.2. Mise au point.....	43
2.2.1. Effet du siRNA anti-HIF-1 $\alpha$ sur l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$ .....	43
2.2.2. Effet du siRNA anti-HIF-1 $\alpha$ sur l'abondance de son ARNm et de l'ARNm de HIF-2 $\alpha$ et de Bnip3.....	44
2.2.3. Conclusion .....	45
2.3. Dosage de l'activité caspase 3 .....	45
2.3.1. Description de l'expérience .....	45
2.3.2. Analyse des résultats.....	45
<b>Partie IV : Etude de l'effet de l'inhibition de HIF-1 sur l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose.....</b>	<b>46</b>
<b>1. Les cartes microfluidiques.....</b>	<b>46</b>
1.1. Description de l'expérience .....	47
1.2. Analyse des résultats.....	47
1.2.1. Gènes dont l'expression est régulée par HIF-1.....	47
<b>2. Confirmation des résultats par PCR en temps réel.....</b>	<b>48</b>

## **IV. Discussion, conclusions et perspectives**

---

<b>1. Partie I : Effets de l'hypoxie sur l'apoptose induite par le taxol ou l'épirubicine ....</b>	<b>50</b>
<b>2. Partie II : Effets de l'hypoxie et des agents chimiothérapeutiques sur l'expression de certains membres de la famille Bcl-2 .....</b>	<b>50</b>
<b>3. Partie III : Etude du rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la protection apportée par l'hypoxie .....</b>	<b>53</b>
3.1. Effets de l'hypoxie et des agents chimiothérapeutiques sur l'activité de HIF-1 .....	53
3.2. Effets des siRNA anti-HIF-1 $\alpha$ sur l'apoptose induite par le taxol ou l'épirubicine..	55
<b>4. Partie IV : Etude de l'effet de l'inhibition de HIF-1 sur l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose .....</b>	<b>55</b>
4.1. Protéines dont le profil d'expression favorise la survie ou la mort cellulaire .....	55
4.2. Protéines dont le profil d'expression favorise la survie cellulaire .....	56
4.3. Protéines dont l'expression favorise la mort cellulaire .....	57
4.4. Perspectives.....	57
<b>5. Conclusion générale .....</b>	<b>58</b>

## **I. INTRODUCTION**

### **1. Le cancer**

Le cancer est une des causes principales de mortalité dans le monde entier et représente un réel problème de santé publique. Les derniers chiffres disponibles provenant du Centre international de recherches sur le cancer (Circ) se rapportent à l'année 2002. En 2002, le nombre de nouveaux cas de cancer en un an (l'incidence) a été estimé à 10,9 millions (5,8 pour les hommes et 5,1 pour les femmes), le nombre de décès dus au cancer a été estimé à 6,7 millions (3,8 pour les hommes et 2,9 pour les femmes) et plus de 25 millions de personnes vivant avec un cancer cinq ans après le diagnostic ont été dénombrées. Les principaux nouveaux cas de cancer sont les cancers du poumon (1,3 million), les cancers du sein (1,15 million) et les cancers colorectaux (1 million).

Chez les hommes, le cancer du poumon est le cancer présentant l'incidence la plus élevée avec 965 000 nouveaux cas par an et le taux de mortalité le plus important avec 848 000 décès.

Chez les femmes, c'est le cancer du sein qui est au premier rang, à la fois en terme d'incidence, avec 1 151 000 nouveaux cas par an, et de mortalité avec 411 000 décès par an. Le cancer du sein est également le cancer présentant la prévalence la plus élevée avec 4,4 millions de survivants cinq ans après le diagnostic. Les trois grands facteurs avancés pour expliquer ce développement du cancer sont le vieillissement de la population, l'adoption au plan mondial du mode vie occidental (sédentarité, obésité...) et le tabac.

« Suite à la croissance et au vieillissement de la population mondiale, et sur la base de différentes hypothèses quant aux tendances des risques du cancer, d'ici à 2030, on peut s'attendre à ce qu'il y ait entre 20 et 25 millions de cas incidents de cancer, et 13 à 16 millions de décès annuels dus au cancer », indique le CIRC dans un communiqué. Ce seront alors 75 millions de personnes dans le monde qui souffriront du cancer en 2030. C'est pourquoi il est fondamental de comprendre pourquoi et comment un cancer se développe afin de mettre au point de nouveaux traitements plus appropriés ([www-dep.iarc.fr](http://www-dep.iarc.fr)).

#### **1.1. Origine des cancers**

La multiplication cellulaire est un mécanisme complexe, hautement régulé, qui trouve son équilibre entre les processus activateurs (stimulateurs de la division cellulaire) et les processus inhibiteurs (inhibition de la division cellulaire et mort cellulaire programmée ou apoptose). Toute perturbation de cet équilibre peut faire pencher la balance soit du côté inhibiteur, dans ce cas la cellule meurt ou entre en sénescence, soit du côté activateur et la cellule se divise de façon incontrôlée et peut donner naissance à un cancer. Le développement d'un cancer est le résultat d'altérations touchant le génome. Pour la majorité des cancers humains, les altérations sont somatiques, c'est-à-dire uniquement présentes dans les cellules de la tumeur. Dans 4 à 10% des cas, une mutation est présente dans le génome de la lignée germinale, ce qui va prédisposer le sujet porteur au développement d'un cancer. Dans ce cas, la mutation peut être transmise aux descendants et on parlera de cancer héréditaire. De plus, l'altération d'un seul gène ne suffit pas à transformer une cellule normale en cellule tumorale, plusieurs anomalies génétiques indépendantes sont requises. Seule l'accumulation de ces altérations génétiques permet d'aboutir au phénotype tumoral. Les altérations génétiques présentes au sein des tumeurs sont extrêmement variées et sont représentées entre autres par des délétions, des réarrangements chromosomiques, des amplifications géniques, des pertes de chromosomes entiers et des mutations ponctuelles. Ces altérations n'apparaissent pas de manière spontanée, elles peuvent être d'origine virale (virus de l'hépatite B et C, virus d'Epstein-Barr, virus du papillome humain), héréditaire ou sont provoquées par des rayonnements (rayons x, rayons  $\gamma$ ) ou des facteurs cancérigènes (tabac, dioxine, amiante, alcool, contraceptifs oraux, aliments

carbonisés ou fumés). Les gènes touchés par ces altérations peuvent être classés en trois catégories : les proto-oncogènes, les gènes suppresseur de tumeurs et les gènes de stabilité. Les proto-oncogènes peuvent être divisés en cinq groupes différents et leur altération est associée à une sur-activation des voies favorisant la prolifération cellulaire.

- **Le premier groupe** de gènes encode les facteurs de croissance et les cytokines tels que SCF (stem cell factor), le PDGF (Platelet derived growth factor) les CSF (Colony-Stimulating Factors) et les interleukines IL1 à 3.
- **Le second groupe** comprend les récepteurs de facteurs de croissance qui stimulent la prolifération cellulaire lorsqu'ils sont activés. Le récepteur au facteur de croissance épidermique (HER2) est un récepteur à tyrosine kinase impliqué dans 20% des cancers du sein qui présente une activité accrue suite à son amplification génique.
- **Le troisième groupe** comprend les transducteurs de signaux situés entre le récepteur et le noyau. Par exemple, une mutation ponctuelle touchant la petite protéine G ras lui permet d'être active constitutionnellement et d'être responsable de certains cancers du poumon, du pancréas et colorectaux.
- **Le quatrième groupe** comprend les facteurs de transcription. Une surexpression du facteur de transcription c-myc, qui active la division cellulaire, est observée dans 15 à 20% des cancers du sein.
- **Le cinquième groupe** comprend les régulateurs de la mort cellulaire programmée. Des protéines possédant un rôle anti-apoptotique telles que Bcl-2 ou Mcl-1 sont souvent surexprimées dans les lymphomes.

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes qui inhibent la division cellulaire et induisent l'apoptose. A l'opposé des proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs provoquent des cancers quand ils sont inactivés. Une trentaine de gènes ont été identifiés parmi lesquels on retrouve p53. Ce facteur de transcription est activé lorsque des dommages à l'ADN sont détectés. p53 actif inhibe la division cellulaire à la phase G1 ou G2/M jusqu'à ce que l'ADN soit réparé ou induit l'apoptose si les dommages ne sont pas réparables. Des mutations inactivant p53 sont retrouvées dans la moitié des cancers humains et dans 20 à 30% des cancers du sein.

Les gènes de stabilité sont responsables de la réparation de l'ADN lorsque celui-ci est endommagé durant la répllication ou après exposition à des agents mutagènes. Cette classe de gène encode les protéines impliquées dans les MMR (mismatch repair), les NER (nucleotide-excision repair) et les BER (base-excision repair). Le gène de stabilité le plus étudié est le gène BRCA1. La protéine BRCA1 intervient dans le maintien de l'intégrité du génome car elle joue un rôle dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN. Des mutations (délétions, insertions, translocations) touchant ce gène sont retrouvées dans 90% des cancers héréditaires du sein.

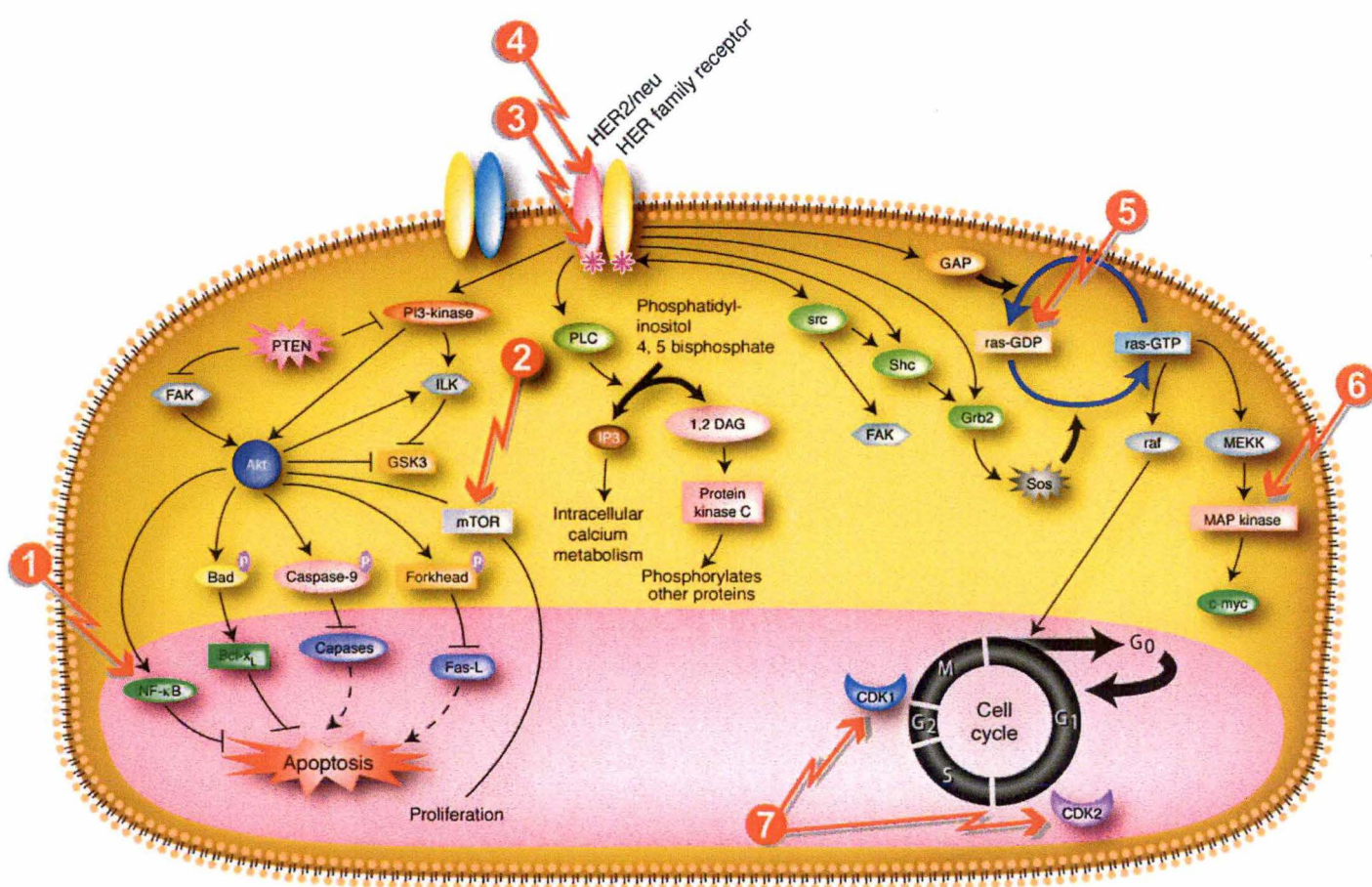
([http://www.cancer.org/docroot/ETO/content/ETO\\_1\\_4x\\_oncogenes\\_and\\_tumor\\_suppressor\\_genes.asp](http://www.cancer.org/docroot/ETO/content/ETO_1_4x_oncogenes_and_tumor_suppressor_genes.asp); Osborne et al, 2004 ; Vogelstein and Lazebnik, 1998).)

### **1.2. Cancer du sein**

Le cancer du sein est une tumeur qui se développe suite à la prolifération anarchique des cellules de la glande mammaire. Durant le stade précoce de la maladie, la tumeur reste localisée au niveau du sein et peut être facilement soignée par chirurgie ou radiothérapie. Si la tumeur n'est pas soignée, celle-ci va s'étendre jusqu'aux ganglions lymphatiques et va devenir métastatique ayant pour conséquence le développement des cellules tumorales dans d'autres parties du corps. Lorsque le cancer devient métastatique, il est principalement traité

Nouveaux agents cytotoxiques dans le cancer du sein	Nouveaux agents non cytotoxiques dans le cancer du sein	
<p><b>Alkylating agents</b></p> <p>Bendamusti</p> <p><b>Anthracyclines</b></p> <p>AD-198</p> <p>14-Acyl-N-benzyl anthracyclines</p> <p><b>Anthrapyrazoles</b></p> <p><b>Antifols</b></p> <p>LY231514 (MTA)</p> <p>LY309887</p> <p>Raltitrexed (Tomudex)</p> <p><math>\gamma</math>-Methylene-10-Deaza-aminopterin (MDAM)</p> <p><b>Camptothecins</b></p> <p>DX8951f</p> <p>RS200</p> <p><b>Fluoropyrimidines</b></p> <p><b>Nucleoside analogues</b></p> <p>Gemcitabin</p> <p><b>Taxanes</b></p> <p><b>Alkylphosphocholines</b></p> <p>Miltefosine</p> <p>Perifosine</p> <p><b>Aminoacridines</b></p> <p>CT-2584</p> <p><b>Declopramide</b></p> <p><b>Depsipeptide (FR901228)</b></p> <p><b>Diarylsulfonylureas</b></p> <p><b>Diethylnorspermine</b></p> <p><b>Epigallocatechin</b></p> <p><b>Epothilones</b></p> <p><b>Indolocarbozoles</b></p> <p><b>6-Hydroxymethylacyl-fulvene</b></p> <p><b>Microtubule inhibitors</b></p>	<p><b>Cible/Mécanisme d'action</b></p> <hr/> <p>Her-2/<i>neu</i></p> <p>EGFR</p> <p>Protein Kinase C inhibitors</p> <p>BCL-2</p> <p>Angiogenesis inhibitors</p> <p>Matrix Metalloproteinase inhibitors</p> <hr/> <p>Abbreviations: EGFR = epidermal growth factor receptor; rHu = recombinant human; VEGF = vascular endothelial growth factor</p>	<p><b>Agents</b></p> <hr/> <p>Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>)</p> <p>Bispecific mAb</p> <p>E23(Fv)PE</p> <p>E1A gene therapy</p> <p>E75 peptide vaccine</p> <p>C225 mAb</p> <p>Tyrosine kinase inhibitors</p> <p>Bryostatin</p> <p>Miltefosine</p> <p>Antisense Therapy</p> <p>TNP-470</p> <p>Neovastat</p> <p>Angiostatin</p> <p>Endostatin</p> <p>CM101 (endotoxin)</p> <p>Interferon alpha</p> <p>Interleukin 12</p> <p>RPF4</p> <p>Thalidomide</p> <p>Ribozyme Therapy</p> <p>rHuVEGF antibody</p> <p>Marimastat</p>

**Tableau I.1 :** Liste des agents chimiothérapeutiques (à gauche) et des agents utilisés en thérapie ciblée (à droite) employés dans le traitement du cancer du sein (Esteva *et al*, 2000)



**Figure I.1 :** Représentation des protéines impliquées dans les voies de signalisation favorisant la prolifération cellulaire. Certaines protéines représentent des cibles intéressantes pour la mise au point de nouveaux traitements anti-cancer : 1 = inhiber les facteurs de transcription qui favorisent la survie cellulaire tels que NFκB, 2 = inhiber mTOR, 3 et 4= bloquer l'activation des récepteurs aux facteurs de croissance, 5 et 6 = inhiber l'activation des kinases impliquées dans la transduction du signal, 7 = inhiber les kinases qui activent le cycle cellulaire (Osborne et al, 2004).

	Apoptosis	Autophagy	Necrosis
<b>Morphologic changes</b>			
Cell membrane	Blebbing, membrane integrity maintained	Blebbing	Loss of membrane integrity
Nucleus	Chromatin condensation, DNA laddering, nuclear fragmentation	Partial chromatin condensation, no DNA laddering	Random DNA degradation
Cytoplasm	Condensed membrane-bound cellular fragments; depolymerization of cytoskeleton	Increased number of autophagic vesicles, degradation of Golgi, polyribosomes, and the ER	Swelling of cellular organelles

**Figure 1.2** : Caractéristiques morphologiques des différents types de mort cellulaire (Ricci and Zong, 2006)

par chimiothérapie. Les agents les plus efficaces et les plus utilisés sont les anthracyclines (doxorubicine, épirubicine) et les taxanes (paclitaxel, docetaxel).

La doxorubicine et l'épirubicine sont des agents qui s'intercalent dans l'ADN et inhibent la synthèse d'ARN et de protéines. Ils génèrent aussi des radicaux libres cytotoxiques, inhibent le clivage de l'ADN par la topoisomérase II, inhibent l'activité hélicase et interfèrent avec la réplication et la transcription de l'ADN. Comme les anthracyclines induisent une cytotoxicité cardiaque, la dose utilisée est limitée. Cependant, l'épirubicine est moins toxique que la doxorubicine.

Le paclitaxel, aussi appelé taxol, et le docetaxel sont des produits naturels isolés respectivement à partir des arbres *Taxus brevifolia* et *Taxus baccata*. Ces agents se lient de manière réversible à la sous-unité  $\beta$  de la tubuline induisant sa polymérisation provoquant ainsi un arrêt de la division cellulaire à la phase G2/M et finalement l'apoptose (Wang *et al*, 2000). Parallèlement aux anthracyclines et aux taxanes, il existe de nombreux autres agents thérapeutiques (Tableau I.1) pour le traitement du cancer du sein tels que le cyclophosphamide (agent alkylant qui forme des ponts entre les bases d'ADN), le 5-fluorouracil et la capecitabine (des analogues pyrimidiques qui s'incorporent dans l'ADN et l'ARN et inhibent la réplication) et le Trastuzumab (anticorps dirigé contre le récepteur HER2).

Actuellement, de nombreuses recherches sont ciblées sur le développement de nouveaux agents qui permettraient de soigner les tumeurs par thérapie moléculaire. Ces nouveaux agents sont conçus pour inhiber diverses protéines impliquées dans les voies de signalisation qui favorisent la prolifération des cellules tumorales. Les cibles les plus intéressantes sont les récepteurs aux facteurs de croissance et leur ligand, les molécules impliquées dans la transduction du signal, les protéines régulant le cycle cellulaire et les facteurs de transcription (Figure I.1) (Esteva *et al*, 2001 ; Osborne *et al*, 2004).

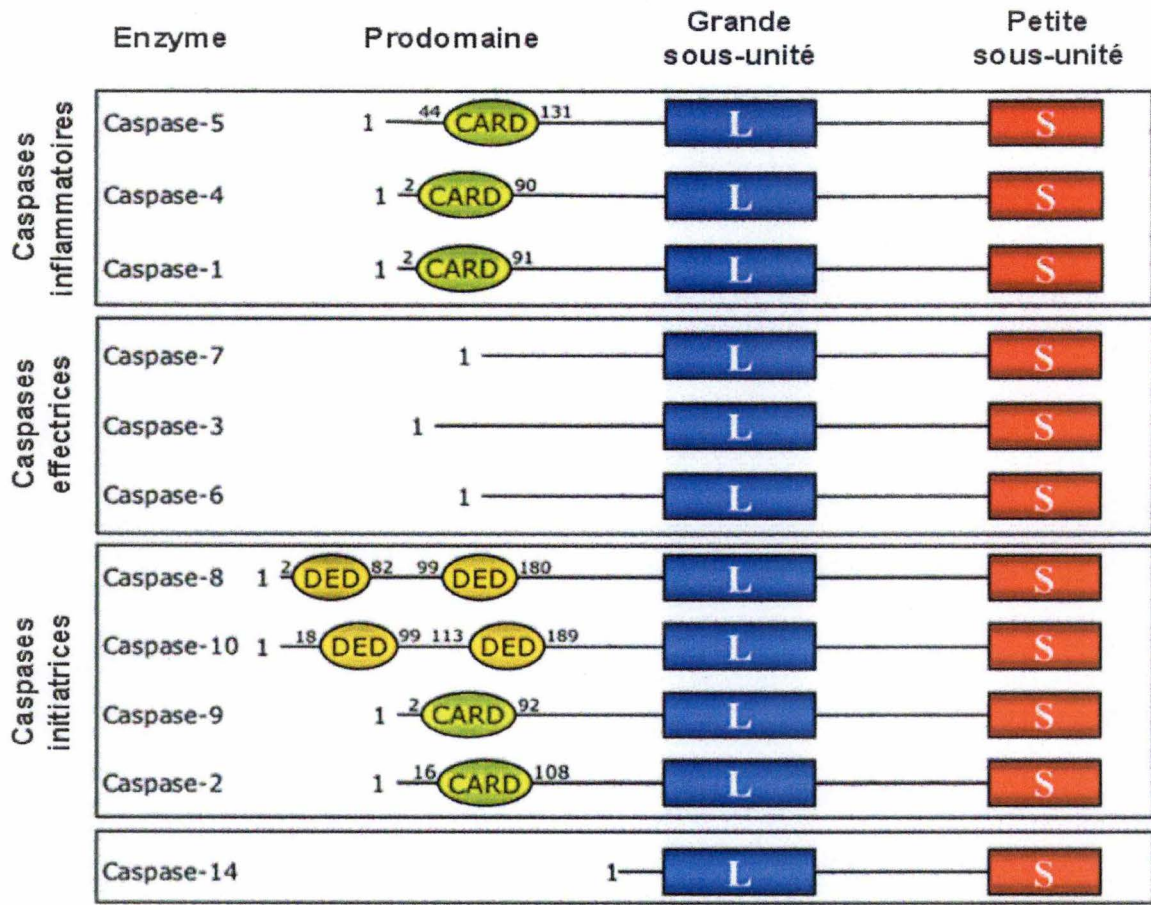
Le traitement prescrit aux patients atteints du cancer du sein est défini en fonction du stade d'avancement de la tumeur et les agents administrés sont soit uniques, soit combinés. Parmi les thérapies combinées, la combinaison anthracycline + taxane semble prometteuse pour le traitement du cancer du sein à un stade avancé et est actuellement intensivement étudiée. Malgré une grande hétérogénéité des mécanismes d'action, tous ces agents ont pour objectif d'induire la mort des cellules tumorales.

## **2. Les différents processus de mort cellulaire**

La mort cellulaire peut se dérouler via trois mécanismes principaux : la nécrose, l'autophagie et l'apoptose (Figure I.2).

La nécrose est considérée comme étant une mort cellulaire non régulée, accidentelle et pathologique caractérisée par un gonflement du cytoplasme, la rupture de la membrane plasmique, une destruction des organites, un relargage du contenu cellulaire engendrant une réponse inflammatoire. La nécrose est induite suite à l'inhibition de la production d'énergie, à un déséquilibre dans les flux de calcium intracellulaire, à une production de ROS et à l'activation de protéases non apoptotiques. Cependant, de récentes études ont suggéré que la nécrose peut également être régulée et avoir un rôle dans certains processus physiologiques et pathologiques (Proskuryakov *et al*, 2003 ; Ricci and Zong, 2006).

L'autophagie peut se résumer en trois étapes : 1. la formation d'une vacuole initiale, appelée autophagosome, caractérisée par une double ou une multiple membrane, qui séquestre une portion de cytoplasme et/ou un organite ; 2. la maturation de l'autophagosome en vacuole de dégradation ; 3. la fusion avec le lysosome et la digestion des organites par des hydrolases lysosomales. L'autophagie est un mécanisme complexe et finement régulé impliqué dans la mort cellulaire mais également dans l'homéostasie et la survie cellulaire. En effet, l'autophagie joue un rôle important dans le turnover des protéines et le remodelage du



**Figure I.3** : Représentation schématique des différentes caspases. On retrouve, du côté N-terminal vers le côté C-terminal : les prodomaines CARD (caspase activation and recrutement domain) et DED (death effector domain), la grande sous-unité catalytique (L) et la petite sous-unité catalytique (S)

(<http://www.unilim.fr/theses/2006/sante/2006limo300d/html/TH.2.html>).

cytoplasme et permet à la cellule de survivre face à des situations de stress ou de jeûne (Meijer and Harris, 2007). Cependant, en opposition à ces mécanismes de survie, l'autophagie est aussi un mécanisme qui induit la mort cellulaire par destruction et digestion totale de la cellule. De plus, il existe de multiples connexions entre les voies de signalisation de l'autophagie et de l'apoptose, ce qui permet à la cellule de « switcher » entre ces deux mécanismes ou de les activer simultanément (Maiuri *et al*, 2007). Dans les cancers, l'autophagie peut jouer deux rôles opposés : soit elle protège les cellules tumorales de la diminution en nutriments et des traitements thérapeutiques en recyclant les protéines et en inhibant l'apoptose, soit elle induit et/ou contribue à la mort des cellules tumorales (Ogier-Denis and Codogno, 2003).

L'apoptose, aussi appelée suicide cellulaire, représente une mort cellulaire programmée et hautement régulée qui élimine les cellules devenues inutiles ou nuisibles. Elle est responsable du maintien de l'homéostasie des tissus en régulant l'équilibre entre prolifération et mort cellulaire. En effet, un excès de mort cellulaire conduit à l'apparition de maladies dégénératives (maladie d'Alzheimer ou de Parkinson) ou à des syndromes d'immunodéficience tandis qu'un déficit de mort cellulaire contribue à l'apparition de maladies auto-immunes ou de cancers (Mizuno *et al*, 1998 ; Fadeel and Orrenius, 2005). Les caractéristiques d'une cellule en apoptose sont le bourgeonnement de la membrane plasmique, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques (suite à la fragmentation de la cellule en petites vésicules). Ces petites vésicules sont ensuite phagocytées par les cellules avoisinantes ou par des macrophages. Contrairement à la nécrose, l'apoptose n'induit pas d'inflammation et la membrane plasmique des cellules n'est pas détruite (Majno and Joris, 1995). L'apoptose est considérée comme étant le mécanisme principal de la mort cellulaire induite par les agents chimiothérapeutiques et son mécanisme est l'objet de nombreuses recherches (Ricci and Zong, 2006).

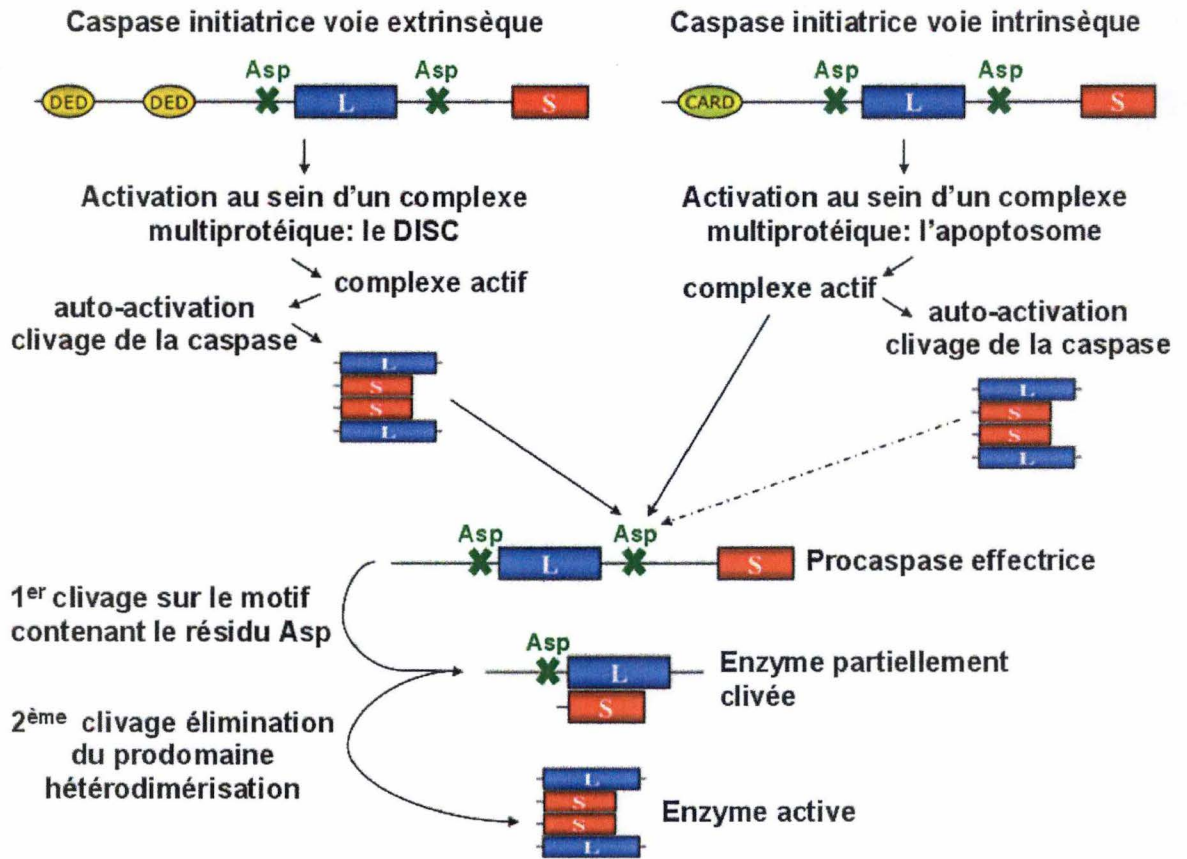
### **2.1. L'apoptose**

L'apoptose peut être divisée en trois phases : la phase d'initiation, la phase d'intégration et la phase d'exécution. La phase d'initiation correspond à l'apparition de signaux induisant la mort cellulaire. Ceux-ci peuvent provenir de l'extérieur (voie extrinsèque) ou de l'intérieur de la cellule (voie intrinsèque ou voie mitochondriale). La phase d'intégration est la phase durant laquelle la décision d'induire la mort cellulaire est prise. C'est un point de non retour car une fois l'apoptose activée, elle conduit inévitablement à la mort cellulaire. La phase d'exécution correspond à l'activation de caspases et d'effecteurs de mort qui vont contribuer à la dégradation des constituants cellulaires et à la mort de la cellule.

#### **2.1.1. Les caspases**

L'activation des caspases (dont le nom provient de cysteine-dependent aspartate specific protease) correspond à la phase d'exécution de l'apoptose. Les caspases forment une grande famille de protéases dont les membres ont des rôles distincts dans l'inflammation ou dans l'apoptose. Toutes les caspases partagent certaines caractéristiques communes. Elles possèdent au niveau de leur site catalytique un domaine pentapeptidique conservé comprenant les acides aminés QACXG (Fan *et al*, 2005). Elles sont toutes exprimées en tant que pro-enzymes qui ne possèdent pas d'activité catalytique et contiennent trois domaines, un pro-domaine de 3 à 24 kDa du côté NH<sub>2</sub> terminal, une grande sous-unité de 17 à 21 kDa (p20) appelée grande sous-unité catalytique et une petite sous-unité de 10 à 13 kDa (p10) du côté C-terminal appelée petite sous-unité catalytique (Figure I.3) (Chowdhury *et al*, 2008).

Les caspases impliquées dans l'inflammation sont les caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 and 14. Les caspases impliquées dans l'apoptose sont divisées en deux groupes, les caspases initiateuses qui initient la réponse aux divers stimuli pro-apoptotiques et les caspases effectrices qui



**Figure I.4** : Représentation de l'activation des caspases suite au déclenchement de l'apoptose par la voie extrinsèque ou intrinsèque.

<http://www.unilim.fr/theses/2006/sante/2006limo300d/html/TH.2.html>

## Caspase substrates

### 1) Apoptotic and inflammatory regulators

<i>Proapoptotic</i>	<i>Antiapoptotic</i>		<i>Inflammatory molecules</i>
Bid	Bcl-2	RIP	IL-1 $\beta$
Caspases	Bcl-xL	p65/RelA	IL-18
DFF45	FLIP <sub>1</sub>	IKK $\beta$	IL-16
p28 Bap31	XIAP	cIAP-1	

### 2) Protein kinases and other signal transduction regulators

DNA-PK	MEKK1	FAK	Akt
Raf-1	Mst1	Mst2	SLK
PITSLRE p110	PITSLRE p170	PKN	PRK2
Fyn	Wee1	SRPK1	SRPK2
CaMK IV	CaMK II $\alpha$	CaMKK	ROCK 1
IKK $\beta$	RIP	PKC $\theta$	PKC $\delta$
PKC $\mu$	PKC $\zeta$	SPAK	PP2A
RasGAP	Cbl	Cbl-b	ZAP-70

### 3) Cytosolic and nuclear structural proteins

$\alpha$ -fodrin	actin	Gas-2	gelsolin
Beta II-spectrin	$\beta$ -Catenin	Cytokeratin 18	NuMA
Lamin A	Lamin B	Lamin C	DNA pol. I
HnRNP proteins C1 and C2		70-kDa protein of U1 snRNP	
topoisomerases I and II		UBF	

### 4) Repair factors

PARP	DNA-PK	Rad51	ATM
Rad9			

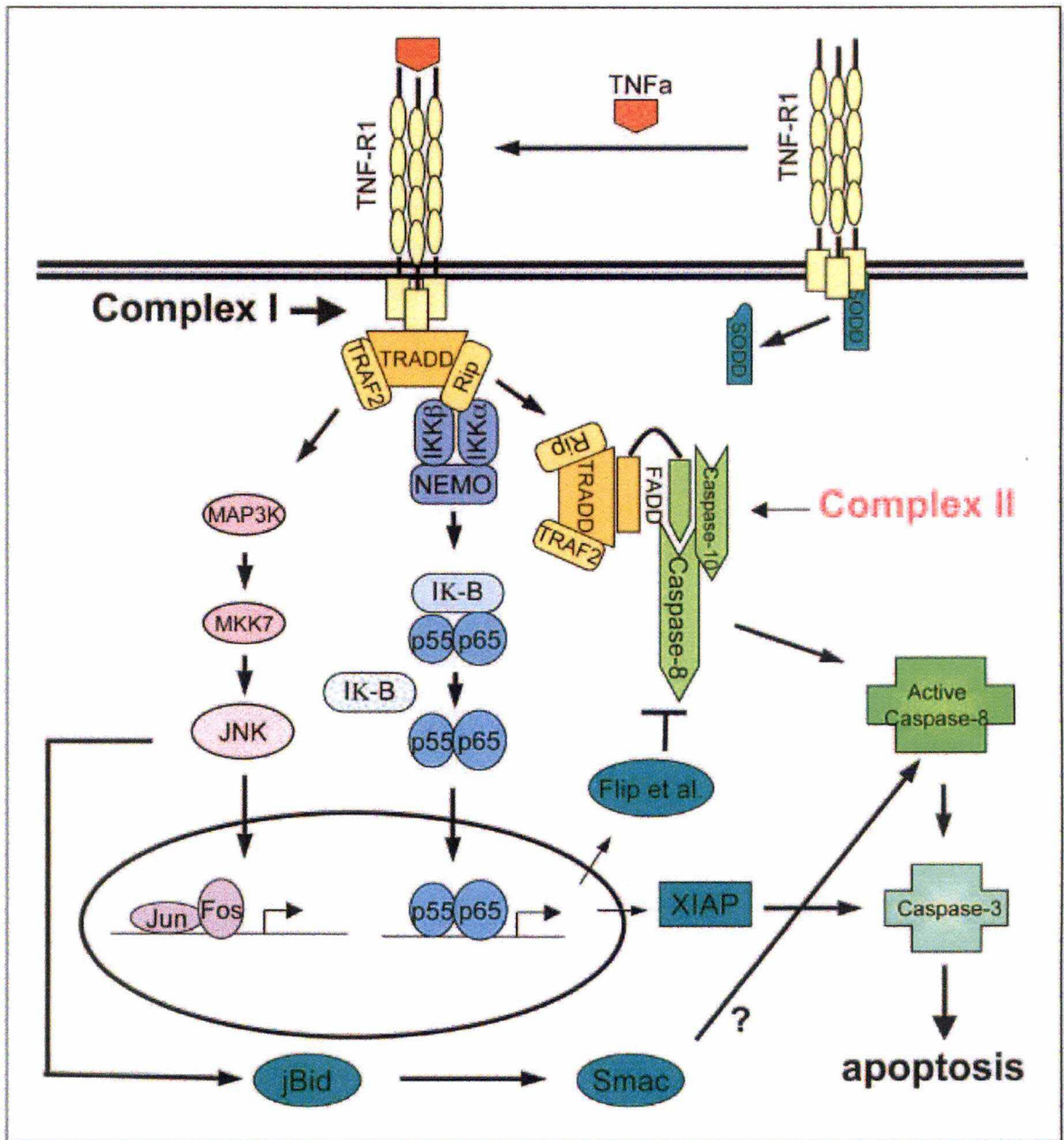
### 5) Cell cycle regulators

p27	p21	Rb	Mdm2
Cdc27	Wee1		

### 6) Disease related factors

huntingtin	ataxin-3	androgen receptor	atropin-1
APP			

**Tableau I.2:** Liste reprenant certains des substrats des caspases (Degterev *et al*, 2003)



**Figure 1.5 :** Représentation de la voie de signalisation du TNF. La voie extrinsèque est activée suite à la liaison du ligand TNF à son récepteurs TNFR1. Pour les détails, voir le texte (Jin and EL-Deiry, 2005).

clivent différents substrats au cours de l'apoptose. Les caspases initiatrices possèdent un long pro-domaine contenant soit un « death effector domain » (DED) (caspases 8 et 10) soit un « caspase activation and recrutement domain » (CARD) (caspases 2 et 9). Les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) possèdent un pro-domaine court et sont activées par les caspases initiatrices. L'activation des caspases initiatrices se réalise par la voie intrinsèque ou par la voie extrinsèque et se réalise au sein d'un large complexe protéique (l'apoptosome ou DISC) qui permet de rassembler les pro-caspases inactives. Celles-ci vont ensuite subir deux auto-clivages protéolytiques au niveau de résidus aspartates spécifiques. Suite au clivage du pro-domaine, la grande sous-unité s'associe à la petite sous-unité pour former un hétérodimère (Jin and EL-Deiry, 2005 ; Thornberry and Lazebnik, 1998). Ces dimères vont dimériser pour former un hétérotétramère actif (composé de deux sous-unités p20 et deux sous-unités p10) doté d'activité catalytique (Figure I.4). Les caspases vont aller cliver et activer d'autres substrats dont les caspases effectrices. Les caspases et la sérine protéase Granzyme B sont des protéases spécifiques car ce sont les seules protéases à cliver des substrats après un acide aminé aspartate. Les caspases effectrices activées vont ensuite se charger d'exécuter l'apoptose en clivant divers substrats. Les protéines clivées par les caspases sont des protéines cytoplasmiques (actine,  $\beta$ -caténine, plakoglobine, etc), des protéines nucléaires (lamine A et B), des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN (PARP-1, ICAD, DNA-topoisomérase) et bien d'autres (Tableau I.2) (Chowdhury *et al*, 2008). Le clivage de ces différents substrats initie la phase finale de l'apoptose.

### 2.1.2. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est activée suite à la liaison de ligands inducteurs de mort à leurs récepteurs appelés récepteurs de mort. Ces récepteurs comprennent TNFR1 dont le ligand est TNF, Fas dont le ligand est FasL et TRAIL-DR4 ou DR5 dont le ligand est Apo2L.

#### La voie TNF :

Le TNF est une cytokine pro-inflammatoire multifonctionnelle principalement produite par les macrophages et les lymphocytes T et qui se lie à son récepteur TNFR1. Ce récepteur possède un domaine extracellulaire composé de quatre régions riches en cystéines et un domaine intracellulaire composé d'un domaine de mort ou death domain (DD) (Figure I.5) (Rath and Aggarwal, 1999). En condition de repos, la signalisation par le TNFR1 est inhibée par la protéine SODD (silencer of death domain) qui se lie au domaine DD du récepteur TNFR1. Suite à la liaison du ligand TNF, SODD est libérée du récepteur TNFR1 et la protéine adaptatrice TRADD, contenant un domaine DD vient se lier au domaine DD du récepteur TNFR1 via une liaison homophylique (DD-DD). La protéine adaptatrice TRADD est capable de recruter plusieurs protéines : la protéine FADD (Fas-associated death domain), le récepteur TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) et la sérine thréonine kinase RIP (receptor-interacting kinase). La protéine FADD possède un domaine DD et un domaine DED (death effector domain). Le domaine DD de FADD lui permet d'interagir avec le domaine DD de TRADD et le domaine DED de FADD lui permet de recruter les pro-caspases 8 et 10, via leur domaine DED, et d'induire l'apoptose. Cependant, le TNF n'induit pas toujours la mort cellulaire car son activité pro-apoptotique peut être contrebalancée par l'activation parallèle de facteurs anti-apoptotiques. En effet, le récepteur TNFR1 active également la voie anti-apoptotique de NF $\kappa$ B grâce au recrutement des protéines TRAF2 et RIP. La protéine RIP stabilise le complexe IKK et la protéine TRAF2 recrute le complexe IKK (I $\kappa$ B kinase). Le complexe IKK phosphoryle I $\kappa$ B, l'inhibiteur de NF $\kappa$ B, ce qui induit sa dégradation par le protéasome et la libération de NF $\kappa$ B qui transloque dans le noyau où il induit la transcription

de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (FLIP, IAP, Bcl-XL). Par conséquent, l'apoptose induite par le TNF n'est activée que lorsque la voie de NFκB est inhibée. Le TNF induit aussi l'activation de la voie JNK (c-Jun N-terminale kinase) grâce au recrutement de TRAF2. Cette voie se termine par l'activation du facteur de transcription AP-1 impliqué dans une multitude de processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et la prévention de l'apoptose. Cependant, le rôle de JNK dans le processus apoptotique n'est pas encore bien défini car d'autres études ont démontré que JNK pouvait également favoriser l'exécution de l'apoptose (Jin and El-Deiry, 2005, Rath and Aggarwal, 1999).

### La voie Fas :

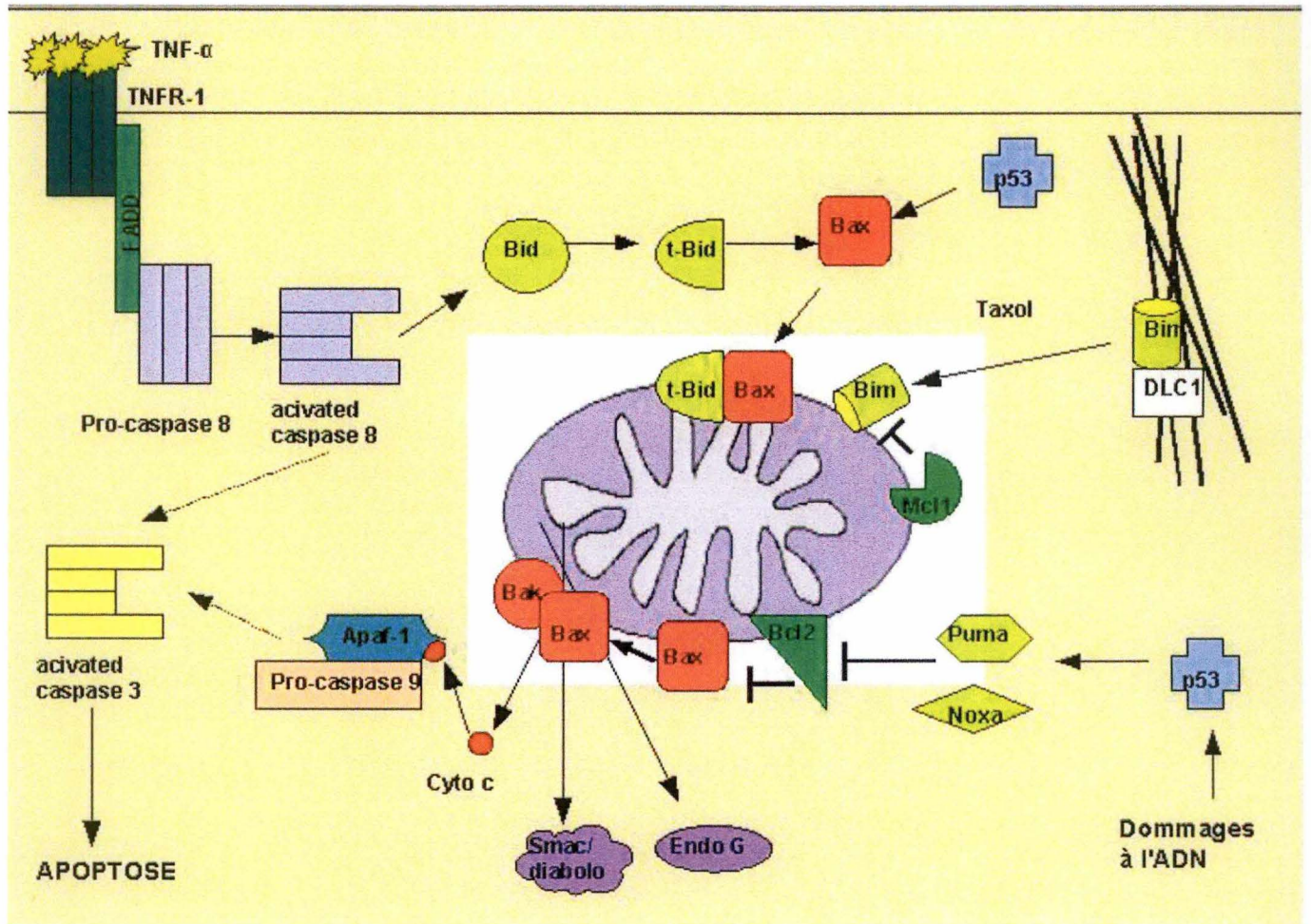
La voie Fas-FasL est principalement impliquée dans l'élimination de cellules infectées par des virus ou de cellules cancéreuses par les lymphocytes T et les cellules natural killer. L'induction de l'apoptose suite à la liaison du ligand Fas à son récepteur Fas/CD95 résulte en la trimérisation du récepteur et le recrutement intracellulaire de la protéine adaptatrice FADD (Fas-associated death domain). Cette protéine possède un domaine DD C-terminal et un domaine DED (death effector domain) N-terminal. Le domaine DD de FADD lui permet d'interagir avec le domaine DD du récepteur et le domaine DED de FADD lui permet de recruter et d'interagir avec la pro-caspase 8 et/ou la pro-caspase 10 qui possèdent dans leur pro-domaine un domaine DED. Le complexe formé par le récepteur, FADD et les caspases est appelé DISC (Death-inducing signal complex). La formation de ce complexe permet le rassemblement des caspases 8 ou 10, entraînant leur autoclivage et leur autoactivation. Une fois la caspase 8 activée, elle est libérée du complexe DISC et va cliver et activer la pro-caspase 3, une caspase effectrice. La caspase 3 active, en clivant divers substrats cellulaires, va induire l'apoptose. Cette voie d'activation de l'apoptose est suffisante dans certaines cellules appelées cellules de type I. Dans les cellules de type II, l'activation efficace de l'apoptose est dépendante d'une amplification du signal FasL/Fas réalisée par le clivage de Bid par la caspase 8. Bid tronqué, est un membre de la famille Bcl-2 capable d'induire l'apoptose via la voie mitochondriale décrite ci-dessous (Ashkenazi and Dixit, 1998 ; Jin and El-Deiry, 2005).

### La voie TRAIL :

De récentes études suggèrent que la voie ApoL-TRAIL (DR4 et DR5) joue un rôle dans la mort des cellules infectées par un virus et des cellules tumorales. Cette mort est induite par les cellules natural killer (NK) et les macrophages. La signalisation de l'apoptose induite par TRAIL et son ligand ApoL est similaire à celle de Fas avec la formation du complexe DISC, le recrutement de FADD et des pro-caspases 8 et 10, l'activation des caspases 8 et 10, suivie de l'activation de la caspase 3 et de l'induction de l'apoptose. L'amplification du signal par le clivage de Bid et la voie mitochondriale sont également requises pour induire l'apoptose (Ashkenazi and Dixit, 1998).

### **2.1.3. La voie intrinsèque**

L'apoptose induite par la voie intrinsèque est activée par des signaux provenant de l'intérieur de la cellule suite à des dommages induits au niveau des organites de la cellule (tels que le noyau et son ADN, le réticulum endoplasmique ou la mitochondrie), suite à des stress oxydatifs ou suite à l'absence de facteurs de croissance. Les divers signaux apoptotiques convergent vers la mitochondrie, le point de contrôle central dans l'activation de l'apoptose par la voie intrinsèque.



**Figure I.6 :** Représentation de la voie intrinsèque et du rôle central de la mitochondrie dans la phase d'intégration des signaux apoptotiques. Pour les détails, voir le texte.

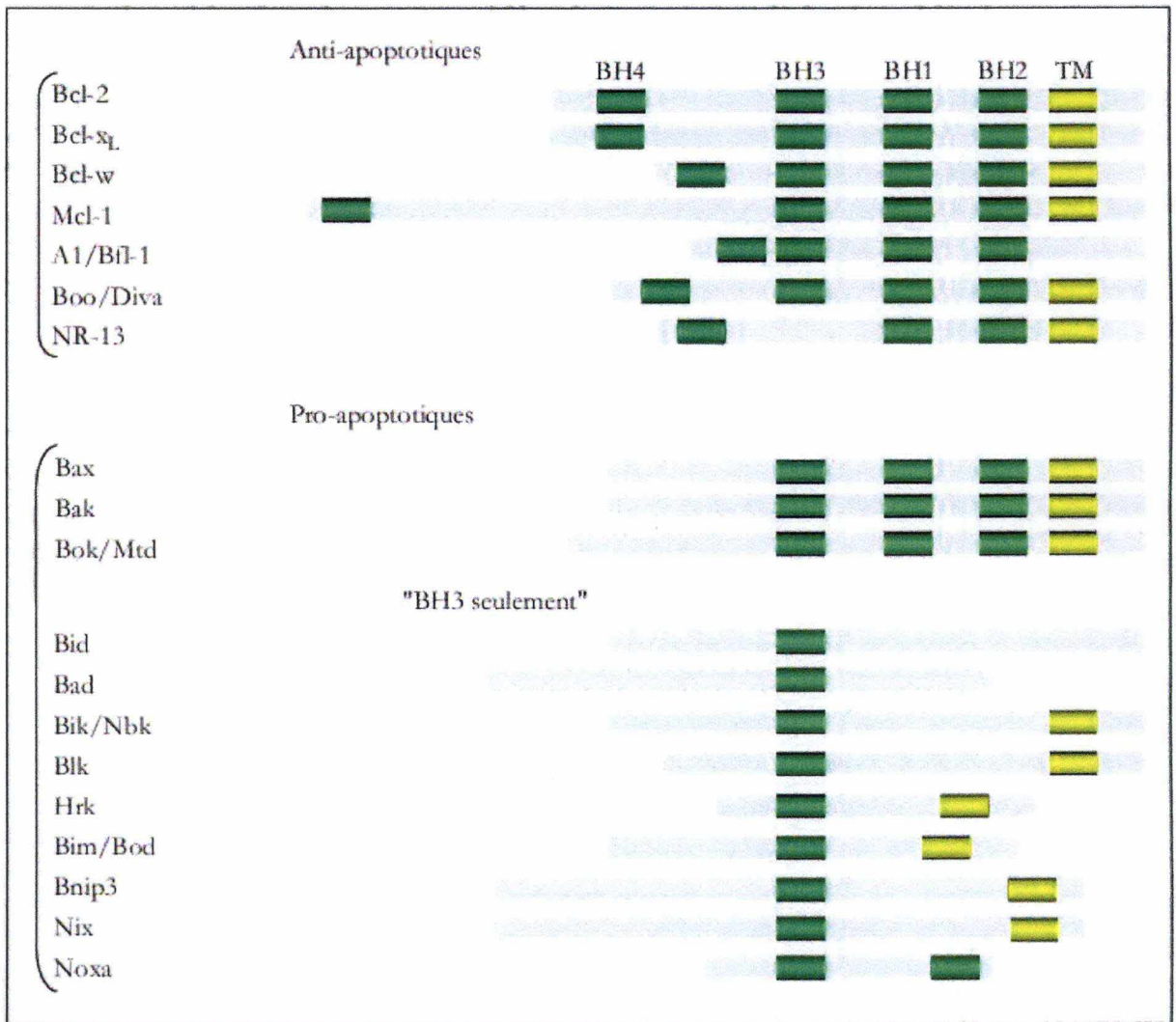
La mitochondrie

La mitochondrie joue un rôle central dans l'apoptose car c'est à son niveau que s'opère la phase d'intégration des signaux pro- et anti-apoptotiques ayant pour résultat l'induction ou non de la mort cellulaire (Figure I.6). L'événement clé dans la voie de signalisation mitochondriale et de l'induction de l'apoptose est la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. En effet, l'espace intermembranaire de la mitochondrie contient des protéines impliquées dans l'activation de l'apoptose. Parmi celles-ci, on retrouve les endonucléases Endo G et AIF (apoptosis inducing factor), le cytochrome c et des activateurs mitochondriaux de caspases Smac/Diablo et OMI/HtrA<sub>2</sub>.

Smac/Diablo est chargée d'inhiber l'action des IAPs (inhibitor of apoptosis). Les IAPs sont des protéines cytosoliques possédant un domaine BIR via lequel s'effectue une interaction avec les caspases et leur inhibition. Les IAPs peuvent également induire l'ubiquitination et la dégradation des caspases par le protéasome (Yang and Li, 2000). Les quatre premiers acides aminés (Ala-Val-Pro-Ile) de la protéine mitochondriale Smac/Diablo se fixent au domaine BIR des IAPs, ce qui permet d'empêcher les IAPs de se lier aux caspases (Daugas *et al*, 2000 ; Martinez-Ruiz *et al*, 2008). OMI/HtrA<sub>2</sub> est une sérine protéase qui empêche également le rôle inhibiteur des IAPs en inhibant leur interaction avec les caspases ou en clivant les IAPs et en induisant leur dégradation par le protéasome (Srinivasula *et al*, 2003). Après avoir été libérée dans le cytosol, l'endonucléase AIF transloque jusque dans le noyau où elle induit la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. Cette mort cellulaire induite par la nucléase AIF est indépendante de l'ATP et de l'activation des caspases (Daugas *et al*, 2000). Endo G est une nucléase qui induit la mort cellulaire par fragmentation de l'ADN. Comme AIF, son activité est indépendante de l'activation des caspases (Wang, 2001).

Une fois la membrane mitochondriale perméabilisée, le cytochrome c transloque dans le cytosol et s'associe avec une protéine cytosolique appelée Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) au niveau de son domaine WD40. Apaf-1 contient également un domaine CARD (caspase recrutement domain) et un domaine de liaison à l'ATP. Une fois le cytochrome c lié à Apaf-1, l'ATP peut se lier à ce dernier, conduisant au recrutement de la pro-caspase 9 formant un complexe qui va s'oligomériser (en heptamère) pour former l'apoptosome. Au sein de l'apoptosome, les pro-caspases 9 vont pouvoir être activées suite au clivage de leur pro-domaine. Les caspases 9 activées vont ensuite cliver et activer les caspases effectrices 3, 6 et 7 (Cain *et al*, 2002 ; Segal-Bendirdjian *et al*, 2005).

Plusieurs hypothèses existent concernant les mécanismes responsables de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe suivie de la libération des facteurs apoptogènes : l'hyperpolarisation de la membrane mitochondriale interne conduisant au gonflement de la matrice et à la rupture de la membrane mitochondriale externe, la formation du PTP (permeability transition pore) composé des protéines VDAC et ANT ou encore la formation de pores par les membres de la famille Bcl-2. La première hypothèse soutient que la perméabilisation est due à la fermeture du pore VDAC provoquant une déficience dans l'échange ADP-ATP, une inhibition de l'ATPase et une inhibition de l'entrée de proton H<sup>+</sup> dans la matrice. La seconde hypothèse implique le PTP formé par l'apposition de protéines de la membrane mitochondriale interne et de la membrane mitochondriale externe créant un pore. La composition de ce pore n'est pas encore complètement élucidée mais le pore serait formé de l'ANT, du VDAC et de la cyclophiline D. L'ouverture du PTP peut être induite par différents facteurs tels que le calcium, les ROS, la diminution d'ATP et Bax. La formation du pore résulte en une dissipation du gradient de protons et un équilibre chimique entre la matrice et le cytoplasme causant un gonflement osmotique de la matrice due à sa concentration élevée en solutés. La dernière hypothèse implique les membres de la famille Bcl-2 (Desagher and Martinou, 2000).



**Figure I.7:** Schéma représentant les membres de la famille Bcl-2. Les protéines de la famille Bcl-2 sont réparties en trois groupes : les protéines anti-apoptotiques possédant 4 domaines BH (Bcl-2 homology domain), les protéines pro-apoptotiques possédant les domaines BH1, BH2 et BH3 et les protéines pro-apoptotiques « BH3 seulement ». Tous les membres de la famille Bcl-2, excepté Bid, possèdent un domaine TM (transmembrane) à leur extrémité carboxy-terminale (Segal-Bendirdjian *et al*, 2005).

### Les membres de la famille Bcl-2

Le membre fondateur de cette famille est le produit du proto-oncogène Bcl-2, identifié au point de cassure t(14 ; 18) dans un lymphome folliculaire humain B (Tsujimoto, 1985). Aujourd'hui, une vingtaine de membres ont été découverts (Figure I.7). Ils sont définis par la présence d'au moins un domaine BH (Bcl-2 homology domain) qui correspond à une hélice- $\alpha$ , la présence d'un domaine hydrophobe TM (transmembrane) à leur extrémité carboxy-terminale (sauf pour Bid, Bad, Puma et Noxa) qui leur permet de s'insérer dans la membrane et la capacité de former des homo- ou hétéro-dimères. Ces membres sont classés en deux groupes, les membres anti-apoptotiques et les membres pro-apoptotiques. La quantité relative des membres de chaque groupe influence la susceptibilité des cellules à subir l'apoptose ou non.

Les membres anti-apoptotiques (**Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>**) à l'exception de Mcl-1 possèdent quatre domaines BH et sont principalement localisés au niveau de la membrane mitochondriale externe, nucléaire ou du réticulum endoplasmique. Ils inhibent l'apoptose en inhibant la perméabilisation mitochondriale, ce qui empêche la libération des facteurs apoptogènes depuis la mitochondrie jusqu'au cytosol.

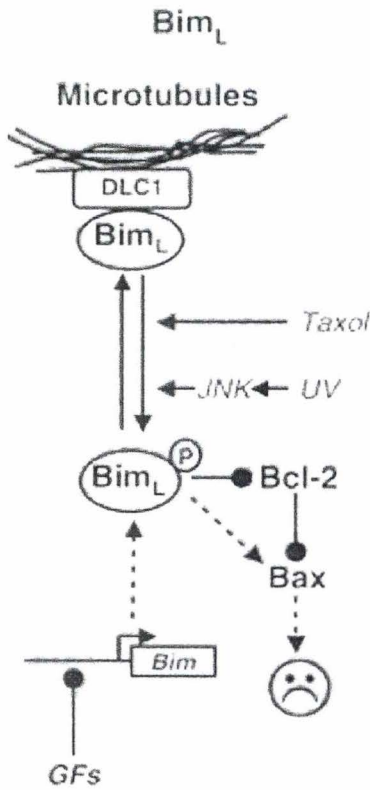
Les membres pro-apoptotiques sont divisés en deux sous-groupes, les membres (**Bax et Bak et Bok**) possédant trois domaines BH (BH1, BH2 et BH3) et les membres (**Bid, Bad, Bcl-X<sub>S</sub>, Bnip3, Puma, Noxa et Bim**) possédant seulement le domaine BH3 appelés « BH3 only ». La majorité des membres pro-apoptotiques sont localisés dans le cytosol, mais suite à un signal de mort, ces membres sont relocalisés dans la membrane mitochondriale et induiraient l'apoptose en formant des pores dans la membrane mitochondriale externe, induisant ainsi la libération des facteurs apoptogènes (Gross *et al*, 1999 ; Jin and El-Deiry, 2005).

### L'intégrité mitochondriale

Les membres anti-apoptotiques agissent principalement au niveau de la membrane mitochondriale pour inhiber sa perméabilisation. Dans des cellules saines, Bak est localisé sous forme monomérique dans la membrane mitochondriale externe et Bax est localisé dans le cytosol sous forme de monomère inactif. En cours d'apoptose, Bax est transloqué dans la membrane mitochondriale où on observe une homo- ou hétéro-dimérisation des protéines Bak et Bax pour former un pore et perméabiliser la membrane mitochondriale externe. Bax et Bak sont également capables d'induire la perméabilisation mitochondriale en interagissant avec le PTP favorisant son ouverture et une dissipation du potentiel de membrane. Les membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> ont la capacité de neutraliser l'action pro-apoptotique de Bax ou Bak car ils sont capables d'interagir avec ceux-ci et de former des hétérodimères (Bcl-2-Bax ou Bcl-X<sub>L</sub>-Bak) empêchant la translocation et la dimérisation de ces protéines dans la membrane mitochondriale externe (Burlacu, 2003). Mcl-1 est une autre protéine anti-apoptotique qui inhibe l'apoptose via son hétérodimérisation avec Bim (Han *et al*, 2006) ou avec Bak dans la membrane mitochondriale. Cependant, il existe deux formes de Mcl-1 pouvant jouer un rôle positif dans l'apoptose : Mcl-1S/ $\Delta$ TM qui résulte d'un splicing alternatif (suppression de l'exon2) et possède une structure similaire aux protéines «BH3 only» et le fragment C-terminal de Mcl-1 qui résulte d'un clivage de Mcl-1 par le Granzyme B ou la caspase 3 activée par la voie TRAIL et possède une activité pro-apoptotique qui va induire la libération du cytochrome c (Michels *et al*, 2005).

### L'induction de l'apoptose

Au cours de l'apoptose, l'action des protéines anti-apoptotiques doit être inhibée tandis que les protéines pro-apoptotiques Bak et Bax sont activées et induisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe en formant des pores. La régulation de l'activité des membres de la famille Bcl-2 se réalise via différents mécanismes : augmentation ou



**Figure I.8 :** Représentation du mécanisme d'activation de l'apoptose induite par le taxol, impliquant la protéine pro-apoptotique Bim. En conditions normales, Bim est lié à la chaîne légère de la dynéine (DLC1). Suite à un stimulus apoptotique touchant les microtubules, Bim est libéré de DLC1 et peut être phosphorylé par la kinase JNK, puis il est relocalisé dans la membrane mitochondriale externe où il induit la perméabilisation de la mitochondrie en inhibant Bcl-2 (Ley *et al*, 2005).

diminution de l'expression de la protéine, (dé)phosphorylation, interactions protéines-protéines, changements de conformation, translocation, clivage ou dégradation. Bien qu'il reste encore beaucoup d'éléments inconnus à propos des mécanismes par lesquels l'apoptose est régulée, quelques exemples de régulations de l'activité des membres de la famille Bcl-2 sont présentés ci-dessous.

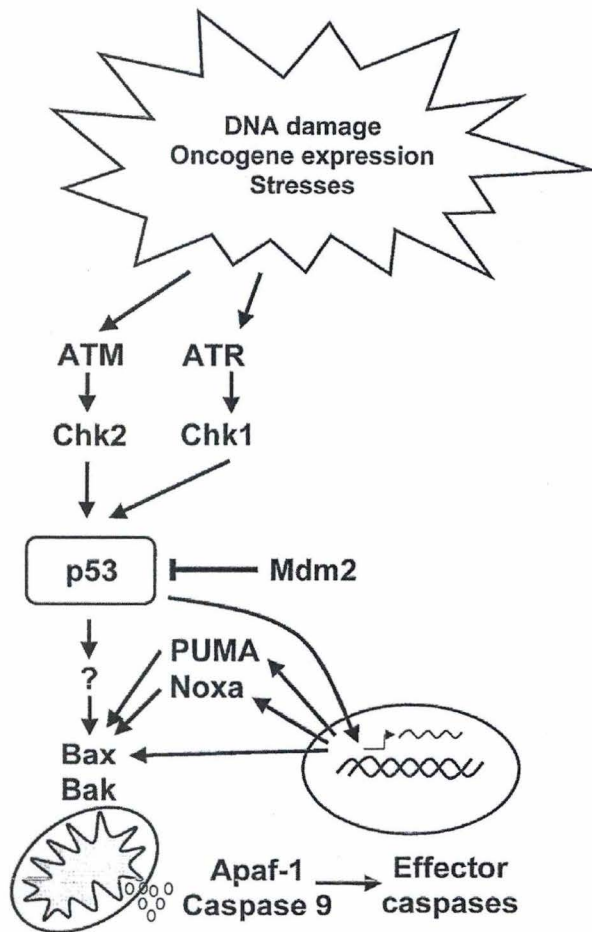
**Mcl-1** interagit avec certains membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et les inhibent, mais suite à un stimulus apoptotique, Mcl-1 est dégradé par la caspase 3 ou 8 et son expression est également inhibée (Michels et al, 2005). **Bcl-2** existe sous forme phosphorylée ou déphosphorylée et cette déphosphorylation influence son activité anti-apoptotique probablement via un changement conformationnel : la forme phosphorylée de Bcl-2 lui permettrait de remplir pleinement sa fonction anti-apoptotique alors que sa déphosphorylation induirait sa dégradation par le protéasome. Les protéines «BH3 only» jouent également un rôle important dans l'induction de l'apoptose. Par exemple, la liaison de **Bcl-X<sub>S</sub>** à Bcl-2 empêche Bcl-2 de se lier à Bax et de le neutraliser (Burlacu, 2003).

### Dommmages aux microtubules

**Bim** est un autre exemple de protéine transférée dans la membrane mitochondriale externe pour induire l'apoptose. En conditions normales, Bim est associé aux microtubules via son association avec la chaîne légère LC8/DLC1 de la dynéine. Lorsque l'apoptose est induite par des agents ciblant les microtubules comme le taxol, Bim se détache des microtubules et est transloqué dans la membrane mitochondriale où il va interagir avec Bcl-2 et l'inhiber pour induire l'apoptose (Puthalakath *et al*, 1999). De plus, la kinase JNK peut phosphoryler Bim, ce qui induit sa translocation dans la membrane mitochondriale externe : ce processus est un exemple d'apoptose induite par des stress qui activent la kinase JNK. Cependant, Bim n'induit pas toujours l'apoptose lorsqu'il est présent au niveau de la membrane mitochondriale car il peut être inhibé par Mcl-1 lorsque cette protéine est également présente dans la membrane mitochondriale (Han *et al*, 2006). C'est donc l'équilibre formé par la quantité respective des trois protéines qui décidera de l'issue finale (Figure I.8).

### Dommmages à l'ADN

Le principal facteur de transcription impliqué dans l'homéostasie du génome est p53. En conditions normales, p53 est ubiquitiné et transporté du noyau vers le cytosol par HDM2 (Human Double Minute 2), l'ubiquitine ligase de p53, puis dégradé par le protéasome. Lorsque des dommages à l'ADN sont détectés, le facteur de transcription p53 est stabilisé et activé. La stabilisation de p53 est rendue possible grâce à diverses modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations par différentes kinases (ATM, ATR, Chk1 et Chk2) (Figure I.9). La modification la plus étudiée est la phosphorylation de la sérine 15 par la kinase ATM suite à une cassure double brin de l'ADN. Cette phosphorylation inhibe la dégradation de p53 en inhibant l'interaction de HDM2 avec p53 et augmente l'activité transcriptionnelle de p53 en stimulant le recrutement de cofacteurs tels que CBP et p300. ATM phosphoryle également HDM2, ce qui déstabilise son interaction avec p53 (Lavin and Gueven, 2006). Une fois p53 stabilisé et activé, il va induire un arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN ou l'apoptose lorsque les dégâts sont trop importants pour être réparés. L'apoptose est régulée par p53 via l'induction de l'expression des protéines pro-apoptotiques telles que Puma, Noxa, Bax, DR5, Fas, Apo-1 et Apaf-1 et réprimer l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2. Puma et Noxa sont des protéines «BH3 only» qui induisent l'apoptose en activant Bak et Bax (Puma active directement Bak et Noxa active Bak en inactivant Mcl-1 et Bcl-X<sub>L</sub>) (Nakajima and Tanaka, 2007). L'expression de Bok, une protéine pro-apoptotique qui possède les trois domaines BH1, BH2 et BH3 est également induite par p53 (Yakovlev *et al*, 2004). p53, lorsqu'il est localisé dans le cytosol, est également capable d'induire l'apoptose par un mécanisme indépendant de son activité



**Figure I.9 :** Représentation schématique des voies de signalisation dépendante de p53. L'inactivation de p53 par Mdm2 (murine double minute 2) ou Hdm2 (human double minute 2) est inhibée par des modifications post-transcriptionnelles de p53 telles que des phosphorylations par les kinases ATM, ATR, Chk1 et Chk2. Une fois activé, le facteur de transcription p53 va induire l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bak, PUMA et NOXA. Indépendamment de son activité transcriptionnelle, p53 peut coopérer avec Bax et Bak pour perméabiliser la membrane mitochondriale externe et induire l'apoptose via la libération des facteurs apoptogènes et l'activation de la caspase 9 (Schuler and Green, 2001).

transcriptionnelle. De récentes études ont démontré que p53 interagit directement avec les protéines Bak et Bax pour former un pore dans la membrane mitochondriale externe. D'autres études récentes ont démontré que p53 peut induire l'apoptose via l'activation de la caspase 2 et la formation du PIDDosome. Le PIDDosome est un complexe multimérique formé par la protéine PIDD (p53-induced protein with a death domain), RAIDD et la caspase 2, au sein duquel il y a oligomérisation et activation de la caspase 2 suivie de l'apoptose des cellules. Il reste encore énormément de questions concernant la régulation et l'activation de cette voie alternative qui semble pouvoir être induite par des cellules possédant un p53 sauvage mais également par des cellules possédant un facteur p53 muté (Baptiste-Okoh *et al*, 2008).

### Absence de signaux de survie

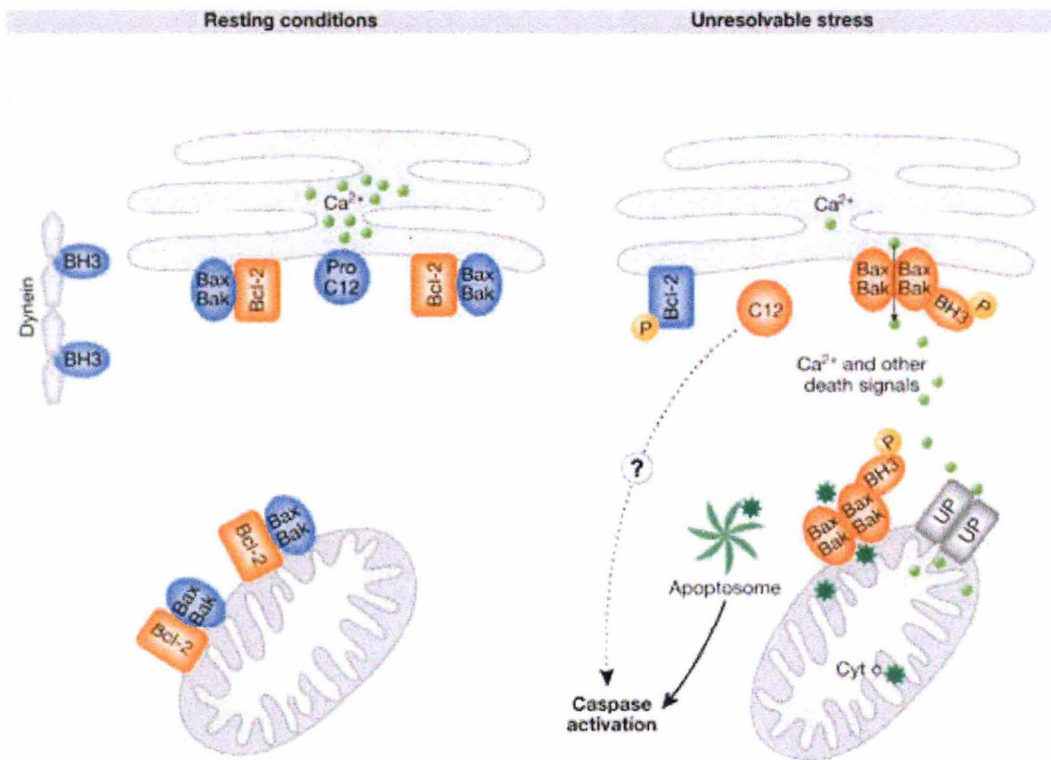
Bad est une protéine «BH3 only» pro-apoptotique inhibée via son interaction dans le cytosol avec la protéine 14-3-3. Bad possède trois sites de phosphorylation par des kinases : les sérines 112, 136 et 155. Lorsque la sérine 155, localisée dans le domaine BH3 de Bad, est phosphorylée, Bad est séquestré dans le cytosol par la protéine 14-3-3 et l'interaction de Bad avec Bcl-2 est inhibée, empêchant ainsi Bad d'induire l'apoptose. En présence de facteurs de croissance, ceux-ci se lient sur leur récepteurs tyrosine kinase et les activent, ce qui aboutit à l'activation de la kinase Akt. Cette kinase inhibe Bad et la caspase 9 en les phosphorylant. Suite au retrait des facteurs de croissance, Bad et la caspase 9 ne sont plus phosphorylés ni inhibés et peuvent alors induire l'apoptose (Rosenquist, 2003). Lorsque Bad est déphosphorylé, il va transloquer au niveau de la membrane mitochondriale où il s'associe avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-X<sub>L</sub> et Bcl-2, empêchant leur action anti-apoptotique.

### Stress hypoxique

**Bnip3** est une protéine «BH3 only» un peu particulière car elle induit la mort cellulaire d'une manière différente des autres membres de la famille Bcl-2. La mort cellulaire induite par Bnip3 présente des caractéristiques apoptotiques et nécrotiques, et son mécanisme d'action n'est pas tout à fait élucidé. En conditions normales, Bnip3 est exprimé à un niveau basal et est localisé dans le cytosol ou dans la membrane mitochondriale externe. Il a été montré que l'expression de Bnip3 augmente en hypoxie et que le facteur de transcription HIF-1 est responsable de cette régulation (Sowter *et al*, 2001). Actuellement, il existe deux hypothèses opposées concernant le rôle de Bnip3 dans la réponse au stress hypoxique. La première affirme que suite à un stimulus (signal de mort ou stress hypoxique), l'expression de Bnip3 augmente et celui-ci va s'intégrer dans la membrane mitochondriale externe où il induit la mort cellulaire via l'ouverture du PTP. Il semble également que Bnip3 puisse activer Bax et Bak en séquestrant Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>. Cependant, la mort cellulaire induite par Bnip3 semble être indépendante de Apaf-1, de l'activation des caspases et de la libération du cytochrome c (Mellor and Harris, 2007 ; Vande Velde *et al*, 2000). La seconde hypothèse, basée sur des études plus récentes, soutient que Bnip3, dans certaines conditions, joue un rôle dans l'activation de l'autophagie. L'autophagie représente un mécanisme de mort cellulaire mais également un mécanisme de protection face à une éventuelle mort cellulaire induite par divers stress tels que l'hypoxie ou une déprivation en nutriments. Dans ce cas, Bnip3 serait impliqué dans l'induction d'un mécanisme de survie cellulaire (Daido *et al*, 2004).

### Voie du réticulum endoplasmique

Après la mitochondrie, le réticulum endoplasmique est le second compartiment subcellulaire à participer à l'apoptose via la voie intrinsèque. Le réticulum est le principal réservoir d'ions calcium et la libération du calcium depuis le réticulum vers le cytosol puis la mitochondrie est requise pour induire l'apoptose et la libération du cytochrome c. Des études de plus en plus nombreuses démontrent que les membres de la famille Bcl-2 agissent au niveau du réticulum.



**Figure I.10:** Les protéines de la famille Bcl-2 dans des conditions de repos et dans des conditions de stress au niveau de réticulum endoplasmique. Dans des conditions de repos, les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak sont inhibées via leur interaction avec Bcl-2 au niveau de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique. Un stress au réticulum induit l'activation de la kinase JNK qui inhibe l'action anti-apoptotique de Bcl-2 en la phosphorylant. Cette modification permet l'activation de Bax et Bak, la transmission du signal depuis le réticulum vers la mitochondrie et l'exécution de la mort cellulaire. Des caspases peuvent être activées au niveau de la membrane du réticulum ou dans l'apoptosome après transmission du signal vers la mitochondrie et la libération du cytochrome c. Les protéines en bleu sont inactives et les protéines en rouge sont actives, avec les formes rondes représentant les protéines pro-apoptotiques et les rectangles les anti-apoptotiques (Szegezdi *et al*, 2006).

Bcl-2 inhiberait l'apoptose induite par un stress du réticulum endoplasmique et Bax et Bak joueraient un rôle dans la libération du calcium depuis le réticulum jusqu'au cytosol. Des études ont démontré que Bak et Bax sont également capables d'activer la caspase 12 au niveau de réticulum endoplasmique dans les cellules murines ou de rat. Suite à son activation, la caspase 12 est transloquée depuis le réticulum endoplasmique jusqu'au cytosol où elle va cliver la pro-caspase 9 et activer la caspase 3 (Figure I.10). Cependant, l'homologue de la caspase 12 chez l'homme n'a pas encore été identifié rendant cette hypothèse controversée (Jin and El-Deiry, 2005 ; Szegezdi *et al*, 2006).

### **2.1.4. Interaction entre les voies extrinsèque et intrinsèque**

Bid, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, sert de lien entre l'apoptose induite par la voie extrinsèque et celle initiée par la voie intrinsèque. Bid est une protéine «BH3 only» localisée dans le cytosol en absence de signal de mort. L'activation de l'apoptose via la voie extrinsèque (liaison d'un ligand aux récepteurs de mort Fas et TNFR) résulte en l'activation de la caspase 8. Dans les cellules de type I, l'activation de la caspase 8 suivie de l'activation de la caspase 3 est suffisante pour induire l'apoptose. Dans les cellules de type II, une amplification du signal passant par la mitochondrie est nécessaire pour l'activation de l'apoptose. Cette amplification est rendue possible par le clivage de Bid cytosolique en une forme tronquée. Cette forme tronquée appelée tBid devient active suite à un changement de conformation. tBid transloque au niveau de la membrane mitochondriale externe où il interagit avec Bak et induit son oligomérisation. tBid peut également interagir avec Bax, qu'il active, et Bcl-2, qu'il inhibe (Korsmeyer *et al*, 2000).

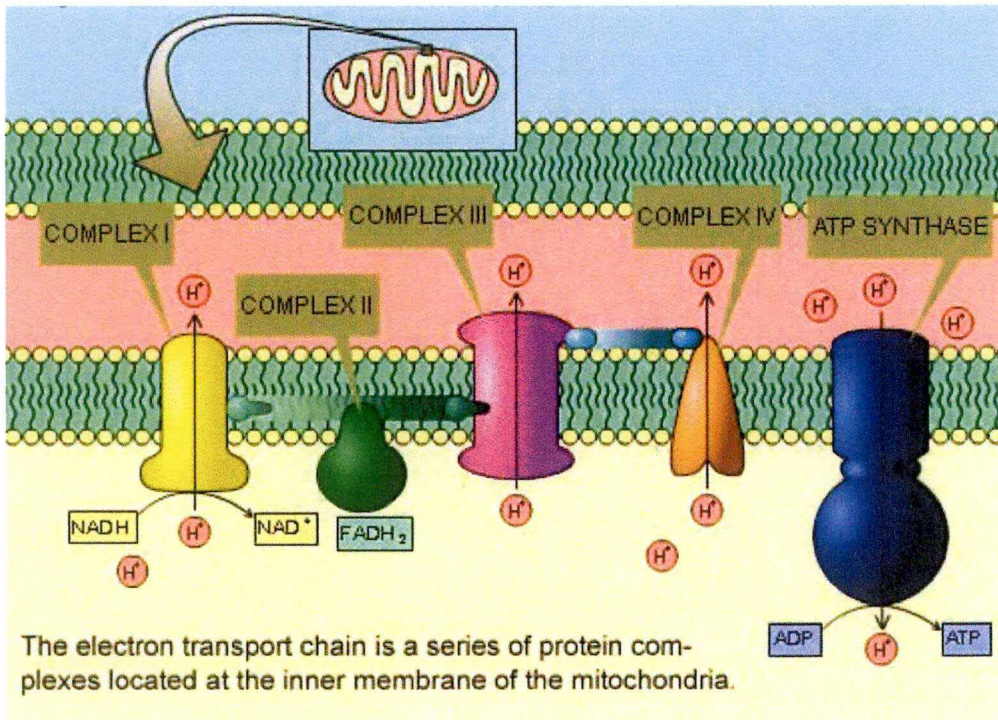
### **2.1.5. Cancer et apoptose**

Les cellules cancéreuses présentent de nombreuses anomalies au niveau de la stabilité de leur génome car elles présentent un déficit dans le système de contrôle de la réplication ou dans leur système de réparation de l'ADN. Ce déficit engendre l'apparition de mutations qui vont permettre aux cellules cancéreuses de proliférer de manière incontrôlée et de devenir immortelles. Lors du développement d'une tumeur, ce sont les cellules tumorales ayant su s'adapter aux conditions environnementales et ayant acquis une résistance vis-à-vis des traitements chimiothérapeutiques qui sont sélectionnées et vont donner naissance à de nouveaux clones à partir desquels se développe la tumeur. Les cellules tumorales résistent aux agents chimiothérapeutiques car elles ont acquis la capacité de bloquer l'apoptose. Ce blocage peut être le résultat de la diminution ou de l'inhibition de l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bak, de l'augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Mcl-1 et Bcl-2 ou de l'inactivation de facteurs de transcription qui induisent la mort cellulaire tels que p53 ou myc. Outre la résistance face aux agents chimiothérapeutiques, les cellules tumorales s'adaptent également aux conditions environnementales qui pourraient être délétères à leur survie et vont même jusqu'à en tirer profit. Un très bel exemple illustrant ce phénomène est l'adaptation des cellules cancéreuses à l'hypoxie et leur résistance face aux agents chimiothérapeutiques induite par l'hypoxie elle-même.

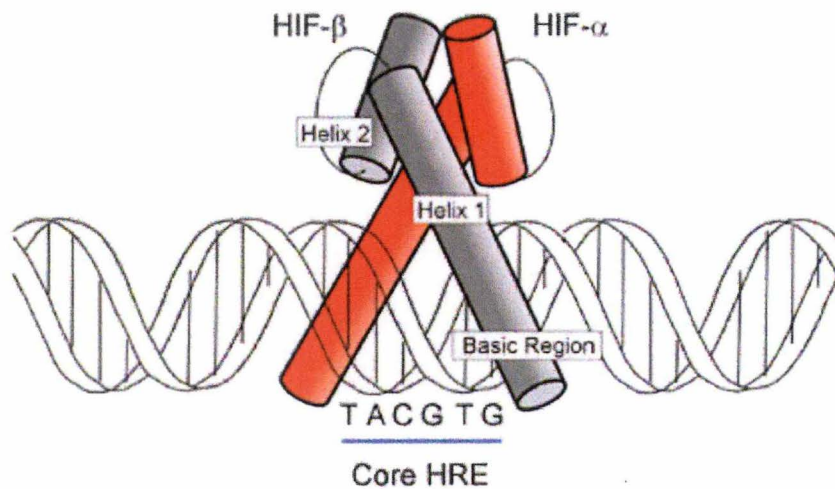
## **3. L'hypoxie**

### **3.1. L'oxygène et l'hypoxie dans les cellules**

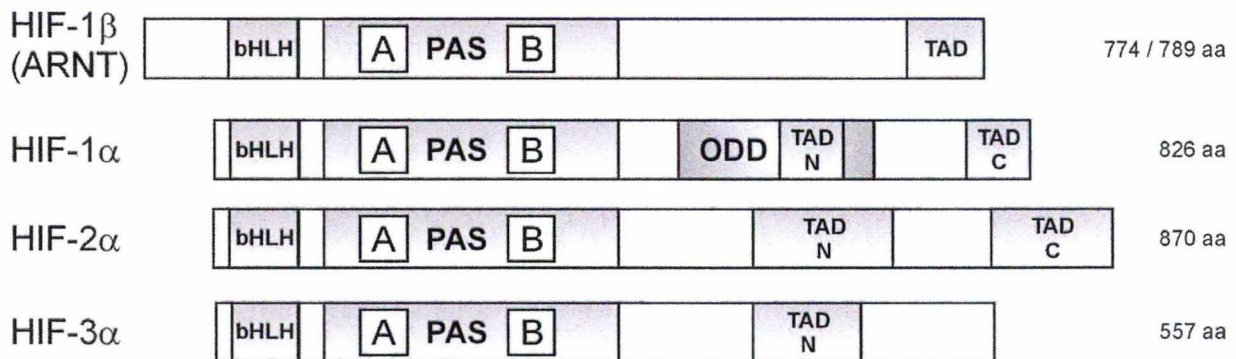
Les cellules eucaryotes ont besoin d'énergie pour se développer, remplir leurs fonctions et pour vivre. Cette énergie est fournie grâce à l'hydrolyse de l'ATP et d'autres molécules phosphatées riches en énergie. La majorité du stock d'ATP disponible dans une cellule est fournie par la phosphorylation oxydative qui se déroule au niveau de la membrane



**Figure I.11:** Chaîne de transport des électrons. Complexe I : NADH-coenzyme Q oxydoréductase, complexe II : succinate-coenzyme Q oxydoréductase, complexe III : coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase, complexe IV : cytochrome c oxydase, complexe V : ATP synthase (<http://hopes.stanford.edu/treatmts/ebuffer/j1.html>).



**Figure I.12 :** Représentation des domaines bHLH de l'hétérodimère HIF-1 $\alpha$ - ARNT se fixant sur la séquence HRE. Les résidus basiques à l'extrémité N-terminale de chaque protéine facilitent la fixation à l'ADN (Lisy and Peet, 2008).



**Figure I.13:** Représentation schématique des domaines structuraux des protéines HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  : on retrouve les domaines bHLH (basic helix loop helix), PAS, et les domaines de transactivation NH<sub>2</sub>-and COOH-terminal (TAD-N and TAD-C). La sous-unité HIF-3 $\alpha$  ne possède pas de domaine TAD-C (Hopfl *et al*, 2004).

mitochondriale interne par la chaîne de transport des électrons et l'ATP synthase (Figure I.11). Ce processus consomme une quantité d'oxygène proportionnelle à l'utilisation de l'ATP dans les cellules. En hypoxie, la diminution d'oxygène limite la production d'ATP et menace la survie des cellules. C'est pourquoi les cellules ont développé des mécanismes complexes afin de pouvoir s'adapter à l'hypoxie et d'assurer une alimentation en oxygène suffisante pour leur survie.

### **3.2. Réponse systémique**

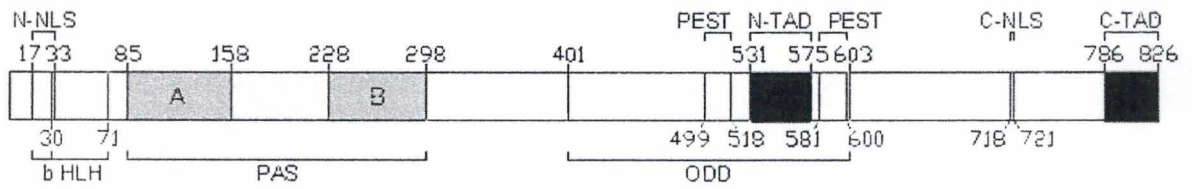
Lorsque l'hypoxie est de courte durée, la diminution de la pression en oxygène locale est rapidement détectée entraînant une réponse rapide permettant à l'organisme de s'adapter. Cette diminution en oxygène est perçue grâce à des chémorécepteurs spécifiques, tels que les corps carotidiens dans la circulation artérielle et les corps neuroépithéliaux dans le système respiratoire. Suite à la détection d'une diminution de l'oxygène, ces chémorécepteurs libèrent des neurotransmetteurs ou des neuromédiateurs qui vont activer des fibres sensorielles efférentes. Une augmentation du rythme cardiaque et de la ventilation s'en suit. Les cellules musculaires lisses présentes au niveau des vaisseaux sanguins sont également capables de détecter une diminution de la concentration en oxygène et d'engendrer une réponse adaptative à l'hypoxie via la constriction des vaisseaux sanguins pulmonaires et la dilatation des vaisseaux sanguins périphériques favorisant la redistribution du sang vers les tissus privés d'oxygène (Michiels, 2004 ; Tansey, 2007).

### **3.3. Réponse cellulaire**

Outre les acteurs cités ci-dessus, toute cellule nucléée est capable de ressentir une diminution de la concentration en oxygène et de s'adapter à celle-ci. Lorsque la disponibilité en oxygène devient limitée, la production d'ATP via la chaîne de transport d'électrons et la phosphorylation oxydative diminue. Par conséquent, les processus consommant beaucoup d'énergie et n'étant pas prioritaires pour la survie cellulaire (tels que la synthèse protéique et la synthèse d'ADN) sont inhibés, par opposition au transport d'ions qui est un processus prioritaire (Young and Anderson, 2008). Si l'hypoxie se prolonge, la réponse engendrée est beaucoup plus complexe et s'effectue via une régulation de l'expression génique permettant à la cellule de s'adapter pour une longue durée. Le principal facteur de transcription activé en hypoxie et impliqué dans l'adaptation des cellules à l'hypoxie est HIF-1 (hypoxia inducible factor 1).

### **3.4. Le facteur de transcription HIF-1**

HIF-1, le principal facteur de transcription activé en hypoxie, est un hétérodimère composé de deux sous-unités, HIF-1 $\alpha$  et ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) aussi appelé HIF-1 $\beta$ . Ces deux sous-unités appartiennent à la famille des protéines contenant les domaines BHLH-PAS (basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim homology). En conditions d'hypoxie, le facteur de transcription HIF-1 peut se fixer au niveau d'une séquence de cinq nucléotides, A/GCGTG, appelée HBS (HIF-1 DNA binding site) présente au niveau des régions de régulation des gènes cibles, HRE (hypoxia responsive element). Les domaines BHLH-PAS sont nécessaires à la dimérisation des sous-unités HIF-1 $\alpha$  et ARNT et le domaine BHLH permet la liaison de HIF-1 à l'ADN (Figure I.12). Il existe d'autres isoformes de HIF-1 $\alpha$  et ARNT: HIF-2 $\alpha$  aussi connu sous le nom de EPAS (endothelial PAS protein), HIF-3 $\alpha$ , ARNT2 et ARNT3 (Figure I.13). Bien que leur structure, régulation et fonctions semblent similaires, l'expression de HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ , ARNT2 et ARNT3 semble limitée à certains tissus, ce qui leur confère peut-être un rôle plus limité ou plus spécifique dans l'homéostasie de l'oxygène. Par exemple, l'ARNm de HIF-2 $\alpha$  est exprimé dans les cellules endothéliales



**Figure I.14 :** Structure de la protéine HIF-1 $\alpha$ . Depuis l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, la protéine HIF-1 $\alpha$  comprend un domaine bHLH, deux domaines PAS, A et B, un domaine ODD contenant deux motifs PEST, un domaine N-TAD et un domaine C-TAD et deux signaux de localisation nucléaire (NLS) (Zagorska and Dulak, 2004).

des vaisseaux en développement, dans les cellules pulmonaires fœtales et dans les cellules produisant de la cathécholamine (Semenza, 2000). Concernant HIF-3 $\alpha$ , sa fonction n'est pas complètement élucidée, mais il semble que cette protéine jouerait le rôle d'inhibiteur du facteur HIF-1. En effet, il a été démontré qu'un variant de splicing de HIF-3 $\alpha$  est capable d'inhiber HIF-1 en agissant comme mutant dominant négatif car il ne possède pas de domaine de transactivation (Semenza, 2000 ; Zagorska and Dulak, 2004 ; Maynard *et al.*, 2007).

### **3.4.1. Structure de HIF-1 $\alpha$**

HIF-1 $\alpha$  (Figure I.14) est une protéine de 826 acides aminés, constitutivement transcrite et traduite dans les cellules mais rapidement dégradée en normoxie (cette sous-unité possède une demi-vie très courte, inférieure à 10 minutes). Ce n'est que lorsque la concentration en oxygène diminue dans la cellule (en hypoxie) que la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est stabilisée. Après sa translocation dans le noyau, elle interagit avec ARNT pour former le facteur de transcription HIF-1.

HIF-1 $\alpha$  possède deux domaines de transactivation du côté C terminal, C-TAD (aa 786 à 826) et N-TAD situé plus au centre (aa 532 à 575). Ces deux domaines de transactivation permettent le recrutement de co-activateurs tels que CPB ou p300. N-TAD se superpose au domaine ODD (Oxygen Dependent Degradation) (aa 401 à 603) au niveau duquel on retrouve des motifs PEST (proline P, acide glutamique E, sérine S, thréonine T) qui sont responsables de la dégradation de HIF-1 $\alpha$  par le protéasome en normoxie. L'autre moitié de la sous-unité HIF-1 $\alpha$ , du côté N-terminal, contient le domaine basique HLH (aa 31 à 71) et deux domaines PAS (aa 85 à 298) A et B, qui sont requis pour la dimérisation de HIF-1 $\alpha$  avec ARNT et la liaison à l'ADN au niveau de la séquence HBS. La protéine contient également deux signaux de localisation nucléaire (NLS) au niveau des extrémités N-terminale (aa 17 à 74) et C-terminale (aa 718 à 721) de HIF-1 $\alpha$  (Chun, Kim *et al.* 2002; Lisy and Peet 2008).

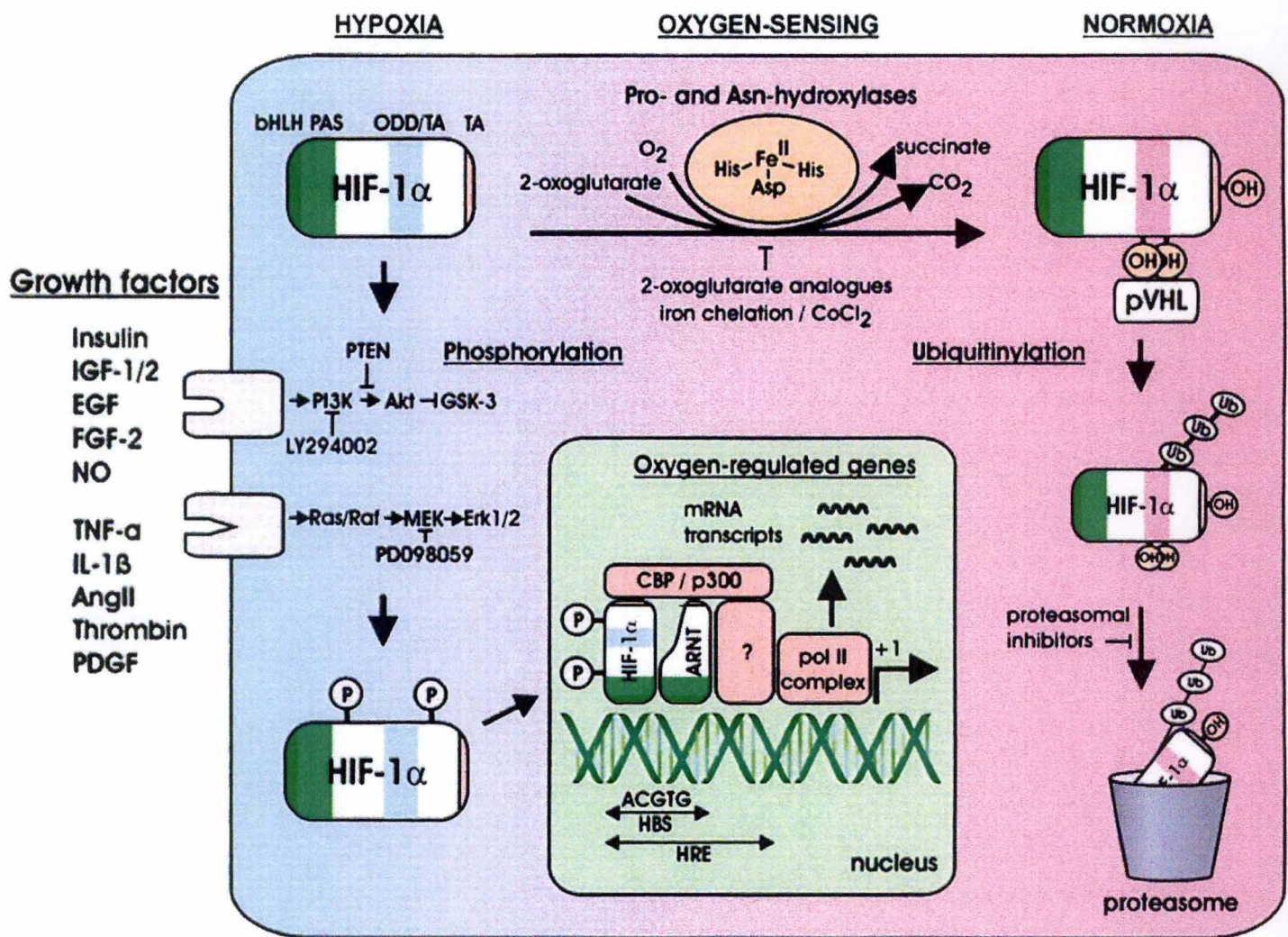
### **3.4.2. Structure de ARNT**

ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator) fut d'abord identifiée en tant que protéine interagissant avec le récepteur aryl hydrocarbon (AHR). Cette sous-unité, appartenant également à la famille des protéines à domaine bHLH, est constitutivement exprimée et est localisée dans le noyau. Elle hétérodimérise avec la sous-unité HIF-1 $\alpha$ , via les domaines HLH et PAS, lorsque celle-ci est stabilisée en hypoxie, pour former le facteur de transcription HIF-1 (Wang *et al.*, 1995 ; Reisz-Porszasz *et al.*, 1994 ; Weidemann and Johnson, 2008).

### **3.4.3. Régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 par l'oxygène**

L'activité transcriptionnelle de HIF-1 est régulée via la stabilisation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  mais également via d'autres mécanismes. Cette régulation s'effectue de manière dépendante ou indépendante de l'oxygène. La stabilisation de HIF-1 $\alpha$  est régulée par la concentration en oxygène, par la présence de facteurs de croissance ou de ROS (reactive oxygen species). Une fois le facteur de transcription stabilisé, son activité transcriptionnelle n'est pas pleinement activée. D'autres modifications vont être apportées à HIF-1 pour le rendre pleinement actif. Ces modifications incluent la phosphorylation post-traductionnelle de HIF-1 et le recrutement de cofacteurs via des interactions protéine-protéine.

En normoxie (20% d'oxygène), le facteur de transcription HIF-1 est peu ou pas actif car l'hétérodimère HIF-1 $\alpha$ /ARNT n'est pas formé. En effet, la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est hydroxylée au niveau de deux résidus prolines conservés (résidus 564 et 402) présents dans le domaine ODD par trois proline hydroxylases (PHD 1-3). Ces enzymes font partie de la superfamille des dioxygénases qui utilisent l'oxygène et le 2-oxoglutarate comme co-substrats et le fer II et l'ascorbate comme co-facteurs. Ces enzymes sont considérées comme étant des senseurs à



**Figure I.15 :** Représentation simplifiée de la régulation de HIF-1. En condition d'hypoxie, la sous-unité HIF-1 $\alpha$  n'est plus hydroxylée, est stabilisée, subit des modifications et transloque dans le noyau où elle dimérise avec ARNT, recrute des cofacteurs et active l'expression de ses gènes cibles. En normoxie, le domaine ODD de HIF-1 $\alpha$  est hydroxylé par des prolyl-hydroxylases dépendantes de l'oxygène (ciblant HIF-1 $\alpha$  pour sa dégradation protéolytique médiée par pVHL) et le domaine TAD carboxyl-terminal est hydroxylé par une asparaginyl-hydroxylase dépendante de l'oxygène (bloquant l'interaction avec les coactivateurs CBP/p300). bHLH, basic helix-loop-helix; HBS, HIF-1 binding site; HRE, hypoxia response element; ODD, oxygen-dependent degradation; OH, hydroxylation; P, phosphorylation; PAS, Per-AhR/ARNT-SIM; TA trans-activation; Ub, ubiquitine (Wenger, 2002).

oxygène car leur activité est diminuée lorsque la disponibilité en oxygène diminue. L'activité enzymatique de ces hydroxylases diminue également si la disponibilité en 2-oxoglutarate diminue ou si le fer II est chélaté ou oxydé en fer III (Fong and Takeda, 2008). Une fois les résidus prolines hydroxylés, ceux-ci sont reconnus par la protéine de von Hippel-Lindau (pVHL). Cette protéine est la sous-unité E3 d'un complexe ubiquitine ligase, comprenant également l'élongine B et l'élongine C, capable d'ubiquitiner la sous-unité HIF-1 $\alpha$  pour induire sa dégradation par le protéasome. En hypoxie, suite à la diminution de la disponibilité en oxygène, l'activité des PHD diminue et les résidus prolines de HIF-1 $\alpha$  ne sont plus hydroxylés. La sous-unité HIF-1 $\alpha$  est alors stabilisée car elle n'est plus reconnue par la pVHL et donc n'est plus dégradée par le protéasome. Une fois la sous-unité HIF-1 $\alpha$  stabilisée, elle transloque dans le noyau où elle dimérise avec ARNT pour former le facteur de transcription HIF-1 (Bruick, 2003 ; Weidemann and Johnson, 2008) (Figure I.15).

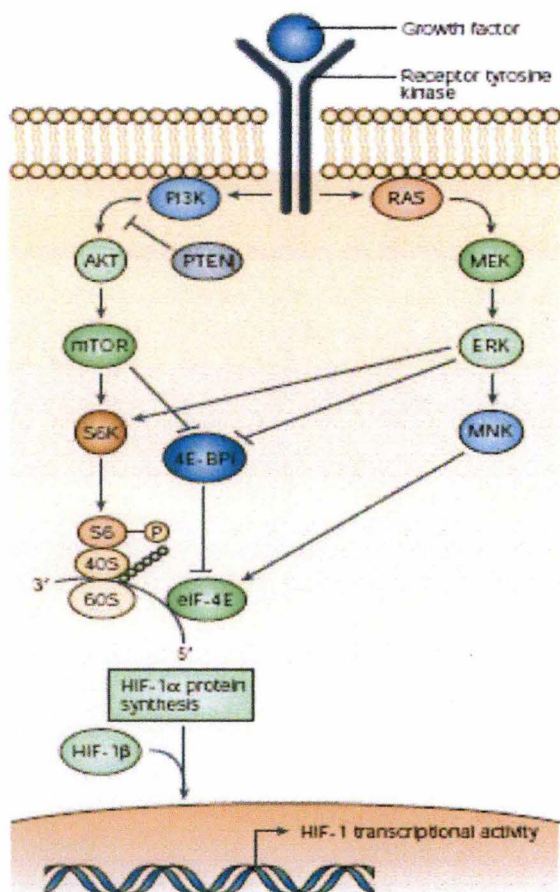
Cette stabilisation de HIF-1 $\alpha$  n'est pas suffisante pour permettre à HIF-1 d'être pleinement actif transcriptionnellement. En effet, l'association de HIF-1 avec des co-activateurs tels que CBP et p300 au niveau des domaines de transactivation est également requise. Ces co-activateurs augmentent l'activation transcriptionnelle de HIF-1 en favorisant la liaison de HIF-1 avec la machinerie basale de transcription et en possédant une activité histone acétyltransférase (HAT) servant à « ouvrir » la chromatine et favoriser la transcription. L'association de HIF-1 avec ses cofacteurs est régulée par l'hydroxylation au niveau du domaine C-TAD d'un résidu asparagine C-terminal (résidu 803) par une asparagine hydroxylase appelée **FIH-1** (Factor Inhibiting HIF). Cette enzyme, comme les PHD, appartient à la superfamille des dioxygénases. En normoxie, cette hydroxylation inhibe l'interaction entre le domaine N-TAD de HIF-1 et ses co-activateurs CBP/p300. En hypoxie, l'activité de FIH-1 diminue, HIF-1 n'est plus hydroxylé et il peut alors interagir avec ses cofacteurs (Lisy and Peet, 2008). D'autres co-activateurs possédant une activité HAT sont également recrutés au niveau des domaines de transactivation de HIF-1 tels que SRC-1, TIF-2 et Ref-1 (Carrero *et al.*, 2000, Wenger 2002).

Cependant, l'hypothèse selon laquelle le rôle des PHDs en tant que senseurs directs de l'oxygène suffit pour induire la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  est controversée. En effet, des études récentes ont démontré que d'autres voies de signalisation sont impliquées dans la détection de l'hypoxie et que la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est également stabilisée en normoxie. Ces voies alternatives sont brièvement développées au point suivant.

#### **3.4.4. Régulation de HIF-1 indépendante de l'oxygène**

##### Les ROS

Il existe plusieurs hypothèses encore controversées pour expliquer la signalisation de l'hypoxie suite à une production accrue ou diminuée de ROS dans la cellule. Selon la première hypothèse, les ROS sont continuellement produits dans les cellules (via l'action d'une NADPH oxydase et de la superoxyde dismutase (SOD)) et lorsque la disponibilité en oxygène diminue, le taux de ROS produits diminue. La diminution de ROS représenterait un signal direct ou indirect pour induire la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  (Zagorska and Dulak, 2004). La seconde hypothèse, totalement opposée à la première, propose qu'en hypoxie, il y ait une augmentation de la production de ROS par le complexe III de la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie. Cette augmentation de ROS dans le cytosol induirait la stabilisation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$ . Une dernière hypothèse suggère qu'en hypoxie, la mitochondrie utilise la plupart de l'oxygène disponible provoquant une hypoxie intense au niveau du cytosol avec une concentration en oxygène insuffisante pour permettre aux PHDs d'être actives (Klimova and Chandel, 2008).

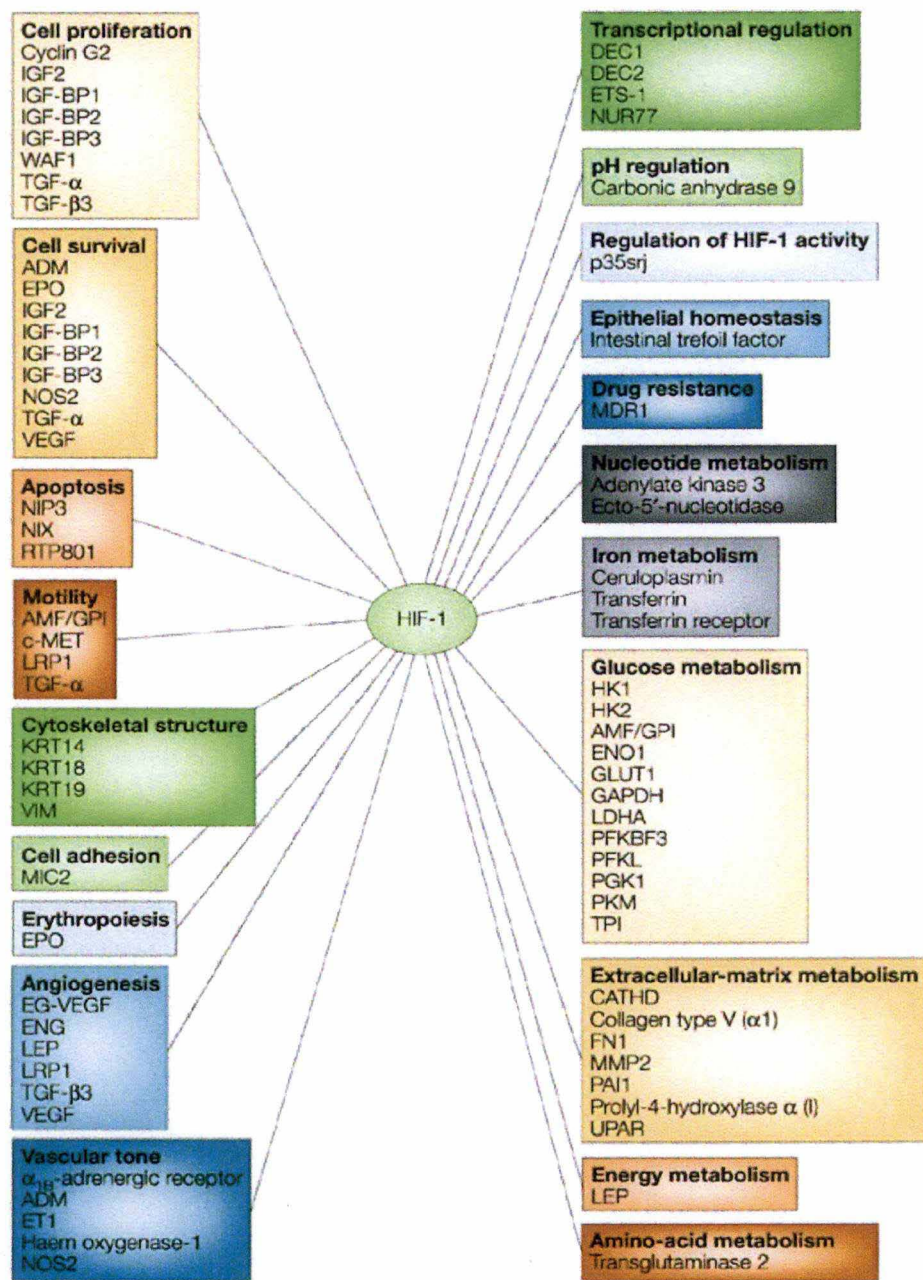


**Figure I.16** : Régulation de la synthèse protéique de HIF-1 $\alpha$ . Suite à la liaison d'un facteur de croissance à un récepteur tyrosine kinase, les kinases PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et MAPK (mitogen-activated protein kinase) sont activées. La PI3K active la kinase AKT (sérine thréonine kinase) aussi connue sous le nom de PKB (protéine kinase B) et mTOR (mammalian target of rapamycin). Dans la voie des MAPK, la kinase ERK (extracellular-signal-regulated kinase) est activée par la kinase MEK (MAP/ERK). Ensuite, ERK active MNK. ERK et mTOR vont phosphoryler la kinase p70 S6 (S6K) qui va phosphoryler la protéine ribosomiale S6 et 4E-BPI (eukaryotic translation initiator factor 4E (eIF-4E) binding protein). La liaison de 4E-BPI à eIF-4E inhibe ce dernier, ce qui inhibe la traduction de l'ARNm. La phosphorylation de 4E-BPI empêche cette liaison à eIF-4E. MNK phosphoryle eIF-4E et stimule directement son activité. L'activation de cette voie de signalisation par les facteurs de croissance a pour effet d'augmenter le taux de traduction des ARNm (incluant l'ARNm d'HIF-1 $\alpha$ ) en protéines dans la cellule (Semenza, 2003).

Protein

PHD1/HPH3 (prolyl hydroxylation)  
PHD2/HPH2 (prolyl hydroxylation)  
PHD3/HPH1 (prolyl hydroxylation)  
pVHL (ubiquitinylation)  
PSMA7 (proteasomal degradation)  
HSP90 (folding/stability)  
p53 (stability)  
Jab1 (stability)  
ARNT (heterodimerization)  
p42/p44 ERK (phosphorylation)  
GSK-3 (phosphorylation)  
Per1 (circadian rhythm)  
Transcriptional cofactors  
CBP/p300 (histone acetyltransferases)  
SRC-1 (histone acetyltransferase)  
TIF2 (histone acetyltransferase)  
Ref-1 (redox factor)  
HNF4 (gene-specificity)  
Smad3 (gene-specificity)  
FIH-1 (inhibitor)  
p14<sup>ARF</sup> (nucleolar sequestration)

**Tableau I.3:** Liste des protéines interagissant avec HIF-1 (Wenger, 2002).



**Figure I.17:** Liste des gènes impliqués dans divers processus cellulaires et dont l'expression est activée par HIF-1. ADM, adrenomedullin; ALDA, aldolase A; ALDC, aldolase C; AMF, autocrine motility factor; CATHD, cathepsin D; EG-VEGF, endocrine-gland-derived VEGF; ENG, endoglin; ET1, endothelin-1; ENO1, enolase 1; EPO, erythropoietin; FN1, fibronectin 1; GLUT1, glucose transporter 1; GLUT3, glucose transporter 3; GAPDH, glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase; HK1, hexokinase 1; HK2, hexokinase 2; IGF2, insulin-like growth-factor 2; IGF-BP1, IGF-factor-binding-protein 1; IGF-BP2, IGF-factor-binding-protein 2; IGF-BP3, IGF-factor-binding-protein 3; KRT14, keratin 14; KRT18, keratin 18; KRT19, keratin 19; LDHA, lactate dehydrogenase A; LEP, leptin; LRP1, LDL-receptor-related protein 1; MDR1, multidrug resistance 1; MMP2, matrix metalloproteinase 2; NOS2, nitric oxide synthase 2; PFKFBF3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-3; PFKL, phosphofructokinase L; PGK 1, phosphoglycerate kinase 1; PAI1, plasminogen-activator inhibitor 1; PKM, pyruvate kinase M; TGF- $\alpha$ , transforming growth factor- $\alpha$ ; TGF- $\beta$ 3, transforming growth factor- $\beta$ 3; TPI, triosephosphate isomerase; VEGF, vascular endothelial growth factor; UPAR, urokinase plasminogen activator receptor; VEGFR2, VEGF receptor-2; VIM, vimentin.

### Les facteurs de croissance

Il a été démontré que l'activité transcriptionnelle de HIF-1 pouvait être augmentée en normoxie suite à l'activation des récepteurs à tyrosine kinase par des facteurs de croissance (Figure I.15). Ce mécanisme n'induit pas la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  mais plutôt sa phosphorylation par les MAPKs (mitogen activated protein kinases) ERK 2, ERK1 via la voie Ras-Raf-MEK-ERK. D'autre part, l'activation de la voie PI3K-AKT-mTOR par les facteurs de croissance induit une augmentation de la synthèse protéique de HIF-1 $\alpha$  menant à la saturation du système de dégradation de HIF-1 $\alpha$  dépendant de l'oxygène. En effet, mTOR est une kinase capable d'augmenter de manière indirecte la traduction de certains ARNm (dont HIF-1 $\alpha$ ) en protéine (Figure I.16) (Hopfl *et al*, 2004). Parmi les facteurs de croissance et les cytokines capables de réguler l'activité de HIF-1, on trouve EGF, IGF-1, IGF-2, l'insuline et TNF- $\alpha$ . Il est intéressant de savoir qu'un tiers des cancers du sein présentent une activité augmentée du récepteur HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) et par conséquent une surexpression de HIF-1 $\alpha$  dans ces cellules cancéreuses (Laughner *et al*, 2001 ; Semenza, 2003 ; Wenger 2002).

### Interactions protéine-protéine

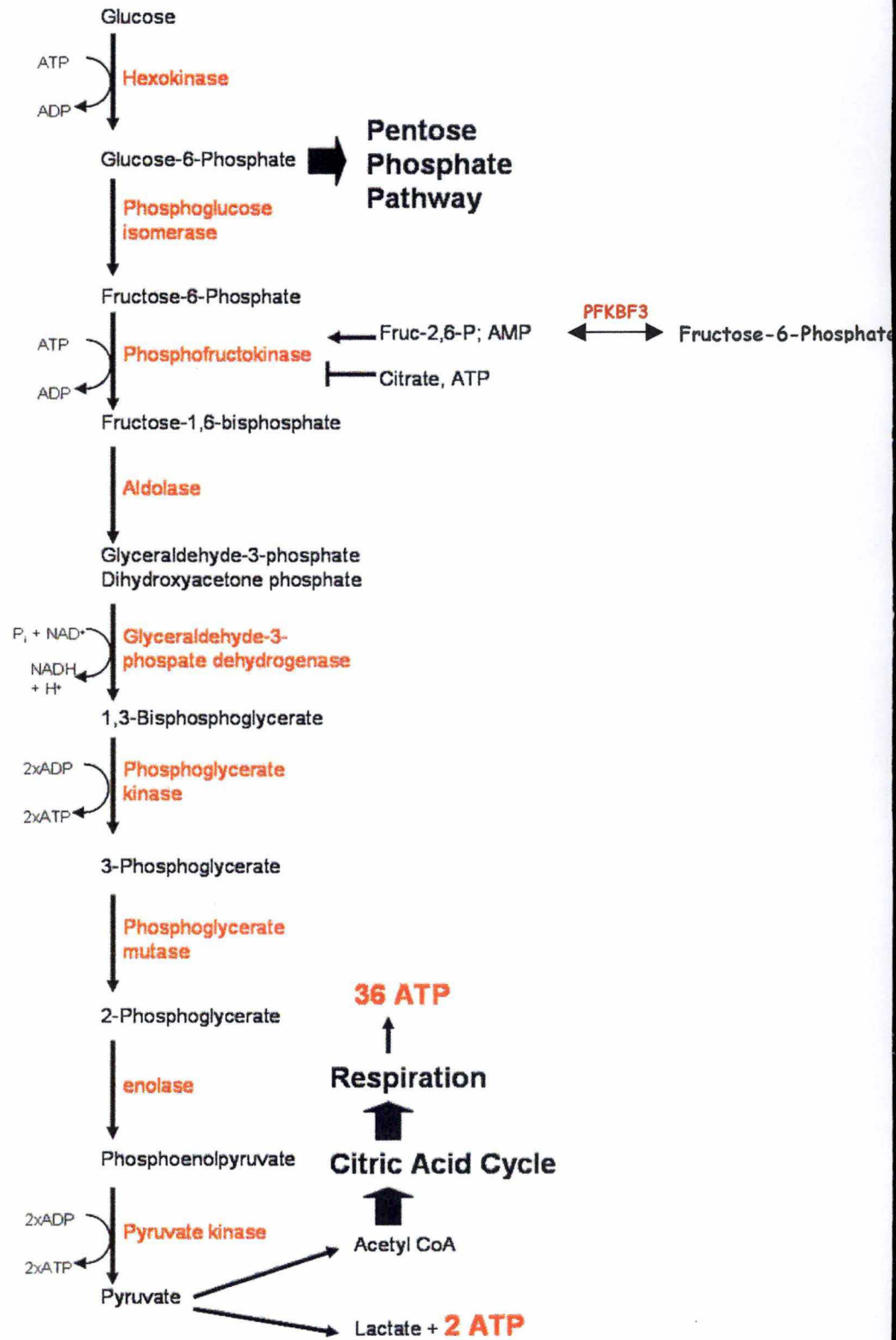
Outre CBP, p300, SRC-1 et TIF-2, d'autres cofacteurs et facteurs de transcription peuvent se lier à HIF-1 et réguler son activité (Tableau I.3). Parmi ceux-ci, on trouve le facteur de transcription suppresseur de tumeur p53. La stabilisation de p53 est inductible en hypoxie. Il a été démontré que p53 interagit directement avec le domaine ODD de HIF-1 $\alpha$  ou interagit avec HIF-1 $\alpha$  par l'intermédiaire de Hdm2 et que cette interaction inhibe directement l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Une autre hypothèse affirme que p53, en se liant à son cofacteur p300, atténue l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en créant une compétition pour la liaison à p300 (Schmid *et al*, 2004). Outre une diminution de l'activité transcriptionnelle de HIF-1, cette interaction peut être responsable de la dégradation de HIF-1 $\alpha$  par le protéasome via son ubiquitination par Hdm2. En effet, Hdm2 présente une activité E3-ligase spécifique à p53 qui induit sa dégradation par le protéasome et il semble que Hdm2 soit également capable d'ubiquitiner HIF-1. Il est intéressant de constater que même si p53 est inactif transcriptionnellement, comme c'est souvent le cas dans les cellules cancéreuses (les mutations touchant p53 sont les événements les plus fréquents dans les cancers et sont présentes dans 20 à 30% des cancers du sein (Lacroix *et al*, 2006)), il est capable de réguler l'activité de HIF-1.

## **3.5. Adaptation cellulaire à l'hypoxie**

Actuellement, une soixantaine de gènes dont l'expression est régulée par HIF-1 ont été découverts (Figure I.17). Ces gènes sont impliqués dans divers processus cellulaires mais ont tous en commun de favoriser l'adaptation des cellules à l'hypoxie. Les gènes directement régulés par HIF-1 sont impliqués dans le métabolisme du glucose, l'oxygénation des tissus et la néoangiogenèse.

### **3.5.1. Métabolisme du glucose**

En hypoxie, les cellules régénèrent leur ATP non plus via la respiration mitochondriale dépendante de l'oxygène mais via la glycolyse ou phosphorylation au niveau du substrat. Le rendement de la glycolyse est de 2 moles d'ATP par mole de glucose ce qui est faible par rapport au rendement de la respiration mitochondriale (36 moles d'ATP par mole de glucose). Cependant, la quantité d'ATP produit est suffisante pour permettre à la cellule de survivre car l'internalisation du glucose est augmentée et la voie de la glycolyse est activée (Figure I.18). Dans un premier temps, une régulation allostérique des enzymes glycolytiques et une augmentation du transport de glucose dans la cellule permettent d'activer la glycolyse. Par



**Figure I.18** : Représentation schématique de la glycolyse et des enzymes catalysant les différentes réactions.

exemple, une augmentation de la concentration en AMP dans la cellule va augmenter l'activité de la phosphofructokinase par une régulation allostérique. A plus long terme, l'adaptation se réalise grâce à une modification de l'expression génique visant à augmenter l'expression des enzymes glycolytiques et l'expression des transporteurs de glucose. Ce phénomène est appelé « effet Warburg » (Young and Anderson, 2008) et est en grande partie dépendant de HIF-1. Celui-ci induit la surexpression des transporteurs de glucose GLUT-1 et GLUT-3 et de presque toutes les enzymes glycolytiques, dont la phosphoglycérate kinase 1, la lactate déhydrogénase A, la pyruvate kinase M (Semenza *et al.*, 2002), la glycéraldéhyde-phosphate déhydrogénase, l'énolase 1 et la PFKFB3. Cette dernière est responsable de la synthèse d'un régulateur allostérique (le fructose 2,6 biphosphate) de la phosphofructokinase. La PFKFB3 est une enzyme bi-fonctionnelle dont l'activité diffère en fonction des conditions : l'AMP induit l'activité phosphofructo-2-kinase et l'ATP induit l'activité fructose 2,6 biphosphatase de l'enzyme. Cette régulation du métabolisme par HIF-1 lui attribue un rôle important dans l'adaptation et la survie des cellules en hypoxie (Semenza, 2007).

### 3.5.2. Oxygénation des tissus

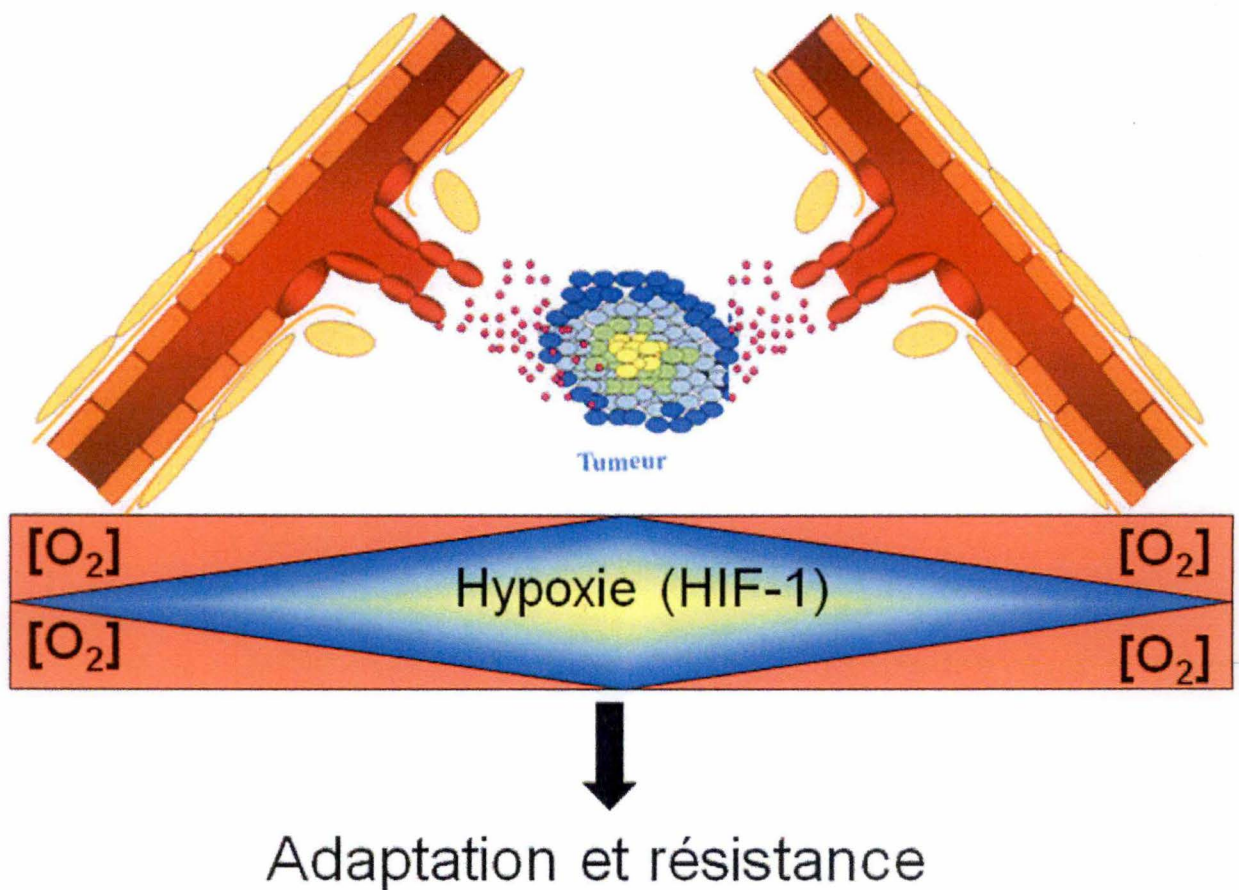
En hypoxie, lorsqu'il y a une diminution de la concentration en oxygène dans les tissus et dans le sang, HIF-1 active la production d'EPO (érythropoïétine). L'EPO est une hormone glycoprotéique qui favorise la viabilité et induit la prolifération et la différenciation des précurseurs érythropoïétiques, résultant en une augmentation de globules rouges et donc en une augmentation de l'oxygénation des tissus (Stockmann and Fandrey, 2006). Parallèlement à l'augmentation d'EPO, HIF-1 augmente l'expression de la transferrine qui permet le transport intracellulaire du fer nécessaire à la synthèse de l'hémoglobine au cours de l'érythropoïèse (Rolfs *et al.*, 1997).

### 3.5.3. Néoangiogenèse

La néoangiogenèse consiste à former de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de capillaires préexistants en mobilisant l'endothélium et en induisant la prolifération des cellules endothéliales. Le facteur de croissance le plus important dans le processus d'angiogenèse est le VEGF (vascular endothelial growth factor). Le VEGF, dont l'expression est régulée par HIF-1, induit le développement de nouveaux vaisseaux sanguins en stimulant la prolifération et la migration des cellules endothéliales ayant pour conséquence une meilleure vascularisation des tissus sous-oxygénés. Un autre effet important du VEGF est l'induction de la perméabilisation vasculaire contribuant à l'écoulement de liquide interstitiel. De plus, le flux sanguin peut être amélioré grâce à une vasodilatation des vaisseaux induite par le NO (oxyde nitrique). Le NO est produit par la NOS (nitric oxide synthase) dont l'expression est également régulée par HIF-1 (Hirota and Semenza, 2006).

## 4. Cancer et hypoxie

Lorsqu'une tumeur se développe, les cellules situées au centre de celle-ci sont de plus en plus éloignées des vaisseaux sanguins qui entourent la tumeur et par conséquent, sont de moins en moins bien oxygénées (Figure I.19). Dès que le volume d'un nodule cancéreux atteint  $1\text{mm}^3$ , on observe l'apparition de zones hypoxiques au sein de la tumeur. Au fur et à mesure de la croissance tumorale, l'hypoxie est de plus en plus prononcée au centre de la tumeur et les cellules situées au centre de celle-ci meurent par nécrose car elles ne peuvent plus s'adapter à la diminution d'oxygène devenue trop drastique. Par contre, les cellules situées en périphérie de la tumeur s'adaptent et survivent car l'hypoxie est moins sévère. Les mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses s'adaptent à l'hypoxie sont nombreux et sont en partie similaires à ceux décrits ci-dessus. Cependant, d'autres mécanismes spécifiques aux tumeurs



**Figure I.19:** Représentation schématique du développement d'une tumeur et de l'apparition d'une zone d'hypoxie au centre de la tumeur causée par la diminution de la quantité d'oxygène devenue accessible au centre de la tumeur. Lorsque le volume de la tumeur augmente encore, une zone nécrotique apparaît au centre car la sévérité de l'hypoxie est devenue trop importante pour que les cellules puissent s'adapter et survivre.

sont également activés et fournissent un avantage permettant aux cellules tumorales de proliférer ou de résister à la mort cellulaire induite par les agents chimiothérapeutiques. Parmi ces mécanismes, les plus importants sont la néoangiogenèse, la formation de métastases et l'expression des MDR. De plus, l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'apoptose est modifiée en hypoxie pouvant avoir pour conséquence une inhibition de l'apoptose et la survie des cellules cancéreuses. La régulation des gènes impliqués dans ces mécanismes étant dépendante de HIF-1, ce facteur de transcription représente de plus en plus une cible pour les thérapies anticancéreuses.

### **4.1. Néoangiogenèse**

Comme décrit précédemment, le VEGF, dont l'expression est induite par HIF-1, induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de capillaires préexistants. Cependant la néoangiogenèse tumorale possède des caractéristiques particulières qui favorisent la croissance des tumeurs et le développement de métastases. En effet, les vaisseaux sanguins formés au niveau des tumeurs sont caractérisés par une architecture anormale et irrégulière et une perméabilité élevée. Cette irrégularité donne lieu à un flux sanguin irrégulier et stagnant qui ne permet pas d'oxygéner toutes les zones de la tumeur de manière efficace et constante. Cependant cette néovascularisation irrégulière est suffisante pour fournir à la tumeur de l'oxygène et les nutriments nécessaire à sa survie tout en limitant l'accès des agents chimiothérapeutiques aux cellules tumorales qui sont trop éloignées des vaisseaux sanguins.

### **4.2. Métastases**

Les tumeurs qui possèdent de larges régions hypoxiques présentent un potentiel invasif/métastatique plus élevé induit par une modification de l'expression génique régulée par HIF-1. La présence de HIF-1 est associée avec la perte de l'expression de l'E-cadhérine, un composant des jonctions adhérentes qui permet l'adhérence des cellules à leurs voisines et par conséquent qui empêche la formation de métastases. HIF-1 induit une augmentation de l'expression d'autres protéines favorisant la formation de métastases telles que TWIST1, un régulateur de la transition épithélium-mésenchyme, la lysyl oxydase (LOX), impliquée dans le remodelage de la matrice, des métalloprotéases qui brisent les interactions cellules-cellules et cellules-matrice ainsi que le récepteur à chémokine CXCR4 et son ligand SDF-1 (Stroma cell derived factor-1) qui jouent un rôle dans la migration directionnelle des cellules tumorales métastatiques. L'augmentation de l'expression de ces facteurs est corrélée avec l'augmentation du caractère invasif/métastatique des cellules du cancer du sein. Par exemple, les cellules tumorales métastatiques MDA-MB-231 surexpriment les protéines CXCR4 et LOX. Un siRNA dirigé contre la protéine CXCR4 ou une inhibition de LOX diminue le caractère invasif des MDA-MB-231, ce qui suggère que CXCR4 et LOX sont en partie responsables du caractère métastatique des cancers du sein. Ils représentent donc une cible potentielle à cibler pour contrôler la croissance tumorale et la formation de métastases (Dachs and Tozer, 2000 ; Chaudary and Hill, 2006).

### **4.3. MDR (Multidrug resistance)**

La résistance des cellules tumorales à divers agents chimiothérapeutiques est en partie due à la présence de protéines qui expulsent ces agents hors de la cellule. Actuellement, trois protéines agissant de cette manière ont été découvertes, Pgp (P-glycoprotein) aussi appelée MDR1, Mrp (multidrug resistance-associated protein) et Bcrp (breast cancer resistance protein). Ces trois protéines se localisent au niveau de la membrane plasmique et appartiennent à la famille des transporteurs de type ABC (ATP-binding cassette). L'expulsion des agents à l'extérieur de la cellule est dépendante de l'ATP (Paredes *et al*, 2006). MDR1 est la protéine la plus étudiée et son expression est connue pour être induite par HIF-1. De plus,

sa surexpression est souvent corrélée avec une résistance des cellules tumorales face aux agents chimiothérapeutiques (Comerford *et al*, 2002).

### **4.4. L'hypoxie et l'apoptose**

En plus de son rôle dans l'adaptation des cellules face à l'hypoxie, HIF-1 possède également la capacité d'induire ou d'inhiber l'apoptose en fonction du type cellulaire et des conditions expérimentales. En effet, au laboratoire, il a été démontré que l'hypoxie inhibe l'apoptose induite par l'étoposide dans des cellules d'hépatome humain (HepG2) alors qu'elle l'aggrave dans des cellules du cancer du sein (MCF-7) et n'a aucun effet dans des cellules de carcinome pulmonaire A 549 (Cosse *et al*, 2007). Il semble que l'induction de l'apoptose dépend de la sévérité de l'hypoxie : une hypoxie modérée favorise la survie cellulaire tandis qu'une hypoxie sévère induit la mort cellulaire, mais également de l'état de phosphorylation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  (Piret *et al*, 2002).

#### **4.4.1. HIF-1 pro-apoptotique**

HIF-1 est capable d'induire l'apoptose via au moins deux mécanismes différents. Tout d'abord, HIF-1 induit l'expression de Bnip3 qui est une protéine pro-apoptotique appartenant à la famille Bcl-2 (Sowter *et al*, 2001). Ensuite, il a été démontré que HIF-1 peut interagir avec p53 en hypoxie. Cette interaction peut être responsable de l'inhibition de l'activité de HIF-1 notamment en induisant sa dégradation par le protéasome (comme décrit précédemment). Cette interaction permet également de stabiliser p53 qui va pouvoir induire l'apoptose. De récentes études ont démontré que l'état de phosphorylation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  détermine son association avec ARNT et p53. Ainsi, HIF-1 $\alpha$  phosphorylée interagit avec ARNT et favorise l'adaptation cellulaire face à l'hypoxie tandis que la forme déphosphorylée interagit préférentiellement avec p53 et favorise la mort cellulaire (Suzuki *et al*, 2001).

#### **4.4.2. HIF-1 anti-apoptotique**

Plusieurs études ont déjà démontré que l'hypoxie pouvait protéger certaines lignées cellulaires cancéreuses de l'apoptose induite par différents agents chimiothérapeutiques. Cette résistance semble être le résultat de modifications d'expression génique induites en partie par le facteur de transcription HIF-1. Des études ont démontré que HIF-1 diminue l'expression de la protéine Bid, une protéine «BH3 only» dans quatre types cellulaires différents (Erler *et al*, 2004). Il a été démontré que HIF-1 est également capable d'inhiber l'apoptose induite par le tert-butyl hydroperoxyde dans des cellules HepG2 en induisant l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (Piret *et al*, 2005). Une preuve de l'action anti-apoptotique de HIF-1 fut apportée en utilisant des siRNA dirigés contre la sous-unité HIF-1 $\alpha$  dans des HUVECs (human umbilical vascular endothelial cells) (Yu *et al*, 2004) et dans les HepG2 (Sermeus *et al*, 2008).

Indépendamment de HIF-1, l'hypoxie régule l'expression de gènes pro- ou anti-apoptotiques. Par exemple, une augmentation de l'expression de la protéine IAP-2 (inhibitor of apoptosis protein 2) est observée en hypoxie. Cette protéine possède un rôle anti-apoptotique car elle inhibe l'activité des caspases. L'hypoxie peut également diminuer l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bak (Erler *et al*, 2004 ; Sermeus *et al*, 2008).

### **4.5. Implication d'autres facteurs de transcription**

L'hypoxie peut réguler l'activité d'autres facteurs de transcription tels que NF $\kappa$ B et AP-1 pouvant moduler également l'activation du processus apoptotique. En effet, des études ont démontré que NF $\kappa$ B peut jouer le rôle d'un facteur anti-apoptotique alors que AP-1 possède

une activité pro- ou anti-apoptotique en fonction du stress et de la lignée cellulaire (Cummins and Taylor, 2005).

### 4.5.1. **NFκB**

En plus de son rôle dans la réponse immunitaire et inflammatoire, NFκB joue un rôle dans le contrôle de la croissance et la survie cellulaire. NFκB est une protéine hétérodimérique constituée de Rel, RelA, RelB, p50/p105 et p52/p100. Les dimères NFκB sont normalement séquestrés dans le cytosol par la protéine inhibitrice IκB et sont activés rapidement par des stimuli qui induisent la phosphorylation par l'IKK (IκB kinase) et sa dégradation par le protéasome d'IκB. Une fois libéré de son inhibiteur, le dimère NFκB entre dans le noyau où il induit l'expression de ses gènes cibles. Parmi les gènes cibles de NFκB, on retrouve des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que Bcl-X<sub>L</sub>, Bfl-1/A1 et Bcl-2, l'inhibiteur de la caspase 8 FLIP<sub>L</sub> et les protéines inhibitrices de caspases IAP1, IAP2 et XIAP (Papa *et al*, 2004). En bloquant l'apoptose induite par les récepteurs de mort TNF-R, FAS et TRAIL-R, NFκB aide les cellules tumorales à échapper à l'apoptose induite via la voie extrinsèque (Papa *et al*, 2006).

### 4.5.2. **AP-1**

AP-1 est un facteur de transcription qui détermine le destin de vie ou de mort de la cellule en régulant l'expression des gènes impliqués dans prolifération, la différenciation et l'apoptose. AP-1 est un homo- ou hétéro-dimère composé de protéines bZIP (basic region-leucine zipper) reprenant les membres de la famille Jun (c-Jun, JunB, et JunD), les membres de la famille Fos (c-Fos, FosB, Fra1 et Fra2) ou les membres de la famille des ATF (ATF2, ATF3, B-ATF). Différents stimuli permettent d'activer la kinase c-Jun N-terminale (JNK) qui va phosphoryler la protéine Jun et augmenter l'activité transcriptionnelle de AP-1 (Ameyar *et al*, 2003). Dans notre laboratoire, de récentes études ont démontré qu'en hypoxie, l'activation d'AP-1 pouvait jouer un rôle anti-apoptotique en protégeant les cellules HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide (Piret *et al*, 2006).

### **Objectifs**

L'hypoxie est souvent accompagnée d'une résistance des cellules vis-à-vis des chimiothérapies et des radiothérapies. En effet, l'efficacité des radiations et de la plupart des drogues cytotoxiques est dépendante d'une présence suffisante d'oxygène dans les cellules. Par exemple, les dommages à l'ADN induits par les radiations ionisantes ou par certains agents chimiothérapeutiques ont besoin d'oxygène pour être fixés. De plus, les tumeurs hypoxiques sont souvent peu ou pas vascularisées car les nouveaux vaisseaux sanguins tumoraux présentent une structure déformée. Par conséquent, les cellules tumorales ne sont pas bien oxygénées et l'accès des drogues aux régions hypoxiques est limité (Wouters *et al*, 2007). Outre la diminution d'efficacité des traitements, les cellules hypoxiques sont capables de s'adapter à l'hypoxie et un grand nombre de cellules tumorales ont la capacité de résister à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques grâce à une adaptation se déroulant au niveau génétique ou au niveau de l'expression génique. Le principal responsable de cette adaptation est le facteur de transcription HIF-1. Une augmentation de l'activation de HIF-1 a été observée dans une série de tumeurs humaines touchant le foie, le sein, le colon, les ovaires, la vessie, le pancréas, la prostate et les reins (Rankin and Giaccia, 2008) et la présence de zones hypoxiques et de HIF-1 dans les tumeurs est souvent corrélée avec un pronostic négatif. Il semble alors logique de penser que l'hypoxie, et en particulier, le facteur de transcription HIF-1, puissent apporter une protection des tumeurs face à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques.

Le but de ce mémoire sera de caractériser les effets de l'hypoxie sur l'apoptose induite par le taxol ou l'épirubicine dans les cellules MDA-MB-231. Ces cellules sont des cellules cancéreuses mammaires possédant une mutation dans le domaine de liaison à l'ADN dans le gène suppresseur de tumeur p53, le rendant inactif transcriptionnellement. Le taxol et l'épirubicine sont les agents les plus fréquemment utilisés pour traiter les patients atteints d'un cancer du sein métastatique. Le taxol est une molécule naturelle isolée à partir de l'arbre *Taxus brevifolia*. Cet agent se lie de manière réversible à la sous-unité  $\beta$  de la tubuline induisant sa polymérisation provoquant ainsi un arrêt de la division cellulaire à la phase G2/M et finalement l'apoptose. L'épirubicine est une molécule qui s'intercale dans l'ADN et inhibe la synthèse d'ARN et de protéines. Il génère aussi des radicaux libres cytotoxiques, inhibe le clivage de l'ADN par la topoisomérase II, inhibe l'activité hélicase et interfère avec la réplication et la transcription de l'ADN.

Notre étude se divise en quatre parties :

La première partie consiste à étudier si l'hypoxie induit une résistance des cellules MDA-MB-231 face à l'apoptose induite par le taxol ou l'épirubicine en mesurant l'activité de la caspase 3. Nous avons pu démontrer que l'hypoxie protège les cellules de l'apoptose induite par le taxol.

La seconde partie consiste à investiguer les variations de l'expression protéique et en ARNm et/ou en visualisant une relocalisation de certains membres de la famille Bcl-2 (Bax, Bak, Mcl-1, Bim, Bnip3) dans le but d'identifier des candidats dont l'expression est modifiée en fonction des incubations et qui pourraient donc jouer un rôle dans la protection induite par l'hypoxie.

Au cours de la troisième partie, nous avons investigué le rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la protection des cellules MDA-MB-231 contre l'apoptose induite par le taxol. Pour ce faire, nous avons utilisé des siRNA dirigés contre la sous-unité HIF-1 $\alpha$  afin d'inhiber la stabilisation et l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Ensuite, nous avons mesuré l'activité de la caspase 3 des cellules après transfection avec les siRNA : si HIF-1 est responsable de la protection, son inhibition dans les cellules incubées en hypoxie en présence de taxol devrait

conduire à une activité de la caspase 3 accrue par rapport aux cellules dans lesquelles HIF-1 est toujours fonctionnel.

Enfin, le profil d'expression de 96 gènes dont les produits sont impliqués dans la régulation de l'apoptose a été établi à l'aide de cartes microfluidiques à réactions PCR multiples. Cette étude a été réalisée après transfection avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  afin de déterminer le rôle de HIF-1 dans la régulation de l'expression de ces gènes. L'étude de l'expression de ces 96 gènes devrait également fournir des informations supplémentaires quant aux acteurs impliqués dans cette protection. L'ensemble de ces résultats devrait nous apporter une meilleure compréhension des mécanismes induits par l'hypoxie qui engendrent la résistance des cellules cancéreuses face à l'apoptose induite par des agents anti-cancéreux.

## **II. MATERIEL ET METHODES**

## **1. Culture cellulaire**

### **1.1. Type cellulaire**

Les cellules utilisées au long de ce travail sont des cellules tumorales humaines invasives et métastatiques provenant d'un cancer du sein. Ces cellules sont appelées MDA-MB-231 (Lacroix and Leclercq 2004).

### **1.2. Maintien des cultures et repiquage cellulaire**

#### **1.2.1. Matériel**

Tableau II.1

#### **1.2.2. Méthode**

Les cellules MDA-MB-231 sont cultivées dans des boîtes de culture T75 dans une étuve à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont repiquées deux fois par semaine selon le protocole suivant.

Le milieu de culture est décanté et la boîte T75 est rincée avec 5 ml de PBS stérile. Après avoir décanté le PBS, les cellules sont détachées du fond de la boîte par un ajout de 2 ml de trypsine-EDTA suivi d'une incubation de 2 minutes à 37°C. 6 ml de milieu de culture complet (RPMI + 10 % de sérum de veau fœtal) sont ajoutés afin de neutraliser la réaction de trypsinisation. L'entièreté de la suspension cellulaire est transférée dans un tube de 10 ml et centrifugée durant 4 minutes à 1000 rpm pour sédimenter les cellules. Après centrifugation, le surnageant est décanté et le culot est resuspendu dans du milieu complet. La suspension cellulaire est répartie dans de nouvelles boîtes T75 de manière à diluer 10x la suspension cellulaire obtenue par trypsinisation. Du milieu complet est ajouté dans les nouvelles boîtes T75 pour atteindre un volume final de 20 ml. Les boîtes sont alors placées dans l'étuve.

## **2. Incubation en hypoxie**

### **2.1. Matériel**

Tableau II.2

### **2.2. Méthode**

Le milieu complet (RPMI + 10 % sérum) est décanté et remplacé par du milieu CO<sub>2</sub> indépendant dans lequel a été ajouté 1 mM de L-glutamine (Tableau II.2). Les boîtes ou les plaques sont incubées à 37 °C en normoxie (atmosphère contenant 20% d'oxygène) ou en hypoxie (atmosphère contenant 1% d'oxygène et 99% d'azote).

En fonction des conditions, les cellules sont placées en hypoxie ou normoxie durant 5 heures ou 16 heures avec ou sans taxol (50 µM) ou épirubicine (10 µM).

## **3. Extraction protéique totale**

### **3.1. Matériel**

Tableau II.4

### **3.2. Méthode**

Les extraits protéiques totaux sont préparés à partir des cellules cultivées dans des T25. Après incubation, les T25 sont immédiatement placées sur glace. Le milieu de culture est

PBS (phosphate buffer saline) stérile (BioWhittaker, Belgique)	Tampon phosphate 10mM NaCl 150 mM pH 7,4
Trypsine-EDTA : solution de trypsine (0,5g/l) et EDTA (0,2g/l) (GIBCO, UK)	
Boîtes de culture de 75cm <sup>2</sup> (T75) (Costar, Corning, USA)	
Tube 10ml (Sterilin, UK)	
Milieu de culture complet	Milieu RPMI 1640 (Invitrogen 21875091) 10% de sérum de veau fœtal (GIBCO, UK)

**Tableau II.1 :** Matériel requis pour le maintien et le repiquage cellulaire

Milieu CO <sub>2</sub> -indépendant (GIBCO, UK)
L-glutamine (Sigma, USA)
Taxol (Invitrogen, Molecular Probes, USA)
Epirubicine (Calbiochem, US)

**Tableau II.2 :** Matériel requis pour l'incubation en hypoxie

Type de boîtes	Volume de milieu CO <sub>2</sub> -indépendant
24 puits	2,5 ml/puit
T25	8 ml
T75	16ml

**Tableau II.3 :** Volume de milieu CO<sub>2</sub> indépendant à utiliser en fonction du type de boîte de culture utilisée

Tampon de lyse	1ml de tampon de lyse 2x, pH 7,5 (TRIS 40mM, KCl 300mM, EDTA 2mM) 580 µl d'eau milliQ 20µl de TritonX-100 200µl PIC (protease inhibitor cocktail) (Tableau II.5) 200µl PIB (phosphatase inhibitor buffer) (Tableau II.5)
PIC (Tableau II.5)	Une tablette diluée dans 2 ml d'eau milliQ (Complete protease inhibitor cocktail tablets 25x, Roche, Allemagne)
PIB (Tableau II.5)	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 25nM (Sigma-Aldrich, USA) PNPP (Para-NitroPhényl Phosphate) 250 nM (Sigma, USA) β-glycérophosphate 250nM (Sigma-Aldrich, USA) NaF 125 nM (Merck, Allemagne)
Glace	
Eau milliQ	
Pipette pasteur	
Tube de 10ml	
2 séries de Microtubes	
Racloir de 24mm	
TritonX-100 (Merck, Allemagne)	

**Tableau II.4 :** Matériel requis pour l'extraction protéique totale

PIC	Une tablette diluée dans 2 ml d'eau milliQ (Complete protease inhibitor cocktail tablets 25x, Roche, Allemagne)
PIB	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 25nM (Sigma-Aldrich, USA) PNPP (Para-NitroPhényl Phosphate) 250 nM (Sigma, USA) β-glycérophosphate 250nM (Sigma-Aldrich, USA) NaF 125 nM (Merck, Allemagne)

**Tableau II.5 :** Composition du PIC et du PIB

transféré dans un tube de 10 ml et centrifugé 5 minutes à 1200 rpm à 4°C afin de récupérer les cellules en suspension. Le surnageant est décanté et le culot est resuspendu dans 50 µl de tampon de lyse et transféré dans la première série de microtubes. Les cellules dans les boîtes de 25 cm<sup>2</sup> sont raclées dans 150 µl de tampon de lyse à l'aide d'un racloir de 24 mm (Costar, Corning, USA). Le lysat cellulaire est entièrement récupéré dans la première série de microtubes froids. 10 homogénéisations sont réalisées à l'aide d'une micropipette afin de lyser complètement les cellules. Les microtubes sont alors centrifugés pendant 5 minutes à 13000 rpm, à 4°C afin de sédimenter les débris cellulaires. Le surnageant est transféré dans la deuxième série de microtubes. 10 µl de lysat de chaque condition est aliquoté et sera utilisé pour le dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford. Les échantillons sont stockés à -80°C.

#### **4. Fractionnement cellulaire par centrifugations différentielles**

##### **4.1. Principe**

Dans le but de rechercher l'abondance de différents acteurs pro- et anti-apoptotiques dans différents compartiments cellulaires (noyaux, mitochondries et cytosol), un fractionnement par la technique de centrifugations différentielles suivi d'une extraction protéique sur les différentes fractions enrichies a été réalisé. Les extraits ont été utilisés pour réaliser des western blots visant à rechercher l'abondance des protéines Bak et de Bax.

##### **4.2. Matériel**

Tableau II.6

##### **4.3. Méthode**

Toutes les étapes du fractionnement cellulaire s'effectuent à 4°C et 2 boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> (Costar) ont été utilisées pour chaque condition.

Les cellules sont repiquées à 2 millions de cellules par boîte de culture T75. Le lendemain, les cellules sont incubées en normoxie ou en hypoxie en présence ou non d'épirubicine ou de taxol pendant 16 heures. Après l'incubation, les surnageants sont récupérés dans des tubes de 10 ml et centrifugés 5 minutes à 1200 rpm. Le surnageant est décanté et le culot est conservé et resuspendu dans 200 µl de saccharose 0,25 M.

Les cellules sont raclées dans 800 µl de tampon saccharose 0,25 M et transvasées dans les tubes de 10 ml (les doubles sont rassemblés dans un même tube). Les boîtes sont rincées avec 800 µl de tampon saccharose 0,25 M. Le tout est ajouté au tube de 10 ml correspondant.

Par condition, les cellules raclées et les culots resuspendus sont donc rassemblés dans un même tube de 10 ml. Ces tubes sont centrifugés 5 minutes à 1200 rpm. Ensuite, les surnageants sont décantés et le culot est resuspendu dans 3 ml de tampon saccharose. Les homogénéisateurs de Dounce (un pour chaque condition) sont rincés 2x avec le tampon saccharose et les suspensions cellulaires y sont transvasées. Après 8 passages au piston B, les homogénats sont transférés dans de nouveaux tubes de 15 ml et centrifugés 10 minutes à 2700 rpm à 4°C (centrifugeuse Alegra R-22).

Le surnageant est conservé et transféré dans un nouveau tube de 15 ml (fraction S+ MLP).

Le culot correspond à la fraction nucléaire et aux cellules entières. Celui-ci est resuspendu dans 2 ml de tampon saccharose 0,25 M et transféré dans un homogénéisateur de Dounce. 8 passages au piston B sont réalisés et l'homogénat est transféré dans de nouveaux tubes de 10 ml puis centrifugé 10 minutes à 2100 rpm à 4°C (centrifugeuse Alegra R-22). Les surnageants sont transférés dans les tubes de 15 ml précédents et les culots sont resuspendus dans 500 µl de tampon saccharose 0,25 M. Les culots resuspendus sont transférés dans des

PBS : 150mM NaCl, 10mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,4
Tampon saccharose 0,25M (85,575g de sucre de Tirlemont en bloc dilué dans 1l d'eau milliQ)
Homogénéisateur de Dounce de 7 ml
Piston B
Tubes de 10 ml et de 15 ml
Tubes rigides

**Tableau II.6 :** Matériel requis pour le fractionnement par centrifugations différentielles

BSA (Bovine Serum Albumine) 2µg/µl (étalon)
Tampon de lyse ou tampon saccharose 0,25M correspondant aux extraits protéiques dosés
Colorant Bradford dilué 5x et filtré (Bio-Rad, USA)

**Tableau II.7 :** Matériel requis pour le dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford

Gel séparateur ou « running gel » (Tableau II.11)
Gel concentrateur ou « stacking gel » (Tableau II.11)
Tampon d'électrophorèse : running buffer 1x (Tableau II.11)
Etalon de poids moléculaire: Seebue Plus 2 Prestained (Invitrogen, USA)
Cuve (Life technologies Model V15.17, Invitrogen, USA)
Générateur (Pharmacia Biotech Electrophoresis Power Supply EPS 3500)
Bleu de charge concentré 5x (Tableau II.12)

**Tableau II.8 :** Matériel requis pour préparer un gel Tris-Glycine

Appareil de transfert : Hoeffer Semiphor (Amersham Biosciences, USA)
Tampon de transfert (blotting buffer) (Tableau II.11)
Papier Whatman (Merck, Germany)
Membranes PVDF (Amersham Biosciences, USA)

**Tableau II.9 :** Matériel requis pour le transfert

Tampon de rinçage : TBS-Tween 0,1% (TBS-T), pH 7,6 + agent bloquant/lait Gloria (Tableau II.11)
Anticorps primaires et secondaires dilués en fonction de la protéine à révéler (Tableaux II.13 et II.14)
Substrat de Révélation: ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham, USA)
Film radiographique (Amersham Biosciences, USA)
Solution de révélation (Ilford 2000 RT, Ilford Imaging, UK)
Solution de fixation (Ilford 2000 RT, Ilford Imaging, UK)
Machine de révélation (Fujifilm, FPM 100A, Japan)

**Tableau II.10 :** Matériel requis pour le blocking et la révélation

homogénéisateurs de Dounce et après 8 passages au piston B, les homogénats sont conservés dans des microtubes. Cette fraction correspond à la fraction N.

Les fractions S+MLP dans les tubes de 15 ml sont transvasées dans des tubes rigides. Les volumes des différents échantillons doivent être égaux et sont déterminés par la formule :

$\text{Volume} = \frac{\text{masse}}{\text{masse volumique}} = \frac{\text{poids total des tubes rigides avec la fraction PNS} - \text{poids tube vide}}{1,034}$
--

La condition avec le plus grand volume est conservée et du tampon saccharose 0,25 M est ajouté aux autres conditions pour égaliser les autres volumes. Les tubes rigides sont centrifugés à 35000 rpm à 4°C (la durée de la centrifugation est déterminée en fonction du volume à centrifuger) (rotor 50 Ti ; centrifugeuse L7-35). Les surnageants sont transférés dans de nouveaux tubes de 15 ml. Cette fraction correspond à la fraction C (cytosol).

Les culots sont resuspendus à sec à l'aide d'une baguette puis 200 µl de tampon saccharose 0,25 M est ajouté. Les suspensions sont transférées dans des microtubes. La baguette et les tubes rigides sont rincés avec 100 µl de tampon saccharose 0,25 M et le tout est transféré dans les microtubes. Cette fraction correspond à la fraction MLP. Les fractions sont aliquotées et conservées à -70°C. 10 µl de chaque fraction et du tampon saccharose 0,25 M sont conservés à -20°C pour réaliser un dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford.

## **5. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford**

### **5.1. Matériel**

Tableau II.7

### **5.2. Méthode**

2,5 µl d'extraits protéiques sont ajoutés toutes les 30 secondes dans 1 ml de colorant Bradford. 5 minutes après l'ajout de l'extrait, la densité optique (D.O) est lue à 595 nm grâce à un spectrophotomètre préalablement calibré avec de l'eau distillée. La cuvette est rincée à l'acétone puis à l'eau distillée entre chaque mesure.

Il est important de réaliser différents contrôles afin de normaliser les valeurs. Pour ce faire, des mesures de D.O sont réalisées respectivement sur l'eau (blanc étalon), le tampon de lyse (blanc) et l'étalon (BSA à 2 µg/µl). Tous les dosages sont effectués en dupliquats. Afin de calculer la concentration en protéines présente dans les échantillons, nous utilisons la formule suivante :

$$\frac{(\text{Moyenne Test} - \text{Moyenne Blanc})}{(\text{Moyenne Etalon} - \text{Moyenne Blanc Etalon})} \times (\text{Cc Etalon} \times \mu\text{l étalon}) = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Volume des échantillons

## **6. Western Blotting**

### **6.1. Principe**

Le Western Blot est une technique semi-quantitative qui permet de séparer les protéines par électrophorèse dans un gel. Dans ce cas-ci, les extraits protéiques obtenus sont chargés sur un gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS-PAGE) qui dénature les protéines. Sous l'impulsion d'un courant électrique passant dans la cuve d'électrophorèse, les protéines migrent dans le gel. Elles migreront plus ou moins loin dans le gel en fonction de leur poids moléculaire. Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF). L'abondance de la protéine d'intérêt est détectée à l'aide d'un anticorps primaire spécifique. Un anticorps secondaire, couplé à une peroxydase, est utilisé pour reconnaître le fragment Fc des anticorps primaires. La révélation se fait en présence de luminol, substrat de la peroxydase. Le luminol est oxydé en présence de

Gel Buffer	Pour 200 ml : 36,3 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 0,8 g de SDS (ICN Biomedicals, USA) pH 8,9
Gel mix pour gel 10%	Pour 35 ml : 8,4 ml de gel buffer 11,62 ml d'acryl/bis (Bio-Rad, USA) 15 ml d'H <sub>2</sub> O
Gel mix pour gel 15%	Pour 35 ml : 8,4 ml de gel buffer 17,5 ml d'acryl/bis (Bio-Rad, USA) 9,1 ml d' H <sub>2</sub> O
Gel Séparateur	35 ml de gel mix 10% ou 15% 175 µl d'APS 25% (Pharmacia Biotech AB, Swedish) 10,5 µl de TEMED (Pharmacia Biotech AB, Swedish)
Spacer Gel Buffer	Pour 100 ml : 5,1 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 0,4 g de SDS (ICN Biomedicals, USA) pH 6,8
Spacer Gel Mix	Pour 10 ml : 2,5 ml de Spacer Gel Buffer 1,67 ml d'acryl/bis (Bio-Rad, USA) 5,83 ml d' H <sub>2</sub> O
Gel Concentrateur	10ml de Spacer Gel Mix 50µl d'APS 25% (Pharmacia Biotech AB, Swedish) 3µl de TEMED (Pharmacia Biotech AB, Swedish)
Running Buffer 10x	Pour 1 l : 63,2 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 40 g de glycine (ICN Biomedicals, USA) 10 g de SDS (ICN Biomedicals, USA)
Blotting Buffer	Pour 5 litres : 24 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 115 g de glycine (ICN Biomedicals, USA) 1 l de méthanol (Merck, Germany)
TBS 10x	Pour 1 l : 24,22 g de TRIS (Merck, Germany) 80,06 g de NaCl (Merck, Germany) pH 7,6
TBS-Tween 0,1 % (TBS-T)	Pour 1 l : 100 ml TBS 10x 900 ml d' H <sub>2</sub> O 1 ml de Tween 20 (Sigma, USA)
TBS-T + Lait	TBS-t 0,1 % + 2 % de Blocking Agent (Amersham CPK1075, USA) ou 5 % de lait en poudre Gloria

**Tableau II.11:** Solutions utilisées pour le western blotting

Bleu de charge 5x (pour les gels Tris-Glycine)	10 ml de spacer gel buffer 10 ml de SDS 20% 5 ml de β-mercaptoéthanol 10 ml glycérol 17,5 g de bleu de bromophénol
--	--

**Tableau II.12:** Composition du bleu de charge concentré 5x

la peroxydase. Cette oxydation s'accompagne d'une production de lumière qui est alors détectée au moyen d'un film radiographique. Dans le cadre de ce travail, l'abondance de protéines intervenant dans l'apoptose a été étudiée à partir d'extraits totaux ainsi qu'à partir d'extraits obtenus suite à un fractionnement cellulaire par centrifugations différentielles.

## **6.2. Préparation des extraits**

Un volume bien précis de chaque extrait protéique est prélevé de manière à charger une quantité identique de protéines dans chaque puits. Ces échantillons sont portés à un volume final identique avec de l'eau distillée et du bleu de charge est ensuite ajouté (Tableau II.12). Les échantillons sont alors chauffés à 100°C pendant 5 minutes afin de dénaturer les protéines. Finalement, ils sont brièvement centrifugés avant d'être chargés sur le gel.

## **6.3. Migration (Gel Tris-Glycine)**

### **6.3.1. Matériel**

Tableau II.8

### **6.3.2. Méthode**

Une fois le montage des plaques réalisé, les gels sont coulés. Le gel séparateur (15 % pour Bak, Bax, Mcl1 et 10 % pour HIF-1 $\alpha$ ) est coulé entre les plaques jusqu'à environ 1 cm en dessous du peigne. Une fine couche d'isobutanol est déposée sur le gel afin de favoriser la polymérisation qui est inhibée en présence d'oxygène. Une fois le gel polymérisé (après environ 1 heure), l'isobutanol est enlevé et la surface du gel est rincée à l'eau distillée. Le surplus d'eau est éliminé à l'aide d'un papier Whatman. Ensuite le gel concentrateur est préparé et coulé sur le gel séparateur jusqu'au bord des plaques. Le peigne est glissé verticalement entre les plaques avant polymérisation afin de former les puits de chargement. Quand ce gel est polymérisé (environ 45 minutes), le peigne, les pinces et le spacer du bas sont retirés. Le gel est monté dans la cuve, la petite plaque vers le compartiment central. Le tampon d'électrophorèse (running buffer) est ensuite ajouté dans le compartiment central jusqu'au bord de la petite plaque et dans le compartiment inférieur. A l'aide d'une seringue à pointe fine, les bulles d'air sont éliminées et les puits sont rincés avec le tampon. Les échantillons et l'étalon sont chargés dans les puits. La migration se déroule pendant 1h à 35 mA (à travers le gel concentrateur) et pendant environ 3h à 45 mA (à travers le gel séparateur).

## **6.4. Transfert**

### **6.4.1. Matériel**

Tableau II.9

### **6.4.2. Méthode**

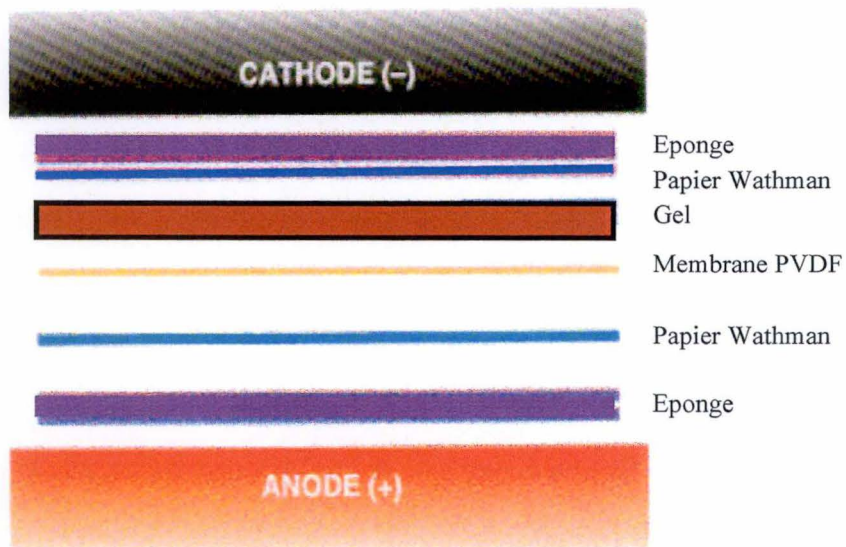
La membrane et les papiers Whatman sont découpés de la grandeur du gel séparateur. La membrane doit toujours être manipulée avec des gants. Pendant 1 minute, la membrane de PVDF est réhydratée dans du méthanol 100 % puis pendant au minimum 5 minutes la membrane est équilibrée dans le tampon de transfert (blotting buffer). Ensuite la membrane est déposée sur le gel. Des papiers Whatman et des éponges sont également disposés selon un système en sandwich (Figure II.1). Ce système en sandwich est réalisé dans l'appareil de transfert. Chaque constituant du sandwich est mouillé avec du tampon de transfert. Entre chaque couche du sandwich, les bulles d'air sont éliminées car celles-ci pourraient gêner le passage du courant et perturber le transfert. Un courant de 30 mA est appliqué durant toute la

Anticorps primaires dirigés contre :	Firme et numéro de référence	Espèce	Dilution
Bak	BD-Pharmingen #556382	souris	1/2000
Bax	Upstate #06499	lapin	1/3000
p53	Upstate, 05-224	souris	1/1000
Mcl1	Santa Cruz, 819	lapin	1/1000
HIF-1 $\alpha$	BD Transduction 610959	souris	1/1500
Anticorps primaires (contrôle de charge)	Firme et numéro de référence	Espèce	Dilution
$\alpha$ -tubuline	Sigma T5168	souris	1/30000
lamine B	Santa Cruz 6216	chèvre	1/5000
TOM40	SantaCruz 11414	lapin	1/5000
actine	Sigma A5441	souris	1/100000
ERKtotal	BD-Transduction	souris	1/3000
JNKtotal	Cell Signaling #9252	lapin	1/ 3000

**Tableau II.13 :** Anticorps primaires utilisés pour le Western Blotting

Nom de l'anticorps	Fournisseur	Dilution effectuée
Anti-Ig de lapin couplé à la HRP	Amersham Bioscience, USA	1/300000
Anti-Ig de souris couplé à la HRP	Amersham Bioscience, USA	1/300000
Anti-Ig de chèvre couplé à la HRP	Amersham Bioscience, USA	1/300000

**Tableau II.14 :** Anticorps secondaires utilisés pour le Western Blotting



**Figure II.1 :** Système en sandwich pour le transfert

Après avoir été hydratées dans le méthanol 100%, les membranes sont équilibrées dans le tampon de transfert. Elles sont ensuite mises en présence des gels selon le système en sandwich. Ce sandwich est composé de papiers Whatman, d'éponges, du gel et des membranes humidifiées dans le tampon de transfert.

nuit ou un courant de 150 mA est appliqué pendant 2 heures pour permettre le transfert des protéines sur la membrane.

## **6.5. Blocking et Révélation**

### **6.5.1. Matériel**

Tableau II.10

### **6.5.2. Méthode**

Une fois le transfert terminé, le montage en sandwich est démoulé et la membrane est récupérée. Celle-ci est ensuite bloquée dans du TBS-T + 2% d'agent bloquant ou 5% de lait en poudre Gloria suivant la protéine à révéler. Le blocking se fait pendant 2 heures à température ambiante sur rouleau afin de bloquer les sites de fixation non spécifiques. Ensuite, la membrane est incubée 2 heures à température ambiante ou 16 heures à 4°C en présence de l'anticorps primaire dilué dans du TBS-T + 2% d'agent bloquant ou 5% Gloria (Tableau II.13). Après cette incubation, la membrane est rincée 3 fois 20 minutes dans un grand volume de TBS-T. L'anticorps secondaire (Tableau II.14) est dilué 300 000 fois dans le TBS-T+ agent bloquant, puis placé sur la membrane pendant 1h à RT. Finalement, la membrane est rincée 3 x 20 minutes dans un grand volume de TBS-T avant d'être recouverte de solution ECL pendant 5 minutes. La révélation se fait en chambre noire en déposant un film radiographique sur la membrane pendant des temps variables. Le film est ensuite placé dans la machine de révélation pour révéler la protéine d'intérêt.

## **7. Dosage de l'activité caspase 3**

### **7.1. Principe**

L'apoptose se caractérise par l'activation de caspases initiatrices et effectrices. Celles-ci clivent différents substrats au niveau de résidus aspartate conférant à la cellule une morphologie apoptotique. La caspase 3 est une des caspases effectrices dont l'activité peut être mesurée afin de quantifier l'induction de l'apoptose dans les cellules. L'activité de la caspase 3 est dosée en utilisant un térapeptide fluorescent Ac-DEVD-AFC reconnu et clivé entre le résidu D et le fragment fluorescent AFC par la caspase 3 active. La fluorescence libérée est proportionnelle à l'activité de la caspase 3 et donc proportionnelle à l'activité apoptotique des cellules. L'émission de fluorescence est mesurée grâce à un fluorimètre.

### **7.2. Matériel**

Tableau II.15

### **7.3. Méthode**

Les cellules sont repiquées dans des plaques 6 puits à une densité de 300.000 cellules par puits. Après une incubation de 16 heures, le milieu de chaque puits est collecté dans des tubes de 10 ml placés sur glace. Ceux-ci sont centrifugés à 1000 rpm pendant 5 min et à 4°C afin de sédimenter les cellules qui se seraient détachées au cours de l'incubation. Pendant la centrifugation, les cellules restées attachées au fond des puits sont raclées dans 200µl de PBS et récupérées dans des microtubes placés sur glace. Les puits sont ensuite rincés avec 200 µl de PBS et la suspension est transférée dans les microtubes placés sur glace. Les tubes de 10 ml sont récupérés et le culot est resuspendu dans 100 µl de PBS. Les culots resuspendus sont transférés dans les microtubes contenant les cellules et ceux-ci sont centrifugés pendant 5 min à 1200 rpm à 4°C. Le culot est ensuite resuspendu dans 50 µl de tampon de lyse (Tableau

Plaques 6 puits (Costar Corning, USA)
Matériel requis pour les incubations
Tubes de 10 ml
PBS: 150 mM NaCl, 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,4
Racloirs de 24 mm
Glace
Microtubes
Pipettes pasteur
Substrat Ac-DEVD-AFC caspase 3 fluorogenic substrate (BD Pharmingen) dilué dans du DMSO (Sigma, USA)
Tampon de réaction (Tableau II.16)
Tampon de lyse (Tableau II.16)
Fluorimètre + cuvette

**Tableau II.15 :** Matériel requis pour le dosage de l'activité caspase 3

Tampon de lyse stock 2x	10 mM Hepes/KOH, pH 7,0 2 mM EDTA 0,1 % CHAPS
Tampon de lyse complet (1 ml)	500 µl de tampon de lyse 2x 0,1 g de sucrose 5 µl DTT 1 M 7 µl d'aprotinine H <sub>2</sub> O pour mettre à volume
Tampon de réaction 2x	40 mM PIPES, pH 7,2 200 mM NaCl 2 mM EDTA 0,2 % CHAPS
Tampon de réaction complet (1 ml)	1 ml de tampon de réaction 2x 0,1g sucrose 20 µl DTT 1M

**Tableau II.16:** Solutions utilisées pour réaliser le dosage d'activité de la caspase 3

Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA)	
Lamelles couvre-objet de 13 mm de diamètre (Vel, Knitter Glaser, Allemagne)	
Lames porte-objets de 2,6 x 7,6 cm (Vel, SuperFrost, Allemagne)	
PBS (pour 1 litre)	9 g NaCl (Merck, Allemagne) 2 0ml de tampon phosphate 0,5 M pH 7,4 Porter au volume de 1 litre avec de l'eau distillée
PBS+BSA	Dissoudre 2 g de BSA (Sigma, USA) dans 100 ml de PBS
PBS+Triton X-100 1% (T-9284, Sigma,USA)	
PBS+PFA 4% (Merck, Allemagne)	
Anticorps primaires (Tableau II.18)	
Anticorps secondaires couplés à un fluorochrome de type Alexa (Tableau II.18)	
TOPRO 3 (Molecular Probes, USA)	dilué 80x dans solution RNase à 2 mg/ml PBS
Mowiol (Sigma – Aldrich, Germany-UK)	pour le montage des lamelles sur les lames
Microscope confocal à fluorescence (Leica TCS NT/SP 1, Allemagne)	

**Tableau II.17 :** Matériel requis pour le marquage en immunofluorescence

II.16). Après une incubation de 30 min sur roue à 4°C, les microtubes sont repris et les lysats sont centrifugés à 13000 rpm pendant 5 min à 4°C. Les surnageants sont récupérés et aliquotés. Un aliquot sera utilisé pour le dosage de la concentration en protéines par la méthode Bradford tandis que l'autre aliquot servira au dosage de l'activité de la caspase.

Pour le dosage, 50 µl de tampon de réaction complet (Tableau II.16) sont déposés dans un microtube. L'échantillon est ajouté au tampon de réaction de façon à avoir 10 µg de protéines/test dans un volume final de 150 µl complété avec du tampon de lyse. Finalement, de minute en minute, 1 µl de substrat Ac-DEVD-AFC est ajouté pour initier la réaction. Les microtubes sont incubés 1h à l'obscurité à 37°C. Au bout d'une heure d'incubation, 135 µl de la solution de réaction sont transférés dans une cuvette en quartz à 4 faces et la fluorescence est mesurée de minute en minute:  $\lambda$  excitation = 400 nm,  $\lambda$  émission = 505 nm. En plus des tests, 3 blancs contenant uniquement du tampon de lyse et du tampon de réaction sont préparés.

## **8. Marquage en immunofluorescence**

### **8.1. Principe**

Le marquage en immunofluorescence est une technique utilisée pour visualiser la localisation subcellulaire d'une protéine d'intérêt et pour en estimer qualitativement l'abondance.

L'immunofluorescence nécessite l'utilisation de deux types d'anticorps. Les cellules cultivées dans des plaques 24 puits sont fixées et perméabilisées. Ensuite un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt est utilisé. Cet anticorps primaire est reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome Alexa. Le fluorochrome possède la propriété d'absorber l'énergie lumineuse et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente, visualisable à l'aide d'un microscope confocal.

### **8.2. Matériel**

Tableau II.17

### **8.3. Méthode**

Les cellules sontensemencées à une densité de 30.000 cellules par puits sur des couvre-objets stérilisés à l'alcool et déposés au fond des puits d'une plaque 24 puits. 24 heures après, elles sont incubées en normoxie ou en hypoxie durant 16 heures en présence ou non de taxol ou d'épirubicine. Après l'incubation, les milieux sont décantés et les cellules sont fixées 10 minutes avec 500 µl de PBS-PFA 4% à température ambiante. Les puits sont ensuite rincés 3x avec du PBS. Les cellules sont perméabilisées avec 500 µl de PBS-Triton 1% pendant 5 minutes. Les puits sont rincés 3x avec du PBS-BSA 2%. Une chambre d'incubation humide est alors préparée en mouillant un papier Whatman recouvert de parafilm. Une goutte de 30 µl d'anticorps primaire dilué 100x dans du PBS-BSA 2% est déposée sur le parafilm. Chaque couvre-objet est alors récupéré du fond des puits et retourné sur la goutte d'anticorps primaire. L'incubation se fait pendant 2 h à température ambiante. Ensuite, les couvre-objets sont replacés dans la plaque 24 puits où ils sont rincés 3x avec du PBS-BSA 2%. Les couvre-objets sont ensuite mis en présence de l'anticorps secondaire dilué 1000x dans la chambre humide et incubés pendant 1h à température ambiante dans l'obscurité. Les couvre-objets sont encore rincés 3x avec du PBS-BSA 2% et 1x avec du PBS seul. Afin de marquer le noyau, une incubation de 30 minutes en chambre humide et à l'obscurité est réalisée en présence de TO-PRO 3 dilué 80x dans une solution de RNase (2 mg/ml PBS). Une fois tous les marquages

Anticorps primaire dirigé contre :	Firme et numéro de référence	Espèce	Dilution (dans du PBS-BSA 2%)	Anticorps secondaire
Bak	Calbiochem, AM03	souris	1/100	Anti-Ig de souris couplé à l'Alexa 488 nm (Molecular Probes, USA)
Bnip3	AbCam, ab10433	souris	1/100	Anti-Ig de souris couplé à l'Alexa 488 nm (Molecular Probes, USA)
p53	Upstate, 05-224	souris	1/100	Anti-Ig de souris couplé à l'Alexa 488 nm (Molecular Probes, USA)
Mcl1	Santa Cruz, 819	lapin	1/100	Anti-Ig de lapin couplé à l'Alexa 488 nm (Molecular Probes, USA)
Bim	Cell Signaling, 2819	lapin	1/100	Anti-Ig de lapin couplé à l'Alexa 488 nm (Molecular Probes, USA)
Tubuline- $\alpha$	Sigma, T5186	souris	1/100	Anti-Ig de souris couplé à l'Alexa 546 nm (Molecular Probes, USA)
Tom20	BD Transduction Laboratories 612278	souris	1/100	Anti-Ig de souris couplé à l'Alexa 647 nm (Molecular Probes, USA)

**Tableau II.18 :** Anticorps utilisés pour le marquage en immunofluorescence

Solution : (Tableau II.21)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (Sigma, Germany)
NaF (Merck, Germany)
Glycérol 87 % (Merck, Germany)
PIC (Protease Inhibitor Cocktail) (Roche, Germany)
PIB (Phosphatase, Inhibitor Buffer) (Roche, Germany)
2 séries de tube de 10 ml
2 séries de microtubes
Racloir de 30 mm

**Tableau II.19 :** Matériel requis pour l'extraction nucléaire

Solutions (Tableau II.22)
Plaque 96 puits coatée avec les trappeurs contenant la séquence de liaison pour HIF-1
Pipette multichannel avec tips biohit (Finlande)
Spectrophotomètre (Ultramarck Microplate Imaging System, Bio-Rad)
TMD (Tetra Methyl Benzidine, stabilised chromogen; Biosource, Belgium)
Solution STOP (avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) (Biosource, Belgium)

**Tableau II.20 :** Matériel requis pour le dosage colorimétrique

effectués, les couvre-objets sont rincés 3x dans du PBS puis montés sur lames à l'aide de Mowiol. Les lames sont alors conservées à 4°C avant d'être observées au microscope confocal à fluorescence en gardant le photomultiplicateur constant.

Concernant les co-marquages en immunofluorescence, les cellules sont incubées en présence des deux anticorps primaires simultanément, puis en présence des anticorps secondaires simultanément. La concentration optimale de chacun des deux anticorps dans la solution finale est conservée.

## **9. Mesure de la liaison à l'ADN (Trans-AM)**

### **9.1. Principe**

Le but de cette méthode colorimétrique est de quantifier la liaison d'un facteur de transcription d'intérêt à sa séquence consensus sur l'ADN. La mesure de la liaison à l'ADN se réalise dans des plaques 96 puits coatés à la streptavidine. Au fond de ces puits sont fixés des trappeurs, des oligonucléotides d'ADN doubles brins biotinylés à une extrémité et contenant la séquence consensus du facteur de transcription étudié (dans notre cas : HIF-1). Une fois ces trappeurs fixés au fond des puits, des extraits protéiques nucléaires sont placés dans les puits. Si le facteur de transcription étudié est présent et actif, il va se lier spécifiquement à sa séquence d'intérêt et rester piégé au fond du puits. L'éventuelle présence du facteur de transcription est ensuite détectée à l'aide d'un anticorps primaire dirigé spécifiquement contre un épitope du facteur de transcription. Ensuite une incubation supplémentaire se fait en présence d'anticorps secondaires conjugués à la peroxydase (HRP). En présence du substrat de la HRP, un résultat colorimétrique facilement quantifiable par spectrophotométrie est obtenu.

### **9.2. L'extraction nucléaire**

#### **9.2.1. Matériel**

Tableau II.19

#### **9.2.2. Méthode**

Toutes les opérations de l'extraction ont lieu sur glace et les solutions utilisées sont maintenues à 4°C.

Les cellules sont repiquées à  $2.10^6$  de cellules par T75 et incubées le lendemain pendant 16 heures. Après l'incubation, les cellules sont raclées dans leur milieu de culture et transférées dans des tubes de 10 ml. Les tubes sont centrifugés 4 minutes à 1200 rpm à 4°C, le surnageant est décanté et le culot est détaché avec 5 ml de PBS froid. Les tubes sont à nouveau centrifugés 4 minutes à 1200 rpm à 4°C et le surnageant est décanté. Dans chaque tube, 5ml de HB 1x est ajouté et les tubes sont centrifugés à 1200 rpm à 4°C. Cette étape ne doit pas durer plus de 5 minutes précises afin de ne pas abimer les noyaux, le HB étant un tampon hypotonique faisant gonfler les membranes cellulaires. Après centrifugation, le surnageant est décanté et 500 µl de tampon de lyse 0,5 % NP-40 est ajouté. La solution est ensuite homogénéisée à la pipette durant 5 minutes maximum et transférée dans un microtube sur glace. Les microtubes sont centrifugés 1 minute à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant est décanté et le volume du culot est évalué afin de resuspendre ce culot dans un même volume de tampon RE complet. Un même volume de tampon SA complet est également ajouté. Ensuite les microtubes sont mis sur roue pendant 1 heure à vitesse moyenne puis sont centrifugés 10 minutes à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré dans une nouvelle série de

PBS froid	Pour 1 l: 20 ml de tampon phosphate 0,5 M; pH 7,4 9 g de NaCl 980 ml H <sub>2</sub> O
HB 10X (Hypotonic Buffer 10X concentré)	Pour 100 ml : 0,21 g de NaF (Merck, Germany) 0,242 g de Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (Sigma, USA) 4,75 g Hepes (Acros Organics) 37 mg EDTA (Merck, Germany) pH 7,9
Tampon de lyse 0,5 % NP-40	10 ml HB 10X 200 µl NP-40 (Sigma, USA) 89,8 ml H <sub>2</sub> O
Tampon RE (Tampon de resuspension) (100 ml)	10 ml HB 10X 20 ml de glycérol 87% (Merck, Germany) 70 ml H <sub>2</sub> O
Tampon SA (0,8 M NaCl) (tampon salin) (100 ml)	10 ml HB 10X 20 ml de glycérol 87% (Merck, Germany) 20 ml NaCl 4M (7,01g/30ml H <sub>2</sub> O) (Merck, Germany) 50 ml H <sub>2</sub> O
RE complet	1 ml RE 40 µl PIC 40 µl PIB
SA complet	1 ml SA 40 µl PIC 40 µl PIB

**Tableau II.21:** Solutions utilisées lors de l'extraction nucléaire

microtubes, et la concentration en protéines des extraits nucléaires est dosée par la méthode Bradford. Les extraits nucléaires se conservent à -80°C.

### **9.3. Dosage colorimétrique**

#### **9.3.1. Matériel**

Tableau II.20

#### **9.3.2. Méthode**

Dans les puits d'une plaque 96 puits coâtés avec un oligonucléotide contenant le site consensus reconnu par le facteur de transcription d'intérêt, on ajoute 40 µl de tampon de binding complet 1x (Tableau II.22). On y ajoute 10 µl d'extrait nucléaire dilué dans du tampon de lyse (Tableau II.22) de façon à obtenir 5 µg de protéines par 10 µl. Des puits contrôles négatifs sont également réalisés. Les extraits nucléaires y sont remplacés par 10 µl de tampon de lyse seul. Après 1h d'incubation sur légère agitation à RT, les puits sont lavés 3x avec 200 µl de solution de lavage (Tableau II.22). Puis 100 µl d'anticorps primaire dirigé contre HIF-1α dilué 1000x est ajouté dans chaque puits durant 1 heure d'incubation à RT. Après 3 lavages avec 200 µl de solution de lavage, les puits sont remplis avec 100 µl d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase pendant 1 heure à RT. Finalement, 4 lavages avec la solution de lavage sont effectués avant de déposer 100 µl de TMD (produit de révélation). Après 10 minutes d'incubation à RT, à l'abri de la lumière, 100 µl de solution STOP sont ajoutés dans chaque puits pour stopper la réaction. La D.O. est alors lue à 450 nm (référence 655 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre permettant de réaliser la lecture en plaque multipuits.

## **10. Système rapporteur**

### **10.1. Principe**

L'utilisation de système rapporteur permet d'évaluer l'activité d'un facteur de transcription d'intérêt au sein d'une cellule, selon les conditions étudiées. Un plasmide encodant une enzyme dont l'activité est aisément mesurable (la luciférase) est transfecté. Le gène codant pour cette enzyme porté par le plasmide est placé sous le contrôle d'un promoteur contenant la séquence consensus reconnue par le facteur de transcription d'intérêt. Quand celui-ci est activé, il se lie à sa séquence consensus et recrute la machinerie basale de transcription qui transcrit le gène codant pour la luciférase. En présence d'ATP et de  $Mg^{2+}$ , la luciférase catalyse la formation de luciféryl-adénylate, à partir de luciférine, qui est ensuite oxydé en oxyluciférine en présence d'oxygène (Figure II.2). L'activité de la luciférase est mesurée à l'aide d'un luminomètre qui détecte les photons libérés au cours de cette réaction. Les valeurs obtenues sont proportionnelles à l'activité de la luciférase, elle-même proportionnelle au taux de transcription, qui est lui-même proportionnel à l'activité du facteur de transcription étudié.

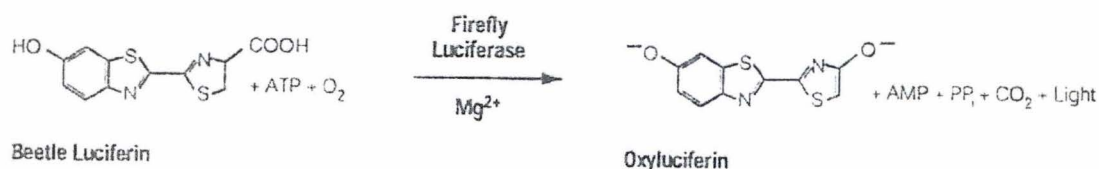
Le plasmide rapporteur est intégré de façon transitoire dans les cellules par transfection. Etant donné que les ADN plasmidiques introduits sont de taille importante et chargés négativement, ils n'entrent pas facilement dans la cellule. C'est pourquoi, un agent transfectant, le SuperFect (Qiagen, USA) est utilisé. Il s'agit d'un dendrimère polycationique, possédant une architecture sphérique. De part ses charges positives, il lie les groupements phosphate chargés négativement de l'ADN, ce qui lui donne une structure plus compacte facilitant son entrée dans la cellule.

Tampon de binding concentré 5x	Tris. HCl 50 mM EDTA 5 mM NaCl 250 mM Glycérol 25 % H <sub>2</sub> O stérile pH 7,8
Tampon de binding complet 1x	1 ml de tampon de binding 5x concentré, 5 µl DTT 0,5 M 3 ml H <sub>2</sub> O
Tampon RE (4°C) pour 1 ml	500 µl de HB 2x 200 µl glycérol 300 µl H <sub>2</sub> O
Tampon SA (4°C) pour 1 ml	500 µl de HB 2x 200 µl glycérol 200 µl NaCl 4M 100 µl H <sub>2</sub> O
Tampon de lyse	1ml de tampon RE 1 ml de tampon SA 2 µl DTT 1 M 80 µl PIC 80 µl PIB
PBS 50, solution saline, pour 1 litre	2,922 g NaCl 20ml de tampon phosphate 0,5 M pH 7,5
Concentration protéique du lysat cellulaire (dilué dans du tampon de lyse)	5 µg/10 µl
Solution de lavage	PBS 50 Tween 20 0,1 % BSA 0,1 %
Dilution de l'anticorps primaire	Anticorps anti-HIF-1α (Transduction laboratories H72320) dilué 1000x dans du PBS 50 + BSA 0,1 %
Dilution de l'anticorps secondaire	Anti-Ig de souris couplé à la peroxydase dilué 1000x dans du PBS 50 + gloria 1 %

**Tableau II.22:** Solutions utilisées pour le dosage colorimétrique

Superfect (Qiagen, USA)
Plasmides (Tableau II.24)
Milieu de rinçage, PBS stérile (phosphate buffer saline : 0,9 % NaCl, 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4)
Milieu RPMI sans sérum
PLB 5x (Passive Lysis Buffer) (Promega, USA)
Substrat β-gal (Tableau II.25)
Luciférase Assay Substrate (Promega, USA)

**Tableau II.23 :** Matériel requis pour le système rapporteur



**Figure II.2:** Schéma de la réaction catalysée par la luciférase. En présence d'ATP, d'O<sub>2</sub> et de Mg<sup>2+</sup>, la luciférase oxyde la luciférine. Cette réaction produit, notamment, l'oxyluciférine et libère des photons. Cette émission de photons, qui peut être mesurée, est proportionnelle à l'activité et à la quantité d'enzyme présente dans l'échantillon. (Promega, USA)

Etant donné que le nombre de cellules par puits et que l'efficacité de transfection sont variables, les valeurs brutes de luminescence obtenues sont normalisées. Pour se faire, un deuxième plasmide, un plasmide de normalisation, est co-transfecté. On émet l'hypothèse que l'efficacité de transfection de ces deux plasmides est identique. Ce plasmide de normalisation contient le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase placé sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort, originaire du CMV ou cytomégalovirus. Normalement, l'expression de la  $\beta$ -galactosidase ne sera donc pas influencée par les différentes conditions étudiées. La valeur du dosage d'activité de la luciférase est donc normalisée, pour chacun des puits, par celle obtenue pour la mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase.

## 10.2. Matériel

Tableau II.23

## 10.3. Méthode

Les cellules sont repiquées en plaques 24 puits selon une densité de 35.000 cellules par puits. Le lendemain, les cellules sont rincées avec 1 ml de PBS et 500  $\mu$ l de solution de transfection sont placés dans chaque puits pendant 5 heures.

Par puits : 1,5  $\mu$ g d'ADN sont ajoutés. Cette quantité d'ADN contient 12/13 de plasmide rapporteur et 1/13 de plasmide de normalisation, pCMV- $\beta$ gal. Un certain volume de PBS stérile est ajouté à cet ADN afin d'obtenir un volume total de 7,5  $\mu$ l. 3  $\mu$ l de Superfect sont ensuite ajoutés. Après avoir attendu 10 minutes à RT, au cours desquelles les complexes ADN/SuperFect se forment, 500  $\mu$ l de milieu RPMI sans antibiotiques ni sérum sont ajoutés. Des triples ont été réalisés pour chaque condition. Une condition contrôle est également réalisée, dans laquelle les cellules sont incubées avec du milieu de culture seul.

Après les 5 heures de transfection, la solution est ôtée des puits et remplacée par du milieu RPMI+sérum pendant 24 heures pour laisser reposer les cellules. Après ces 24 heures de repos, le milieu RPMI+sérum est décanté et remplacé par du milieu CO<sub>2</sub>-indépendant avec ou sans taxol ou épirubicine pour une incubation de 16 h en normoxie ou en hypoxie.

## 10.4. Révélation

Après l'incubation, les puits sont décantés et 200  $\mu$ l de Passive Lysis Buffer 1x sont ajoutés dans chaque puits afin de lyser les cellules. Les plaques sont ensuite agitées pendant 10 minutes à température ambiante.

Pour mesurer l'activité  $\beta$ -galactosidase, 75  $\mu$ l de lysat (ou tampon de lyse pour les blancs) sont mis dans les puits d'une plaque 96 puits auxquels sont additionnés 75  $\mu$ l de substrat  $\beta$ -gal. La réaction de révélation peut se poursuivre durant 2 heures, à 37°C dans l'obscurité. La densité optique est lue à 405 nm après différents temps d'incubation.

Pour mesurer l'activité de la luciférase, un minitube est préparé pour chaque condition. 60  $\mu$ l de solution de révélation est placé dans le tube et juste avant la mesure, 10  $\mu$ l de lysat sont ajoutés. Le mélange est légèrement agité et la mesure de la luminescence se fait pendant 10 secondes.

Les résultats sont exprimés sous forme de rapport de la valeur de luminescence (RLU) divisée par l'activité  $\beta$ -galactosidase (Absorbance) du puits correspondant.

	Nom du plasmide	Nombre de sites consensus	provenance
Plasmide rapporteur (HIF-1)	pGL3-(PGK-HRE <sub>6</sub> )tk-luc	6	Michel et al, 2002
Plasmide de normalisation	pCMV-β-gal		Promega

**Tableau II.24:** Plasmides utilisés lors de la transfection pour doser l'activité transcriptionnelle de HIF-1

Tampon phosphate stock 0,5 M pH 7,4		2 ml
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Germany	20,3 mg
ONPG (o-nitrophényl-β-D galacto-pyranoside)	Acros Organics, USA	66,5 mg
2-mercaptoéthanol	Fluka, Switzerland	350 µl
H <sub>2</sub> O pour compléter le volume à 50 ml		

**Tableau II.25:** Composition du tampon de réaction de la β-galactosidase

	Plaque 6 puits	T25	T75
Densité	300 000	650 000	2.10 <sup>6</sup>

**Tableau II.26:** Densité cellulaire utilisée lors des repiquages pour la transfection de siRNA

Smart pool de siRNA anti-HIF-1α, 20 µM (cat : M-004018-02) (Dharmacon, USA)
RiscFree siRNA #1, 20 nMol (cat : D-001220-01-20) (Dharmacon, USA)
DharmaFect N°1 Transfection Reagent (cat : T-2001-03, Dharmacon, USA)
Opti-MEM (Gibco, UK)

**Tableau II.27 :** Matériel utilisé pour la transfection avec les siRNA

Tube 1		Tube 2	
Si-RNA	Opti-MEM	Dharmafect	Opti-MEM
Les si-RNA de concentration stock 20µM sont dilués le milieu opti-MEM pour obtenir la concentration finale en siRNA voulue (dans ce cas-ci 50 nM). NB: Le volume de cette dilution correspond à 1/10 du volume final de transfection.		Le Dharmafect est dilué 500x par rapport au volume final de transfection, dans du milieu opti-MEM. NB: Le volume de cette dilution correspond à 1/10 du volume final de transfection.	
Mixer délicatement à la pipette et attendre 5 minutes		Mixer délicatement à la pipette et attendre 5 minutes	
Après avoir attendu 5 minutes, le contenu du tube 1 est transvasé dans le tube 2 et le mélange est mixé délicatement à la pipette. Il faut attendre 20 minutes que les complexes se forment.			
Après avoir attendu 20 minutes, mettre à volume avec du milieu RPMI+10% sérum sans antibiotiques.			

**Tableau II.28:** Protocole à suivre pour réaliser le mix de transfection avec les siRNA

Récipient	Tube 1		Tube 2		Milieu complet	Volume final de transfection
	siRNA(20µM)	Opti-MEM	Dharmafect	Opti-MEM	RPMI+Sérum	
T75	20 µl	780 µl	16 µl	784 µl	6,4 ml	8 ml
T25	10 µl	390 µl	8 µl	392 µl	3,2 ml	4 ml
Plaque 6 puits	6,25 µl	243,75 µl	5 µl	245 µl	2 ml	2,5 ml
Plaque 24 puits	1,25 µl	48,75 µl	1 µl	49 µl	0,4 ml	0,5 ml

**Tableau II.29:** Détail des volumes pour réaliser le mix de transfection pour divers types de boîtes de culture et pour obtenir une concentration finale en siRNA de 50 nM.

## **11. Transfection de siRNA**

### **11.1. Principe**

La transfection de siRNA consiste à faire entrer à l'intérieur des cellules des siRNA complexés à un agent transfectant qui permet l'entrée du siRNA dans les cellules afin d'invalider l'expression de l'ARNm ciblé par le siRNA.

### **11.2. Matériel**

Tableau II.27

### **11.3. Méthode**

Les cellules sontensemencées 24 heures avant la transfection à une densité cellulaire bien précise afin d'atteindre environ 50 % de confluence le jour de la transfection (Tableau II.26). Le mix de transfection est préparé selon le protocole décrit aux Tableaux II.28 et II.29. L'ancien milieu des boîtes ou plaques de culture est décanté et les cellules sont incubées 24 heures en présence du milieu de transfection. Après l'incubation, le milieu de transfection est décanté et remplacé par du milieu complet. Les cellules sont ensuite incubées pour les différentes expériences selon les protocoles décrits au Tableau II.30.

## **12.Extraction d'ARN total**

### **12.1. Matériel**

Tableau II.31

### **12.2. Méthode**

L'extraction se fait en milieu RNase free.

Après l'incubation, le milieu des T75 est décanté et transvasé dans des tubes de 10 ml. 1ml de RIR est ajouté par T75 et les cellules sont raclées. Les cellules raclées sont transférées dans les microtubes. Les tubes de 10 ml sont centrifugés pendant 5 minutes à 1200 rpm à 4°C pour sédimenter les cellules et les débris. Après la centrifugation, le surnageant est décanté par inversion. 150 µl de cellules raclées sont utilisées pour resuspendre le culot du tube correspondant. Les culots resuspendus sont transférés dans les microtubes correspondants et ceux-ci sont incubés 5 minutes à température ambiante. 200µl de chloroforme RNase free sont ajoutés aux microtubes. Ceux-ci sont mélangés vigoureusement à la main pendant 15 secondes, incubés 2 à 3 minutes à température ambiante puis centrifugés 15 minutes à 12000 rcf à 4°C pour séparer les phases. La phase aqueuse supérieure (avec l'ARN) est transférée dans un nouveau microtube et 500 µl d'isopropanol RNase free est ajouté pour précipiter l'ARN. Après avoir homogénéisé par inversion, les microtubes sont incubés 10 minutes à température ambiante et centrifugés 10 minutes à 12000 rcf à 4°C pour sédimenter l'ARN. Le surnageant est décanté et le culot est lavé avec 1ml d'éthanol RNase free 75%. La dilution est effectuée avec de l'eau DEPC. Les microtubes sont vortexés à faible vitesse puis centrifugés pendant 5 minutes à 7600 rcf à 4°C et le surnageant est décanté prudemment. Après avoir laissé sécher le culot à l'air libre, celui-ci est resuspendu dans 100 µl d'eau RNase free. Les échantillons sont conservés à -70°C. Un aliquot d'eau RNase free est conservé pour le dosage de la concentration en ARN.

#### **12.2.1. Dosage**

La concentration en ARN présent dans chaque échantillon est dosée en duplicats après avoir dilué celui-ci 100x dans de l'eau RNase free en mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm.



**Tableau II.30** : Détail des différentes cinétiques à suivre en fonction des méthodes utilisées après la transfection avec les siRNA.

SDS 1%
Tips à filtre
Racloir de 30 mm
Tubes de 10 ml RNase free
Microtubes RNase free
RNA isolation reagent (RIR) (Tri-reagent solution, Ambion)
Chloroforme minimum 99% (Sigma Aldrich, USA)
RNase free water (Promega, USA)
Iso-propanol (Merck ,Germany)
Ethanol (Merck, Germany)

**Tableau II.31** : Matériel requis pour l'extraction d'ARN total

RNAsin Ribonuclease inhibitor (Promega, USA)
Ribonuclease H (Gibco, UK)
Nuclease-free water (Promega, USA)
dNTP Master Mix (Eurogentec, Belgium)
Oligo dT (Gibco, UK)
Superscript II (Invitrogen, USA)

**Tableau II.32** : Matériel requis pour la transcription inverse

Mix de réaction	Pour 9 µl 4 µl de Buffer RT 5X 2 µl de DTT 0,1 M 1 µl de RNAsin (40 U/µl) 2 µl de mix dNTP 10X
-----------------	--

**Tableau II.33** : Mix de réaction à préparer lors de la transcription inverse

## **13. Transcription inverse**

### **13.1. Principe**

La rétrotranscription permet de générer, de manière non spécifique, l'ADN complémentaire aux ARNm d'un échantillon d'ARN total grâce à l'utilisation d'amorces poly-T.

### **13.2. Matériel**

Tableau II.32

### **13.3. Méthode**

2 µg d'ARN sont transférés dans un microtube froid. Le volume de celui-ci est porté à 7,5 µl avec de l'eau RNase free. A la fin de chacune des étapes suivantes, les microtubes sont centrifugés brièvement. 2 µl d'Oligo dT (500 ng/µl) sont ajoutés dans chaque microtube. Ceux-ci sont chauffés 10 minutes à 70°C puis immédiatement remis sur glace pendant 5 minutes. Durant ces 5 minutes, un mix de réaction (9 µl par échantillon) est préparé (Tableau II.33). Une fois ces 9 µl de mix ajoutés, les microtubes sont incubés 5 minutes à température ambiante. Ensuite, 1,5 µl de Superscript II (200 U/µl) est ajouté. Les microtubes sont ensuite incubés pendant 1h30 à 42°C puis incubés 15 minutes à 70°C. A la fin de ces incubations, 1 µl de RNase H (2 U/µl) est ajouté dans chaque microtube. Ceux-ci sont incubés pendant 20 minutes à 37°C. Les échantillons (ADNc) peuvent ensuite être conservés à -20°C.

## **14. PCR en temps réel**

### **14.1. Principe**

La PCR en temps réel a pour but de quantifier l'ARNm d'un gène d'intérêt dans différentes conditions testées. Cette technique est basée sur la détection et la quantification d'un agent intercalant fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits au cours de la réaction.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification exponentielle de séquences d'ADN spécifiques réalisée au moyen d'amorces complémentaires encadrant la séquence à amplifier. Dans le cadre de la PCR en temps réel, la quantité d'amplicon produits pendant la réaction est mesurable par l'intensité de fluorescence d'une molécule qui s'intercale de manière non spécifique dans l'ADN double brin, le SYBR Green. Cette molécule est ajoutée au mix PCR de départ et émet un signal fluorescent proportionnel à la quantité d'ADN double brin formée. Le signal augmente au cours de la réaction suite à l'incorporation du SYBR Green (Figure II.3). Le signal fluorescent émis par le SYBR Green augmente de façon exponentielle avant d'arriver à un plateau de saturation (Figure II.4). Ce signal est détecté à partir d'un certain seuil. Ce point où le signal de fluorescence est supérieur au bruit de fond est appelé le cycle seuil, Ct (cycle threshold). La valeur de Ct, obtenue au cours de la phase exponentielle d'amplification, sera toujours inversement proportionnelle à la quantité d'ADNc généré pendant la rétrotranscription, et donc à l'abondance d'ARNm présent au départ dans l'échantillon. En effet, plus il y a d'ADN à amplifier au départ, moins il faudra faire de cycles pour obtenir un signal de fluorescence. Il faut ensuite normaliser les résultats obtenus, en utilisant la valeur de Ct d'un gène de référence, dont l'expression n'est pas censée être influencée par les conditions étudiées. Dans notre cas, nous avons utilisé RPL13A comme housekeeping gene (c'est-à-dire gène de référence). Les valeurs obtenues après normalisation

Master mix « SYBR Green PCR » (Applied Biosystem, Holland)
Amorces sens et antisens (Tableau II.35)
Plaque multipuits (96 well optical reaction plate, Applied Biosystem, Holland)
7000 sequence detection system (Applied Biosystem, Holland)
Film plastique (Optical Adhesive Covers; Applied Biosystems, Holland)

**Tableau II.34 :** Matériel utilisé pour la PCR en temps réel

Gène étudié	Primer Reverse	Primer Forward
Bax	5'-TGTCGCCCTTTTCTA-3'	5'-GTCCAGCCCATGATGCTTCT-3'
Bak	5'-CTTCGTGGTTCGACTTCATGCT-3'	5'-GGACCATTGCCAAGTTCAG-3'
Mcl1	5'-TACTCCAGCAACACCTGCAA-3'	5'-AAACGGGACTGGCTAGTTAAACAA-3'
Hif-1 $\alpha$	5'-TCAAGCAGTAGGAATTGGAACATTATT-3'	5'-TTTACACGTTTCCAAGAAAGTGATGTA-3'
Hif-2 $\alpha$	5'-GCAGCAGGTAGGACTCAAATGA-3'	5'-ACAGTGCTACGCCACCCAGTA-3'
Bnip3	5'-ACCAAGTCAGACTCCAGTTCTTCA-3'	5'-TTTGCTGGCCATCGGATT-3'
p53	5'-CAGCTCTCGGAACATCTCGAA-3'	5'-AAGAAACCACTGGATGAAGAA-3'
RPL13A (23kDa)	5'-GCCTACAAGAAAGTTTGCCTATCTG-3'	5'-TGAGCTGTTTCTTCTTCCGGTAGT-3'
LDHA	5'-GAAGACATCATCCTTTATTCCGTAAAG-3'	5'-TGGCAGAGAGTATAATGAAGAATCTTAGG-3'
BIRC3	5'-TAAAGGCAGGGTCTCAGTATGCT-3'	5'-GTCCAGGCTGAGGCAAGA-3'
NOXA	5'-TGCCGGAAGTTCAGTTTGTCT-3'	5'-CGCGCAAGAACGCTCAA-3'
TNF SF 10	5'-CCTTGATGATTCCAGGAGTTT-3'	5'-CAGAGGAAGAAGCAACACATTGTC-3'
CASP3	5'-CAAAGCGACTGGATGAACCA-3'	5'-GAGGCCGACTTCTTGTATGCA-3'
TNF RSF 1B	5'-CACGATGCAGGTGACATTGAC-3'	5'-CAGCACCGGGAGCTCAGAT-3'

**Tableau II.35:** Amorces utilisées pour la PCR en temps réel

Par gène	par puits
H <sub>2</sub> O distillée	2,5 $\mu$ l
Amorce R	2,5 $\mu$ l
Amorce F	2,5 $\mu$ l
SYBRGreen	12,5 $\mu$ l

**Tableau II.36:** Mix PCR à préparer pour chaque gène avec les amorces correspondant au gène étudié.

nous serviront à comparer l'abondance de l'ARNm des gènes d'intérêt dans les différentes conditions.

## 14.2. Matériel

Tableau II.34

## 14.3. Méthode

L'ADNc obtenu pour chaque condition lors de la retrotranscription est dilué 100x dans de l'eau distillée (2 µl ADNc + 198 µl d'eau distillée) et un mix PCR (Tableau II.36) spécifique pour chaque gène étudié contenant les amorces appropriées est préparé. Les amorces ajoutées dans le mix PCR doivent être préalablement diluées 3x (1/3 de p. forward ou 1/3 de p. reverse + 2/3 d'eau distillée). 20 µl de ce mix sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits. A ces 20 µl sont ajoutés 5 µl d'ADNc dilué 100x. Afin d'obtenir des contrôles négatifs, deux blancs seront ajoutés pour chaque condition et donc, 5 µl d'eau seront ajoutés au lieu de l'ADNc. Une fois les puits remplis, la plaque est recouverte d'un film plastique (Optical Adhesive Covers; Applied Biosystems, Holland) et centrifugée 1 minute à 600 rpm. Après centrifugation, la plaque est placée dans l'appareil qui effectuera une quarantaine de cycles d'amplification et mesurera la fluorescence associée à chacun des puits tout au long des cycles d'amplification.

Le programme PCR se déroule en plusieurs étapes successives :

Après 2 min à 50°C, une dénaturation de 10 min est effectuée à 95°C avant de réaliser 40 cycles constitués chacun de 15 secondes de dénaturation à 95°C suivi d'une hybridation et élongation des amorces de 1 min à 60°C.

## 14.4. Analyse des résultats

L'analyse des résultats commence par la détermination des valeurs Ct (Cycles seuils) qui s'obtiennent en fixant le seuil de détection à la moitié de la zone exponentielle. Ce cycle seuil correspond au cycle auquel l'intensité de la fluorescence est significativement plus élevée que celle du bruit de fond. Ensuite le  $\Delta Ct$  est calculé (les valeurs Ct obtenues pour chaque gène sont normalisées par les valeurs Ct obtenues pour le housekeeping gene, RPL13) puis le  $\Delta\Delta Ct$  est calculé ( $\Delta Ct$  de chaque condition -  $\Delta Ct$  de la condition contrôle). Après cette normalisation, le fold d'induction est calculé par la formule  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Le fold d'induction correspond à l'expression relative d'un gène dans une condition test par rapport à la condition contrôle.

## 15. Cartes microfluidiques

### 15.1. Principe

Il s'agit d'une méthode qui permet d'analyser des variations d'expression génique à l'aide cartes à 384 puits. Ces cartes microfluidiques permettent d'analyser simultanément 1 à 8 échantillons et permettent de mesurer l'expression de 12 à 380 gènes. La première étape de cette méthode correspond à une transcription inverse où de l'ARNm est rétrotranscrit en ADNc. La seconde étape correspond à une réaction de PCR en temps réel où des produits PCR sont synthétisés à partir des échantillons d'ADNc en utilisant le TaqMan universal PCR master mix qui contient une polymérase possédant une activité 5'-3' exonucléase.

Dans chacun des puits de la carte microfluidique, on trouve les amorces et une sonde TaqMan (possédant un fluorochrome et un quencher) spécifique à chacun des gènes étudié. L'ADNc dilué dans de l'eau RNase free est mélangé au TaqMan universal PCR master mix puis ajouté dans les puits de la carte microfluidique. Une fois les échantillons mis en présence des amorces et de la sonde, la réaction de PCR en temps réel se déroule. Au fur et à mesure que la

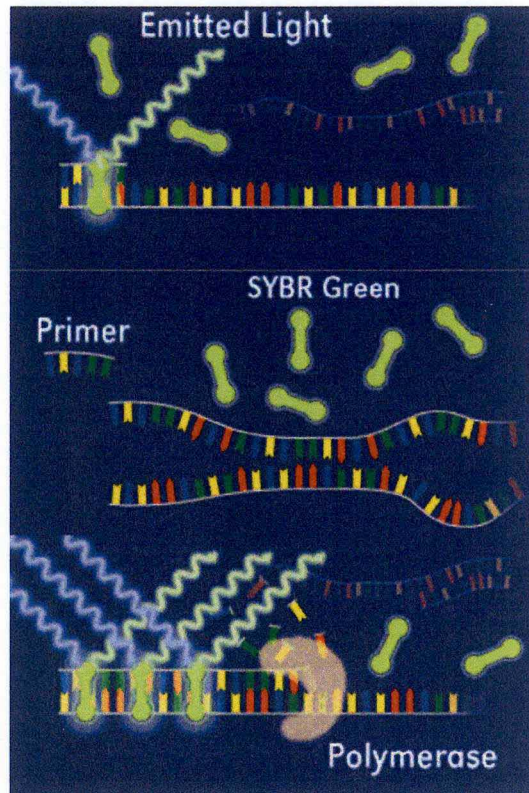


Figure II.3: Mécanisme d'action du SYBRGreen  
<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html#sybrgreen>

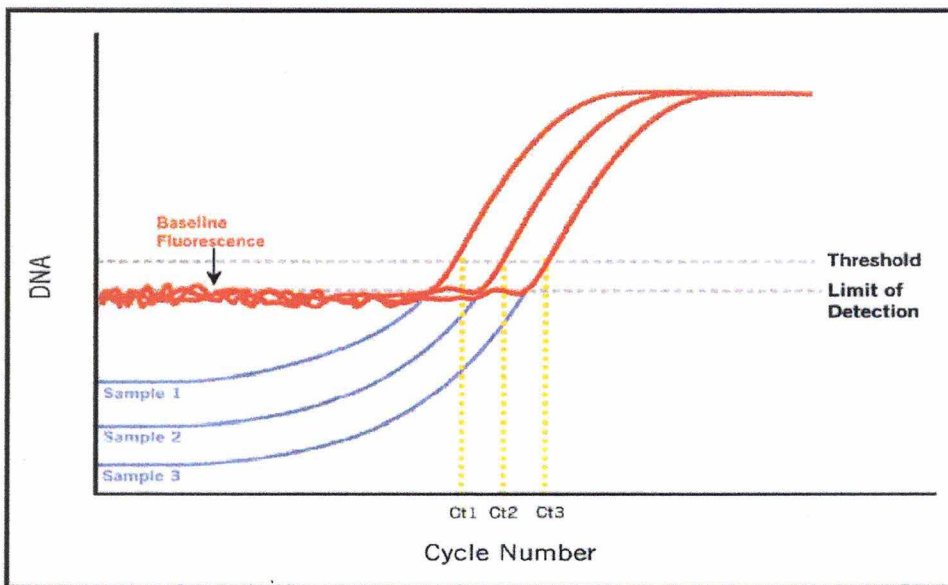


Figure II.4: Détection de la fluorescence au cours des cycles d'amplification <http://www.stratagene.com>

polymérase réplique les brins d'ADNc, elle dégrade la sonde TaqMan, grâce à son activité 5'-3' exonucléase, libérant les fluorochromes de leur quencher qui vont émettre de la fluorescence (Figure II.).

## **15.2. Matériel**

### **15.2.1. Pour l'extraction d'ARNm**

- Voir point 12.1

### **15.2.2. Pour la transcription inverse**

Tableau II.37

### **15.2.3. Pour la PCR en temps réel (cartes microfluidiques)**

Tableau II.38

## **15.3. Méthode**

### **15.3.1. Extraction d'ARN total**

Voir point 12.2

Après l'extraction, la qualité de l'ARN est analysée par électrophorèse microcapillaire grâce aux puces Agilent RNA 6000 NANO série II et au bioanalyseur 2100 Agilent conformément aux instructions du fabricant. Cette analyse permet de mettre en évidence une éventuelle dégradation des ARN.

### **15.3.2. Transcription inverse**

L'ARN est dilué dans de l'eau RNase free de manière à obtenir une concentration finale de 0,2 µg/µl. Ensuite, un mix contenant 2 µl de RT Buffer 10x, 0,8 µl de dNTP Mix 25x, 2 µl de RT Random Primer, 1 µl de Multiscribe Reverse Transcriptase, 1 µl d'inhibiteurs de RNase et 3,2 µl d'eau RNase free est préparé pour chaque condition étudiée. 10 µl de ce mix sont placés dans des tubes pour PCR et 10 µl de l'ARN dilué y sont ajoutés. Les tubes sont ensuite centrifugés brièvement et placés dans le ThermoCycler programmé comme dans le Tableau II.39.

L'ADNc obtenu est conservé à -20°C.

### **15.3.3. Cartes microfluidiques**

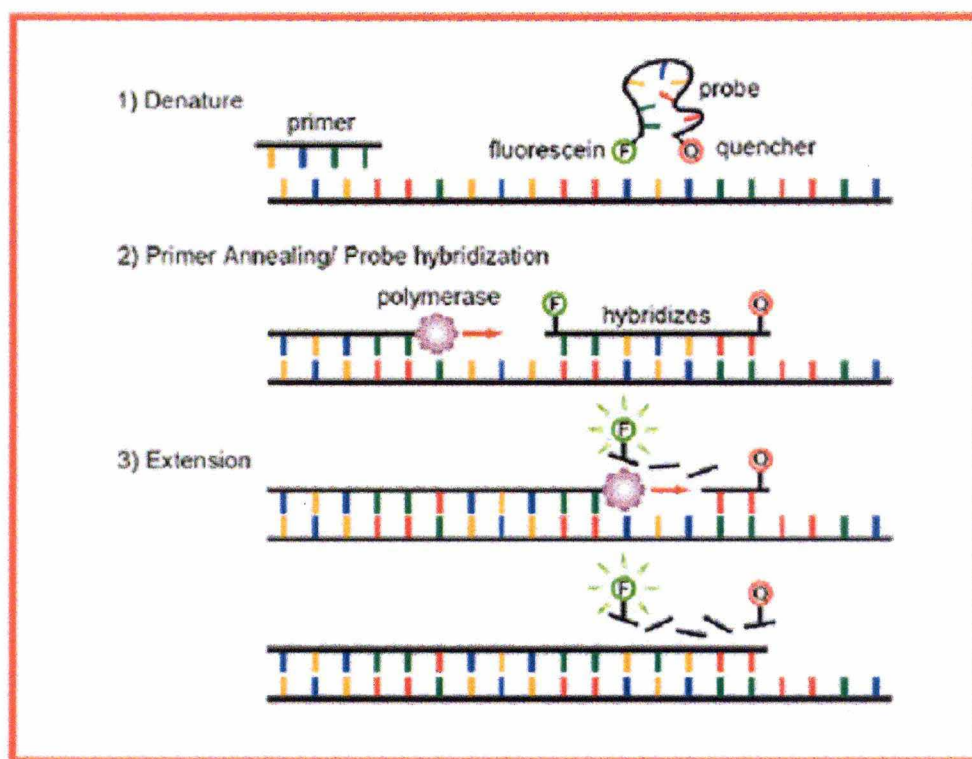
L'ADNc est dilué 50x dans de l'eau RNase free (1 µl d'ADNc + 49 µl d'eau). 50 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix sont ajoutés et le mélange obtenu est vortexé puis brièvement centrifugé. Un mix identique est réalisé pour chacun des 8 pores de la carte. 100 µl sont prélevés et injectés dans les pores de la carte. La carte est ensuite centrifugée deux fois pendant 1 minute à 1200 rpm. Après la centrifugation, la plaque est scellée et l'extrémité supérieure contenant les puits de remplissage de la carte est découpée. La carte peut alors être placée dans l'appareil afin de débiter les réactions de PCR en temps réel.

High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystem, USA)
RNAse free water (Promega, USA)
RT buffer 10x
dNTP mix 25x
RT Random primers
MultiScribe Reverse Transcriptase
Inhibiteurs de RNase
Tubes pour PCR
ThermoCycler

**Tableau II.37 :** Matériel requis pour la transcription inverse pour les cartes microfluidiques

Taqman low density customs arrays (Applied Biosystem, USA)
Taqman universal PCR master mix (Roche, USA)
RNAse free water (Promega, USA)
Centrifugeuse
Appareil de détection : 7000 sequence detection system (Applied Biosystem, Holland)

**Tableau II.38 :** Matériel requis pour la PCR en temps réel avec les cartes microfluidiques



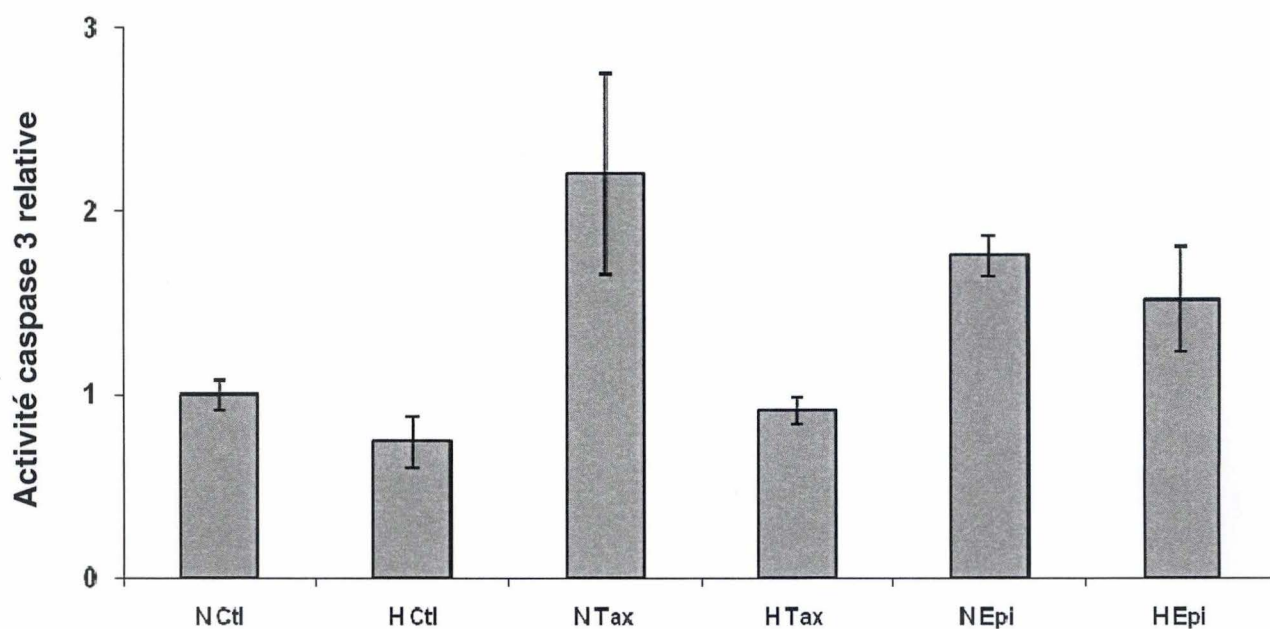
TaqMan® Probe Method

**Figure II.5:** Mécanisme d'action de la sonde TaqMan ([http://www.takarabiousa.com/images/PCR\\_TPM.gif](http://www.takarabiousa.com/images/PCR_TPM.gif))

	Etape 1	Etape 2	Etape 3	Etape 4
Température (°C)	25	37	85	4
Temps	10 minutes	120 minutes	5 secondes	infini

**Tableau II.39 :** Conditions de programmation du Thermo Cycler

### **III. RESULTATS**



**Figure III.1: Effets de l'hypoxie, du taxol et de l'épirubicine sur l'activité caspase 3.**

Les cellules MDA-MB-231 ont été repiquées en plaque 6 puits à une densité de 300 000 cellules par puits, puis incubées durant 16 heures dans du milieu CO<sub>2</sub> indépendant en hypoxie (H) ou normoxie (N) en présence ou non (Ctl) de taxol (Tax) à 50 µM ou d'épirubicine (Epi) à 10 µM. L'activité de la caspase 3 a été mesurée en détectant la fluorescence émise par l'AFC libéré suite au clivage du substrat de la caspase 3 Ac-DEVD-AFC. Les résultats sont exprimés en activité caspase 3 relative par rapport à la condition contrôle (N Ctl) en tant que moyenne ± 1 écart-type (n=3).

## **Partie I : Effets de l'hypoxie sur l'apoptose induite par le taxol et l'épirubicine**

### **1. Mesure de l'activité de la caspase 3**

Afin d'étudier les effets de l'hypoxie sur l'apoptose induite par le taxol ou l'épirubicine dans les cellules de la lignée MDA-MB-231, nous avons mesuré l'activité de la caspase 3. La caspase 3 est une caspase effectrice qui est activée durant l'apoptose et clive différents substrats cellulaires menant au phénotype apoptotique. L'activité de la caspase 3 est donc un bon indicateur du déclenchement de l'apoptose dans les cellules. Son activité peut être mesurée facilement en détectant la fluorescence émise par le fluorochrome AFC libéré suite au clivage d'un substrat artificiel de la caspase 3 : l'Ac-DEVD-AFC. L'AFC une fois clivé peut être détecté en fluorescence. En comparant l'activité de cette caspase entre des cellules incubées en normoxie sans agent (condition contrôle) et des cellules cultivées en hypoxie ou en normoxie en présence de taxol ou d'épirubicine, nous allons pouvoir mesurer et comparer l'activité apoptotique des cellules dans les différentes conditions. Cette méthode nous permet d'étudier si le taxol et l'épirubicine induisent l'apoptose dans les cellules MDA-MB-231 et si l'hypoxie influence ou non l'apoptose induite par ces agents.

#### **1.1. Description de l'expérience**

Les cellules ont été repiquées en plaques 6 puits à 300 000 cellules par puits 24 heures avant d'être incubées en hypoxie ou normoxie durant 16 heures, en présence ou en absence de taxol à une concentration de 50  $\mu$ M ou d'épirubicine à une concentration de 10  $\mu$ M. Chaque condition a été réalisée en triple. Après l'incubation, les extraits cellulaires sont récupérés et l'activité de la caspase 3 est mesurée pour les différentes conditions.

#### **1.2. Analyse des résultats**

Les résultats, repris à la Figure III.1, indiquent que l'hypoxie en elle-même n'induit pas l'apoptose car aucune augmentation de l'activité caspase 3 n'est observée après 16 heures d'incubation entre les conditions N Ctl et H Ctl. Une augmentation de l'activité caspase 3, et donc de l'apoptose, est observée quand les cellules sont incubées en normoxie en présence du taxol ou d'épirubicine, ce qui indique que ces deux agents chimiothérapeutiques induisent l'apoptose dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231. L'hypoxie n'influence pas l'apoptose induite par l'épirubicine car aucune diminution de l'activité caspase 3 n'est observée. Par contre, pour les cellules incubées en présence de taxol, une diminution de l'activité de la caspase 3 est observée en hypoxie, en comparaison avec les cellules incubées en normoxie. Ces résultats démontrent que l'hypoxie protège les cellules MDA-MB-231 de l'apoptose induite par le taxol en inhibant l'apoptose induite par cet agent.

## **Partie II : Effets de l'hypoxie et des agents chimiothérapeutiques sur l'expression de certains membres de la famille Bcl-2**

Etant donné que les membres de la famille Bcl-2 sont les protéines qui régulent le processus apoptotique, nous avons étudié les variations de localisation subcellulaire et d'expression en protéine et en ARNm de Bax, Bak, Mcl-1, Bim et Bnip3. Cette étude vise à comprendre le mécanisme de la protection induite par l'hypoxie et à investiguer si certains membres de la famille Bcl-2 jouent un rôle dans cette protection. Pour ce faire, nous avons réalisé des western blotting sur extraits protéiques totaux ou sur des fractions subcellulaires obtenues par

centrifugation différentielle pour évaluer l'abondance protéique, des marquages en immunofluorescence pour visualiser la localisation subcellulaire des protéines et des réactions de PCR en temps réel pour quantifier leur ARNm.

### **1. Description de l'expérience**

Western Blotting avec les extraits obtenus par centrifugations différentielles :

Les cellules ont été repiquées dans des T75 à  $2.10^6$  cellules par boîte 24 heures avant d'être incubées dans du milieu CO<sub>2</sub> indépendant durant 16 heures en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en présence ou en absence (Ctl) de taxol (Tax) à 50  $\mu$ M ou d'épirubicine (Epi) à 10  $\mu$ M. Les fractions S (cytosolique) et MLP (contenant les mitochondries), sont obtenues par centrifugation différentielle et le western blotting est réalisé. Bax et Bak sont révélés en utilisant des anticorps spécifiques. Tom40 et la tubuline  $\alpha$  servent de contrôle de charge pour les fractions MLP et S respectivement.

Western blotting avec les extraits obtenus par extraction protéique totale :

Les cellules ont été repiquées dans des T25 à 650 000 cellules par boîte 24 heures avant d'être incubées dans du milieu CO<sub>2</sub> indépendant durant 16 heures en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en présence ou en absence (Ctl) de taxol (Tax) à 50  $\mu$ M ou d'épirubicine (Epi) à 10  $\mu$ M. Une extraction protéique totale et le western blotting sont ensuite réalisés. Mcl-1 est révélé en utilisant un anticorps qui lui est spécifique et la JNK sert de contrôle pour le chargement du gel.

Marquage en immunofluorescence :

Les cellules ont été repiquées en plaque 24 puits à une densité de 30 000 cellules par puits 24 heures avant d'être incubées dans du milieu CO<sub>2</sub> indépendant durant 16 heures en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en présence ou en absence (Ctl) de taxol (Tax) à 50  $\mu$ M ou d'épirubicine (Epi) à 10  $\mu$ M. Après l'incubation, les cellules sont fixées dans du PBS contenant 4 % de paraformaldéhyde et perméabilisées en présence de Triton 1 %. Le marquage des protéines d'intérêt est réalisé en utilisant des anticorps primaires spécifiques à Mcl-1, à Bim, à la tubuline- $\alpha$ , à Tom20 ou à Bnip3, reconnus ensuite par un anticorps secondaire couplé respectivement à l'Alexa 488, 488, 546, 647 ou 488. Les noyaux ont été marqués au TOPRO.

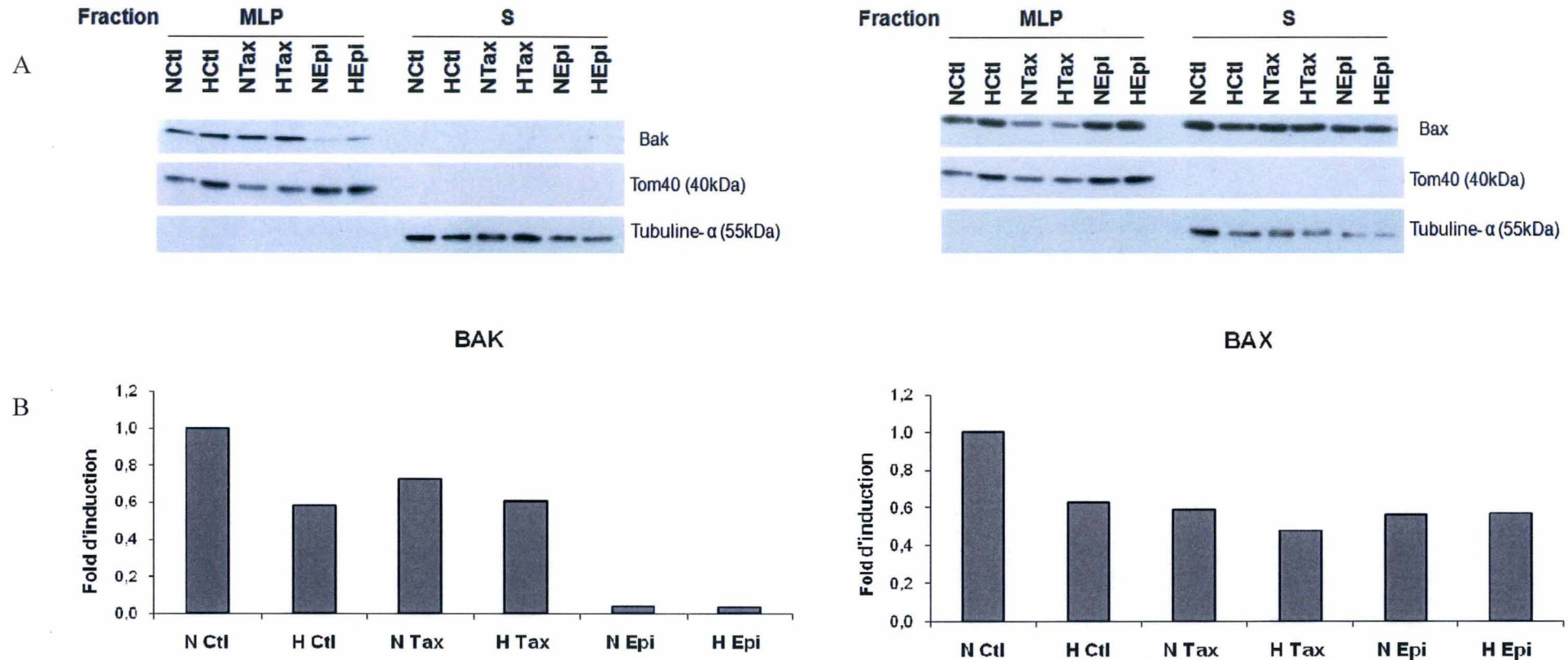
PCR en temps réel :

Les cellules ont été repiquées dans des T75 à  $2.10^6$  cellules par boîte 24 heures avant d'être incubées dans du milieu CO<sub>2</sub> indépendant durant 16 heures en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en présence ou en absence (Ctl) de taxol (Tax) à 50  $\mu$ M ou d'épirubicine (Epi) à 10  $\mu$ M. Une extraction d'ARN totale a ensuite été réalisée et les ARNm obtenus ont été rétrotranscrits en ADNc à l'aide d'amorces oligodT et de la Reverse Transcriptase SuperScript II. Ensuite la PCR en temps réel a été réalisée afin d'étudier l'expression en ARNm des gènes d'intérêt. La PCR en temps réel est réalisée en présence de SYBRGreen et en utilisant des amorces spécifiques (conçues avec le programme informatique Primer Express 1.5) aux ARNm de Bak et Bax et au gène de normalisation 23 kDa (RPL13). Les résultats sont exprimés en fold d'induction par rapport à la condition contrôle (N Ctl).

### **2. Analyse des résultats**

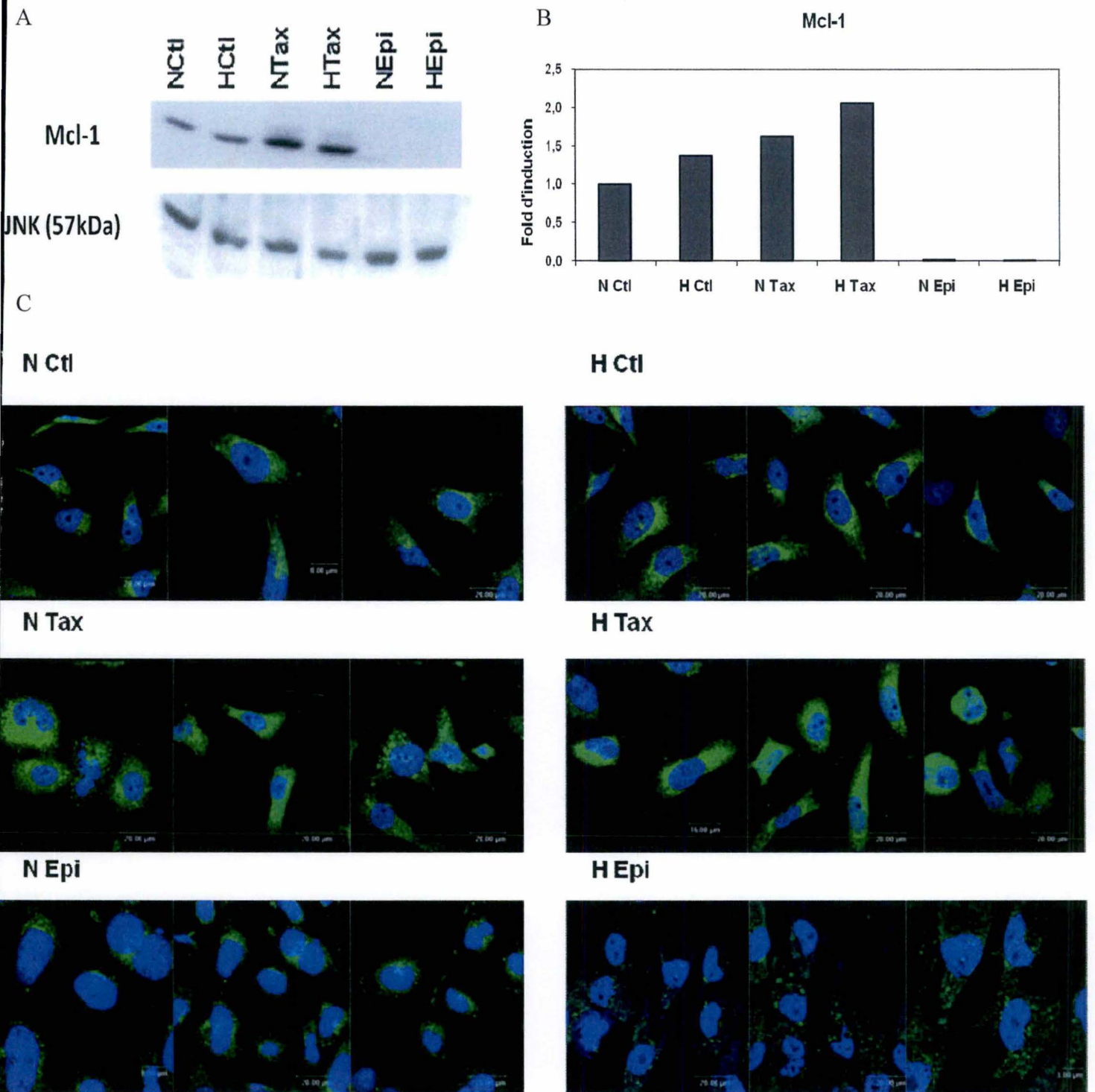
#### **2.1. Bax et Bak**

Bak et Bax sont des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 possédant les domaines BH1-3. En conditions normales, Bax est localisé dans le cytoplasme ou inséré dans la membrane mitochondriale externe sous forme monomère inactif ou inhibé par un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2. Bak quant à lui n'est localisé que dans la membrane mitochondriale externe sous forme de monomère inactif ou inhibé par un membre anti-



**Figure III.2 : Effets de l'hypoxie, du taxol et de l'épirubicine sur l'expression protéique et en ARNm de Bax et de Bak.**

Les cellules ont été incubées pendant 16 heures dans du milieu CO<sub>2</sub> indépendant en hypoxie (H) ou normoxie (N) en présence ou non (Ctl) de taxol (Tax) à 50 μM ou d'épirubicine (Epi) à 10 μM. **A.** Un fractionnement subcellulaire a été réalisé sur les cellules MDA-MB-231 et l'abondance de Bak et de Bax a été détecté par western blotting en utilisant un anticorps dirigé contre Bak et un anticorps dirigé contre Bax dans les fractions cytosolique (S) et mitochondriale (MLP). La tubuline-α et Tom 40 ont été détectés par western blotting pour vérifier que la quantité de protéines chargées dans le gel est équivalente dans chaque condition. **B.** L'ARN total a été extrait et rétrotranscrit en ADNc. Une PCR en temps réel a été réalisée avec des amorces spécifiques à Bax ou à Bak. RPL13A a été utilisé comme contrôle endogène (housekeeping gene) pour normaliser les résultats obtenus. Les résultats sont exprimés en fold d'induction par rapport à la condition contrôle N Ctl.



**Figure III.3 : Effets de l'hypoxie, du taxol et de l'épirubicine sur l'expression en protéine et en ARNm et sur la localisation subcellulaire de Mcl-1.**

Les cellules ont été incubées pendant 16 heures dans du milieu CO<sub>2</sub> indépendant en hypoxie (H) ou normoxie (N) en présence ou non (Ctl) de taxol (Tax) à 50  $\mu$ M ou d'épirubicine (Epi) à 10  $\mu$ M. **A.** Une extraction protéique a été réalisée et la protéine Mcl-1 a été détectée par western blotting en utilisant un anticorps dirigé contre Mcl-1. La protéine JNK a été détectée par western blotting pour vérifier que la quantité de protéines chargées sur le gel est équivalente pour chaque condition. **B.** L'ARN total a été extrait et rétrotranscrit en ADNc. Un PCR en temps réel a été réalisé avec des amorces spécifiques Mcl-1. RPL13A a été utilisé comme contrôle endogène (housekeeping gene) pour normaliser les résultats obtenus. Les résultats sont exprimés en fold d'induction par rapport à la condition contrôle N Ctl. **C.** Mcl-1 (vert) a été révélée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre Mcl-1 ; le noyau est marqué avec le Topro3 (bleu). Les cellules ont été observées en microscopie confocale. L'anticorps primaire est reconnu par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488.

apoptotique. Suite au déclenchement de l'apoptose, Bak et Bax sont activés suite à un changement de conformation et Bax est relocalisé dans la membrane mitochondriale externe. Il y a homo- ou hétéro-dimérisation de Bax et Bak induisant la formation de pores et la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Afin d'investiguer si Bak et Bax pourraient être impliqués dans la protection apportée par l'hypoxie, nous avons évalué leur abondance aux niveaux protéine et ARNm ainsi que leur localisation subcellulaire.

Les résultats, présentés à la Figure III.2, montrent que la quantité de protéine de Bax ne varie pas de manière importante entre les différentes conditions (après avoir corrigé l'abondance de Bax par rapport à celle de Tom40). De plus, aucune translocation de la protéine Bax depuis le cytosol vers la membrane mitochondriale externe n'est observée quand on regarde l'abondance respective de cette protéine dans les différentes fractions subcellulaires. Il semblerait que l'hypoxie et les agents diminuent l'abondance du transcrite de Bax.

L'hypoxie et le taxol diminuent également légèrement l'expression de l'ARNm de Bak tandis que l'épirubicine le diminue fortement. L'effet de l'épirubicine se retrouve au niveau protéique puisqu'une diminution de la quantité en protéine de Bak est observée en présence d'épirubicine.

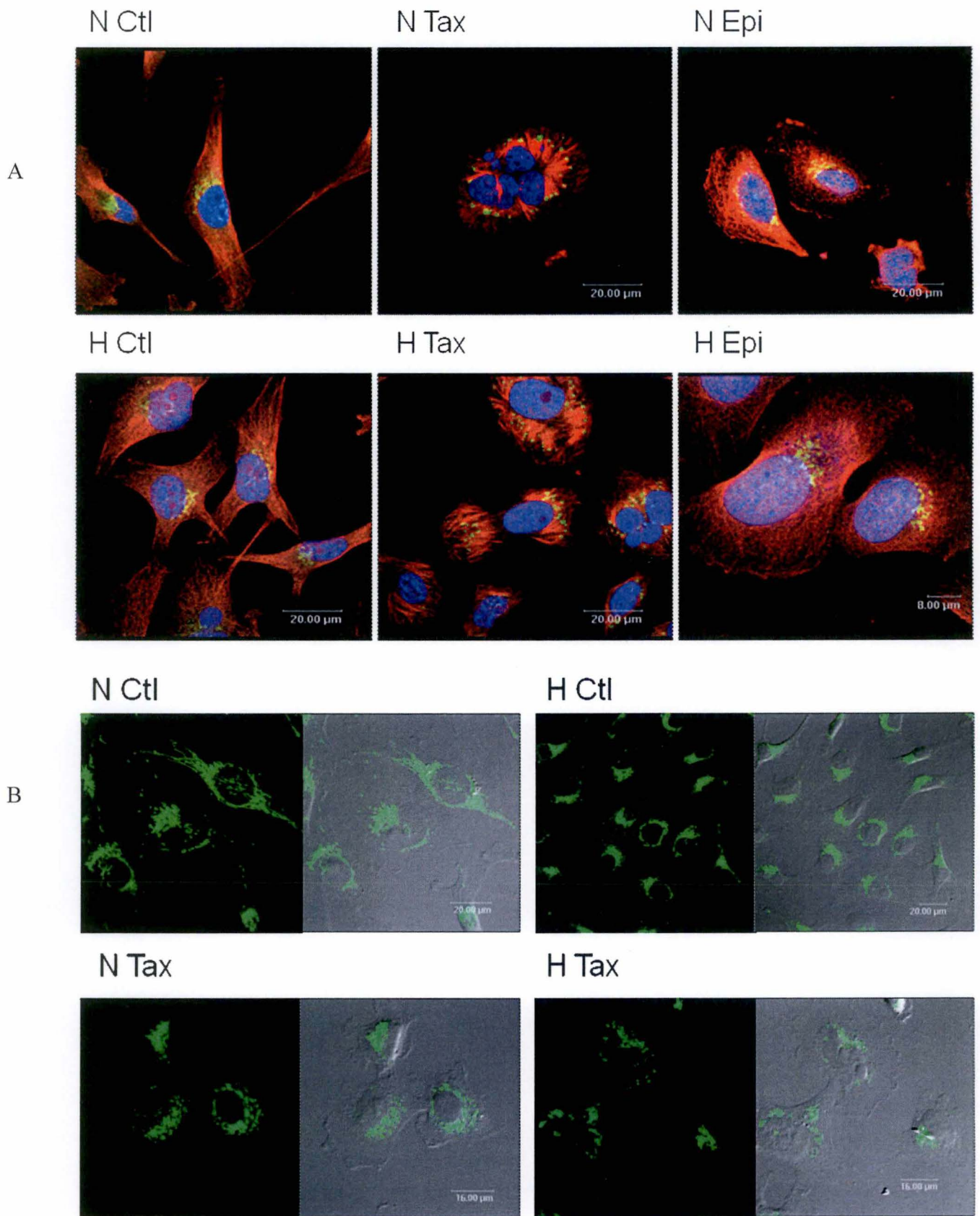
## **2.2. Mcl-1**

Mcl-1 est un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2 localisé dans la membrane mitochondriale externe et dont le rôle est d'inhiber les membres pro-apoptotiques (Bak, Bax, Bim) de la famille Bcl-2 en interagissant avec ceux-ci. Une surexpression de cette protéine associée à la résistance des cellules à l'apoptose est souvent observée dans certains cancers comme les leucémies. Afin d'investiguer si l'hypoxie et/ou les agents chimiothérapeutiques influencent son expression protéique, nous avons réalisé un western blotting avec des extraits obtenus par extraction protéique totale et sa localisation subcellulaire a été étudiée par marquage en immunofluorescence. Finalement, l'expression du transcrite Mcl-1 a été évaluée par PCR en temps réel.

L'expression protéique de Mcl-1 diminue fortement lorsque les cellules sont incubées en présence d'épirubicine en normoxie comme en hypoxie alors qu'en présence de taxol, son expression protéique augmente (Figure III.3A). Cette augmentation est légèrement moins importante en hypoxie. L'expression en ARNm de Mcl-1 (Figure III.3B) et les résultats obtenus par marquage en immunofluorescence (Figure III.3C) confirment les résultats obtenus par western blotting puisque l'expression en ARNm et en protéine de Mcl-1 diminue drastiquement en présence d'épirubicine et augmente en présence de taxol. Par contre, l'hypoxie semble induire une légère augmentation de l'expression en ARNm de Mcl-1 en présence et en absence de taxol.

## **2.3. Bim**

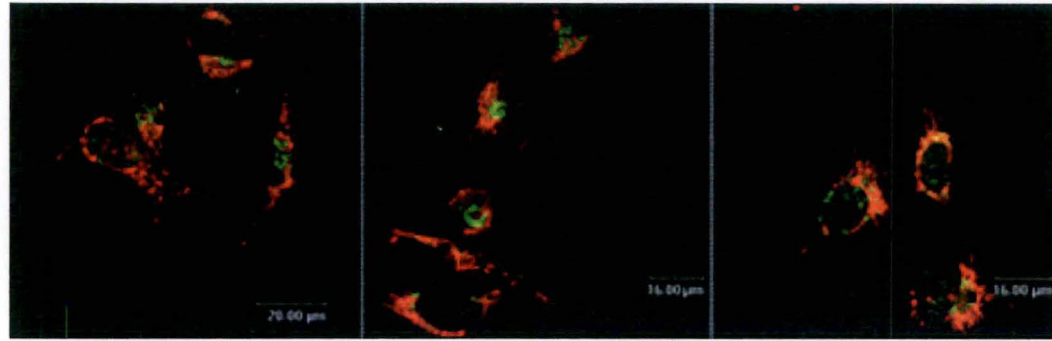
Bim est un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 possédant seulement le domaine BH3. En conditions normales, Bim est associé aux microtubules via sa liaison à la chaîne légère de la dynéine. Suite à un stimulus apoptotique, comme des dommages à l'ADN, il est libéré des microtubules et est transloqué dans la membrane mitochondriale externe où il induit la formation de pores en inhibant Bcl-2, lorsque Bim n'est pas inhibé par Mcl-1. Nous avons investigué, par marquage en immunofluorescence si le taxol (un agent qui se lie à la sous-unité  $\beta$  de la tubuline et induit la polymérisation des microtubules) induit une relocalisation subcellulaire de Bim. Ensuite, nous avons étudié si la morphologie du réseau mitochondrial est modifiée en présence de taxol et si Bim est relocalisé dans la membrane mitochondriale externe. Pour savoir si cette relocalisation a lieu, nous avons étudié si Bim colocalise avec Tom20, une protéine de la membrane mitochondriale externe.



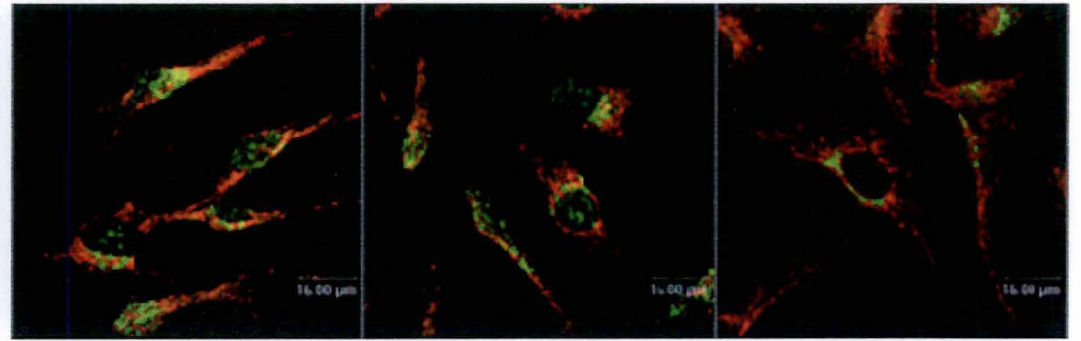
**Figure III.4 : Effets de l'hypoxie, du taxol et de l'épirubicine sur la localisation subcellulaire de Bim sur morphologie des microtubules et effets de l'hypoxie et du taxol sur la morphologie du réseau mitochondrial.**

Les cellules MDA-MB-231 ont été incubées en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en présence ou non (Ctl) de taxol (Tax) à 50 μM d'épirubicine (Epi) à 10 μM. **A.** Bim (en vert) a été marqué à l'aide d'un anticorps anti-Bim, les microtubules (en rouge) ont été marqués à l'aide d'un anticorps anti-tubuline-α et le noyau (en bleu) a été marqué à l'aide du Topro 3. Les anticorps primaires sont reconnus respectivement par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 et 546. **B.** Tom 20 (vert) a été marqué à l'aide d'un anticorps anti-Tom 20. L'anticorps primaire est reconnu par des anticorps secondaires couplés à l'Alexa 488.

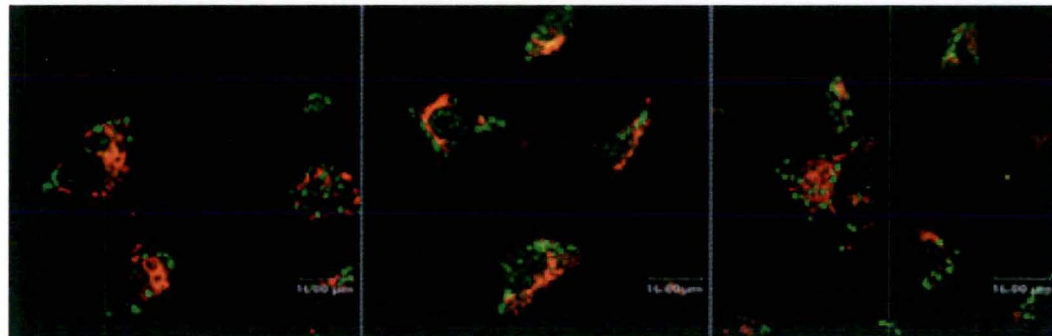
N Ctl



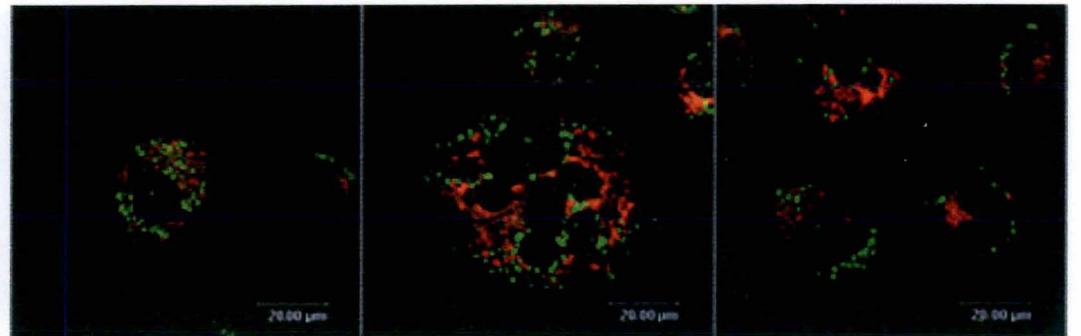
H Ctl



N Tax



H Tax



**Figure III.5 : Effets de l'hypoxie et du taxol sur la localisation subcellulaire de Bim.**

Les cellules MDA-MB-231 ont été incubées en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en présence ou non (Ctl) de taxol (Tax) à 50 μM. Bim (en vert) a été marqué à l'aide d'un anticorps anti-Bim, Tom20 (en rouge) a été marqué à l'aide d'un anticorps anti-Tom20. Les anticorps primaires sont reconnus respectivement par des anticorps secondaires couplés à l'Alexa 488 et 647.

Les résultats sont présentés à la Figure III.4A. L'épirubicine et l'hypoxie n'influencent pas le réseau de microtubules car aucune différence morphologique n'est observée par rapport à la condition contrôle. Par contre, en présence de taxol, la morphologie du réseau de microtubules est modifiée, les microtubules sont plus courts et plus épais car leur polymérisation est stabilisée par le taxol. Parallèlement à la modification morphologique du réseau de microtubules, une éventuelle relocalisation de Bim a été investiguée. On observe que la distribution de Bim est périnucléaire en condition contrôle et dans les cellules incubées en présence d'épirubicine, en normoxie comme en hypoxie, alors qu'en présence de taxol, la protéine Bim est redistribuée dans les cellules. En effet, la protéine Bim n'est plus localisée autour du noyau mais semble être redistribuée aux extrémités des microtubules et sa distribution est plus ponctuelle par rapport aux cellules contrôle. Par conséquent, le taxol, en perturbant le réseau de microtubules, modifie la localisation de Bim.

La Figure III.4B montre que le taxol et l'hypoxie modifient également la morphologie du réseau mitochondrial. Tom20, une protéine de la membrane mitochondriale externe, est marquée en vert et permet de mettre en évidence la morphologie du réseau mitochondrial. Les cellules contrôles présentent un réseau mitochondrial régulier, étendu dans toute la cellule alors que les cellules incubées en présence de taxol possèdent un réseau mitochondrial irrégulier et ponctué qui ne s'étend pas dans toute la cellule. Le taxol induit donc une fragmentation du réseau mitochondrial. L'hypoxie seule modifie également le réseau mitochondrial mais d'une manière différente du taxol : les cellules incubées en hypoxie présentent un réseau mitochondrial moins étendu, plutôt localisé autour du noyau.

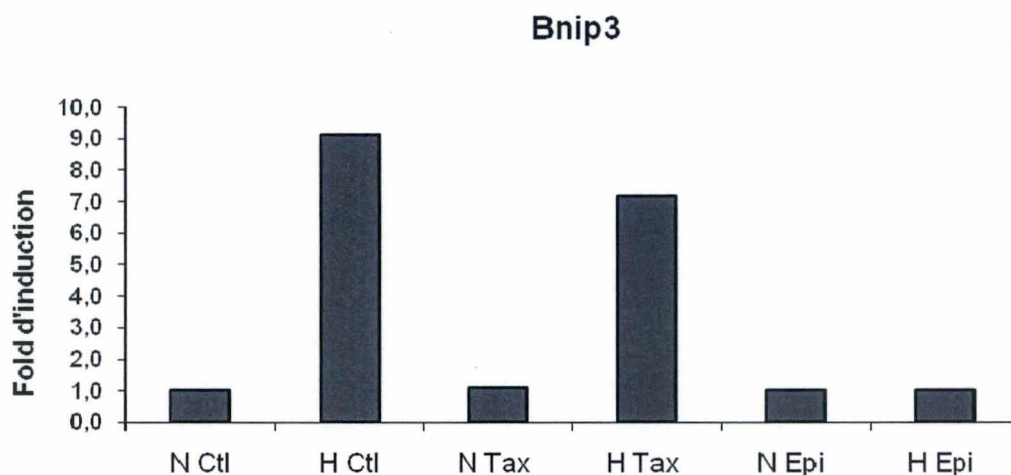
Bim et le réseau mitochondrial étant relocalisés en présence de taxol, nous avons décidé d'investiguer si Bim est relocalisé dans la membrane mitochondriale externe en présence de taxol. Pour ce faire, nous avons effectué un co-marquage de Bim (en vert) et de Tom20 (en rouge). La Figure III.5 montre que le taxol induit à nouveau une relocalisation et une ponctuation de Bim et du réseau mitochondrial. En effet, Bim est localisé autour du noyau dans la condition contrôle alors qu'en présence de taxol, Bim est redistribué dans la cellule et le marquage est plus ponctué. La morphologie du réseau mitochondrial est également modifiée et plus ponctuelle en présence de taxol par rapport à la condition contrôle. Cependant, Bim n'est pas relocalisé dans la membrane mitochondriale externe car aucune colocalisation de Bim et de Tom20 n'est observée.

#### **2.4. Bnip3**

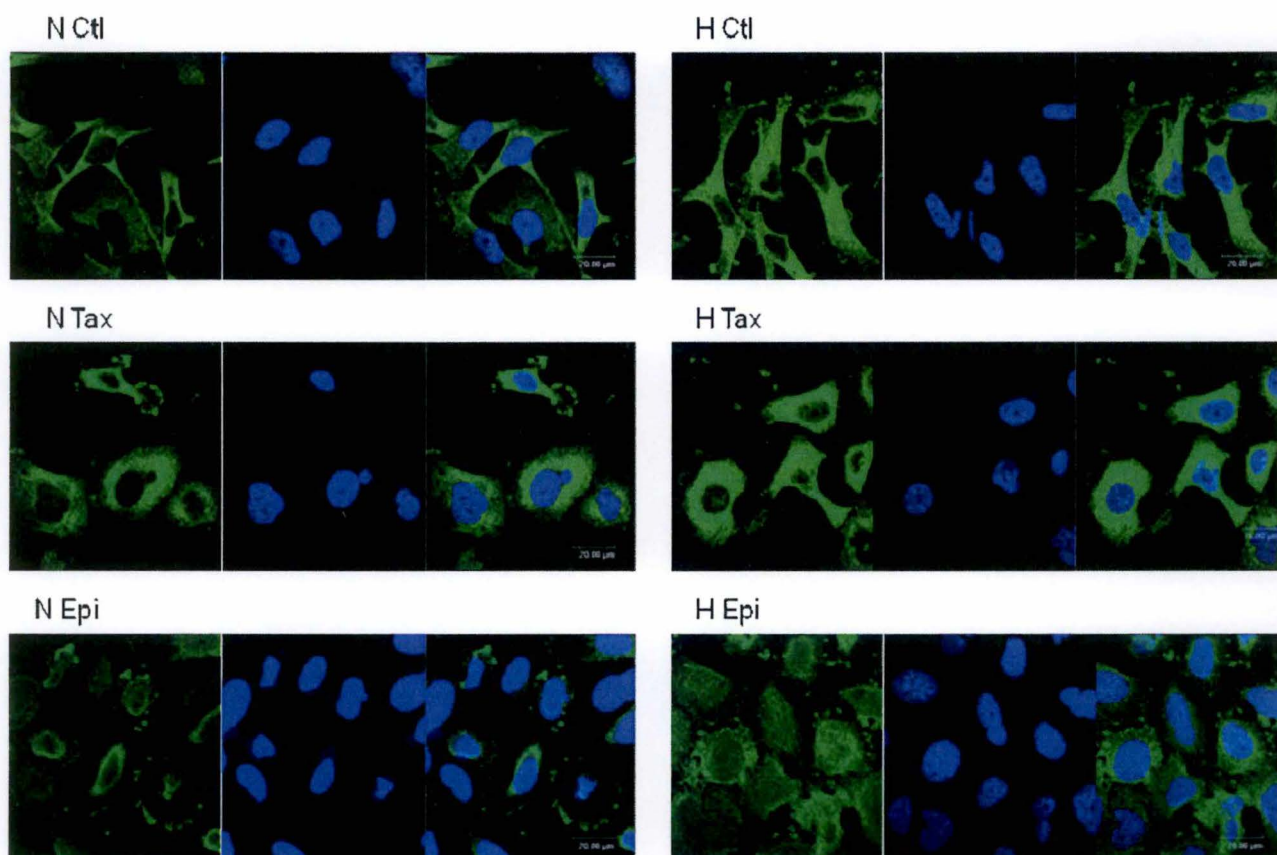
Bnip3 est un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 possédant uniquement le domaine BH3. En conditions normales, Bnip3 est localisé dans le cytoplasme ou dans la membrane mitochondriale. Son expression est augmentée en hypoxie car Bnip3 est un gène cible de HIF-1. Suite à stimulus apoptotique Bnip3 induit l'apoptose en perméabilisant la membrane mitochondriale externe. De récentes études ont démontré que Bnip3 joue également un rôle dans l'activation de l'autophagie dans certaines conditions. Afin d'investiguer si l'expression de Bnip3 est influencée par les agents chimiothérapeutiques d'intérêt, une PCR en temps réel et un marquage en immunofluorescence ont été réalisés.

La Figure III.6A montre que l'hypoxie induit une forte augmentation de l'expression en ARNm de Bnip3 comme décrit dans la littérature. Le taxol n'affecte que peu cette surexpression de Bnip3 induite par l'hypoxie alors que l'épirubicine inhibe complètement cette surexpression. En effet, en hypoxie et en présence d'épirubicine, une diminution drastique de l'expression en ARNm de Bnip3 est observée. L'expression protéique de Bnip3 observée par marquage en immunofluorescence (Figure III.6B) suit le même profil et

A



B



**Figure III.6 : Effets de l'hypoxie, du taxol et de l'épirubicine sur l'abondance protéique et en ARNm de Bnip3.**

Les cellules MDA-MB-231 ont été incubées en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en présence ou non (Ctl) de taxol (Tax) à 50  $\mu$ M ou d'épirubicine (Epi) à 10  $\mu$ M. **A.** L'ARN total a été extrait et rétrotranscrit en ADNc. Une PCR en temps réel a été réalisée avec des amorces spécifiques à Bnip3. RPL13A a été utilisé comme housekeeping gene pour normaliser les résultats obtenus. Les résultats sont exprimés en fold d'induction par rapport à la condition contrôle N Ctl. **B.** Bnip3 (en vert) a été marqué à l'aide d'un anticorps anti-Bnip3 et le noyau (en bleu) a été marqué à l'aide du Topro 3.

confirme les résultats obtenus par PCR en temps réel. Bnip3 est localisé dans le cytoplasme des cellules et sa localisation subcellulaire ne varie pas en fonction des conditions expérimentales. Nous n'avons pas pu confirmer ces résultats en western blot car l'anticorps anti-Bnip3 disponible ne le permet pas.

## **2.5. Conclusion**

L'étude des effets de l'hypoxie et des agents chimiothérapeutiques sur l'expression et la localisation subcellulaire de certains membres de la famille Bcl-2 nous a permis de mettre en évidence une série de résultats intéressants.

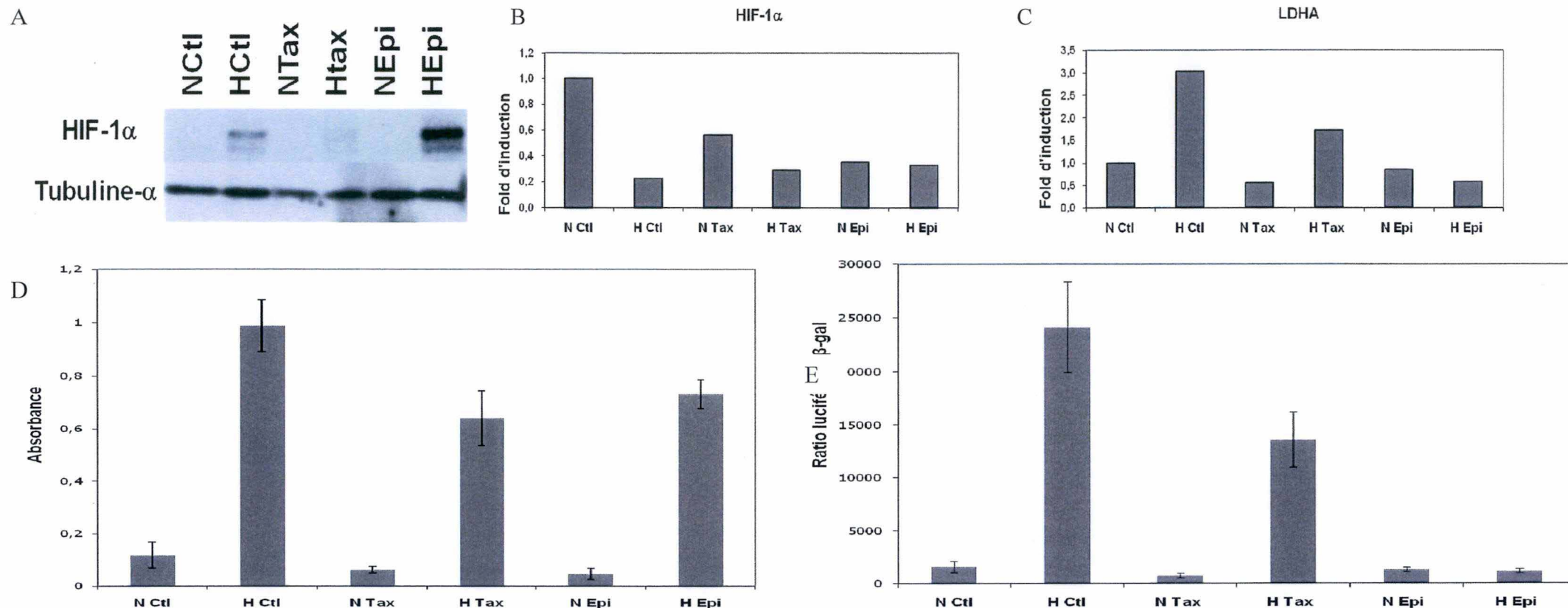
L'abondance protéique de Bax ne varie pas de manière importante entre les différentes conditions tandis que l'hypoxie et les agents semblent diminuer légèrement l'abondance du transcrit de Bax. De plus, aucune translocation de la protéine Bax depuis le cytosol vers la membrane mitochondriale externe n'a été observée. L'hypoxie et le taxol diminuent également légèrement l'expression de l'ARNm de Bak tandis que l'épirubicine le diminue fortement. L'effet de l'épirubicine se retrouve au niveau protéique puisqu'une diminution de la quantité en protéine de Bak est observée en présence d'épirubicine.

Puisque l'expression de Bax ne varie pas entre les conditions hypoxie et normoxie quand les cellules sont incubées en présence de taxol ou d'épirubicine, la protection apportée par l'hypoxie semble être indépendante de Bax. Par contre, Bak pourrait jouer un rôle dans la protection apportée par l'hypoxie car l'expression de son ARNm diminue en hypoxie en absence et en présence de taxol.

Nous avons ensuite étudié les effets de l'hypoxie et des agents sur l'expression en protéine et en ARNm de Mcl-1. Mcl-1 est une protéine anti-apoptotique dont l'expression en protéine et en ARNm est légèrement augmentée en présence de taxol et totalement inhibée en présence d'épirubicine. De plus, l'hypoxie semble induire une légère augmentation de l'expression en ARNm de Mcl-1 en présence et en absence de taxol. Par conséquent, Mcl-1 pourrait jouer un rôle dans la protection apportée par l'hypoxie.

Nous avons ensuite étudié les effets de l'hypoxie et des agents sur l'expression de Bim et sur la morphologie des microtubules et du réseau mitochondrial. Nous avons observé que le taxol modifie la structure des microtubules et parallèlement, la localisation subcellulaire de Bim qui semble être relocalisé aux extrémités des cellules. La morphologie du réseau mitochondrial est également modifiée. Nous avons en effet observé que le taxol induit une fragmentation du réseau mitochondrial et que l'hypoxie induit son rassemblement autour du noyau. Cependant, même si Bim est relocalisé, cette relocalisation ne se réalise pas dans la membrane mitochondriale. Par conséquent, il semble que l'apoptose induite par le taxol soit indépendante de l'action de Bim sur la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe.

Finalement, nous avons étudié les effets de l'hypoxie et des agents sur l'expression de Bnip3, une protéine pouvant jouer un rôle pro- ou anti-apoptotique. L'expression en protéine et en ARNm de Bnip3 est induite en hypoxie. Le taxol n'influence pas cette augmentation d'expression tandis que l'épirubicine inhibe complètement cette surexpression. Par conséquent, Bnip3, qui est impliqué dans l'activation de l'autophagie dans certaines conditions, pourrait jouer un rôle dans la protection des MBA-MB-231 si l'on considère qu'il joue un rôle protecteur et anti-apoptotique en induisant l'autophagie. En effet, Bnip3 est exprimé en hypoxie en présence de taxol lorsque la protection est observée mais pas en hypoxie en présence d'épirubicine lorsque les cellules meurent par apoptose. Des expériences supplémentaires devraient être réalisées pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Par ailleurs, pour comprendre les mécanismes responsables de l'inhibition de l'expression de Bnip3 en présence d'épirubicine et sachant qu'il est un gène cible de HIF-1, nous avons décidé d'étudier l'activité du facteur de transcription HIF-1.



**Figure III.7 : Effets de l'hypoxie, du taxol et de l'épirubicine sur l'expression protéique et en ARNm de HIF-1α et sur l'activité de liaison et transcriptionnelle de HIF-1.**

Les cellules ont été incubées en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en présence ou non (Ctl) de taxol (Tax) à 50 μM ou d'épirubicine (Epi) à 10 μM. **A.** Une extraction protéique a été réalisée sur les cellules et l'abondance de HIF-1α a été analysée par western blotting en utilisant un anticorps dirigé contre HIF-1α. La tubuline-α a également été détectée pour vérifier que la quantité de protéines chargées sur le gel est équivalente pour chaque condition. **B-C.** L'ARN total a été extrait et rétrotranscrit en ADNc. Une PCR en temps réel a été réalisée avec des amorces spécifiques à HIF-1α et à LDHA. RPL13A a été utilisé comme housekeeping gene pour normaliser les résultats obtenus. Les résultats sont exprimés en fold d'induction par rapport à la condition contrôle N Ctl. **D.** Après incubation, des extraits nucléaires ont été réalisés et hybridés dans des puits ELISA contenant des sondes d'ADN spécifiques (TransAM). La mesure de l'activité de liaison à l'ADN a été réalisée en utilisant un anticorps anti-HIF-1α et les résultats sont exprimés en absorbance en tant que moyenne ± 1 écart-type (n=3). **E.** Les cellules ont été transfectées avec le plasmide rapporteur pGL3-(PGK-HRE<sub>6</sub>)-tk-luc et le plasmide de normalisation pCMV-βGal avant d'être incubées. Après l'incubation, l'activité luciférase et l'activité β-galactosidase ont été mesurées. Les résultats sont calculés en réalisant le rapport entre l'activité luciférase et l'activité β-galactosidase et sont exprimés en tant que moyenne ± 1 écart-type (n=4).

## **Partie III : Etude du rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la protection apportée par l'hypoxie**

L'hypoxie est souvent associée avec la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques. En effet, lorsque les cellules subissent un stress hypoxique, elles activent une série de mécanismes qui leur permettent non seulement de s'adapter à l'hypoxie mais également d'échapper à la mort cellulaire induite par les agents chimiothérapeutiques. HIF-1 est le principal facteur de transcription responsable de l'adaptation des cellules cancéreuses à l'hypoxie et son expression dans les tumeurs est très souvent corrélée avec un pronostic négatif. Afin d'investiguer le rôle potentiel que joue HIF-1 dans la protection des MDA-MB-231 contre l'apoptose induite par le taxol en hypoxie et afin de comprendre pourquoi l'expression de Bnip3 n'est pas augmentée en hypoxie en présence d'épirubicine, nous avons, dans un premier temps, réalisé une étude fonctionnelle du facteur de transcription HIF-1. Pour ce faire, nous avons étudié l'expression protéique et en ARNm de HIF-1 $\alpha$  et nous avons mesuré l'activité de liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

Dans un second temps, nous avons utilisé des siRNA dirigés contre la sous-unité HIF-1 $\alpha$  afin d'en inhiber l'expression et ainsi l'activité transcriptionnelle de HIF-1 et nous avons étudié l'influence de cette inhibition sur l'apoptose induite par les agents, en normoxie et en hypoxie.

### **1. Effets de l'hypoxie et des agents chimiothérapeutiques sur l'activité de HIF-1**

#### **1.1. Etude de l'expression protéique de HIF-1 $\alpha$**

##### **1.1.1. Description de l'expérience**

Les cellules ont été repiquées dans des T25 à 650 000 cellules par boîte 24 heures avant d'être incubées dans du milieu CO<sub>2</sub> indépendant durant 16 heures en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en présence ou en absence (Ctl) de taxol (Tax) à 50  $\mu$ M ou d'épirubicine (Epi) à 10  $\mu$ M. Une extraction protéique totale est ensuite réalisée suivie de l'évaluation de l'abondance de HIF-1 $\alpha$  par western blotting. HIF-1 $\alpha$  est révélé en utilisant un anticorps spécifique reconnaissant la sous-unité HIF-1 $\alpha$  et la tubuline- $\alpha$  sert de contrôle de charge.

##### **1.1.2. Analyse des résultats**

La Figure III.7A montre que la sous-unité HIF-1 $\alpha$  n'est pas détectée en normoxie, ce qui signifie que la quantité de sous-unité HIF-1 $\alpha$  présente est trop faible que pour être détectée par western blotting. En hypoxie, par contre, la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est détectée en absence (Ctl) ou en présence de taxol (Tax) ou d'épirubicine (Epi), ce qui signifie que sa stabilisation est induite par l'hypoxie. En présence de taxol, la quantité protéique de HIF-1 $\alpha$  est moindre par rapport à la condition contrôle, alors qu'en présence d'épirubicine, une augmentation importante de l'abondance de HIF-1 $\alpha$  est observée. Ce résultat est plutôt contradictoire avec les résultats obtenus pour l'expression de Bnip3 puisque c'est lorsque la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  est la plus importante (en hypoxie en présence d'épirubicine) que l'expression de Bnip3 est inhibée. Pour savoir si l'augmentation de la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  observée est due à une augmentation de son ARNm, nous avons quantifié l'expression de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$ .

## **1.2. Etude de l'expression de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$**

### **1.2.1. Description de l'expérience**

Les cellules ont été repiquées dans des T75 à une densité de  $2.10^6$  cellules par boîte 24 heures avant d'être incubées dans du milieu CO<sub>2</sub> indépendant durant 16 heures en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en présence ou en absence (Ctl) de taxol (Tax) à 50  $\mu$ M ou d'épirubicine (Epi) à 10 $\mu$ M. Une extraction des ARN totaux a ensuite été réalisée et les ARNm obtenus ont été rétrotranscrits en ADNc à l'aide d'amorces oligodT et de la Reverse Transcriptase SuperScript II. Ensuite la PCR en temps réel a été réalisée en présence de SYBRGreen et en utilisant des amorces spécifiques (conçues avec le programme informatique Primer Express 1.5) à l'ADNc de HIF-1 $\alpha$  et au gène de normalisation RPL13. Les résultats sont exprimés en fold d'induction par rapport à la condition contrôle.

### **1.2.2. Analyse des résultats**

L'hypoxie, le taxol et l'épirubicine diminuent l'abondance de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$  (Figure III.7B). L'augmentation de la quantité protéique de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie en présence d'épirubicine n'est donc pas due à une augmentation de l'expression de son ARNm puisque l'expression de l'ARNm HIF-1 $\alpha$  est faible dans cette condition (H Epi).

## **1.3. Etude de l'activité de liaison à l'ADN de HIF-1**

L'inhibition de l'expression de Bnip3 en hypoxie et en présence d'épirubicine n'est pas due à une absence de stabilisation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$ . Nous avons donc mesuré l'activité de liaison à l'ADN de HIF-1 pour savoir si HIF-1 se lie à l'ADN en hypoxie en présence d'épirubicine.

### **1.3.1. Description de l'expérience**

Les cellules ont été repiquées dans des T75 à  $2.10^6$  cellules par boîte 24 heures avant d'être incubées dans du milieu CO<sub>2</sub> indépendant durant 16 heures en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en présence ou en absence (Ctl) de taxol (Tax) à 50  $\mu$ M ou d'épirubicine (Epi) à 10  $\mu$ M. Après incubation, une extraction nucléaire est réalisée et l'activité de liaison de HIF-1 à l'ADN est mesurée par dosage colorimétrique réalisé dans une plaque 96 puits coatée avec un oligonucléotide contenant le site consensus reconnu par HIF-1 (Trans-AM).

### **1.3.2. Analyse des résultats**

La Figure III.7D montre que HIF-1 se lie à l'ADN en normoxie à un niveau basal très faible et que le taxol ou l'épirubicine seul n'augmente pas l'activité de liaison à l'ADN de HIF-1. En hypoxie, on observe une forte augmentation de l'activité de liaison à l'ADN en absence (Ctl) ou en présence de taxol (Tax) ou d'épirubicine (Epi) avec une activité un peu plus faible mais toujours bien présente, en présence de taxol ou d'épirubicine. Ce n'est donc pas à cause d'une inhibition de l'activité de liaison à l'ADN que l'expression de Bnip3 est inhibée en hypoxie en présence d'épirubicine. Nous avons alors étudié l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

## **1.4. Etude de l'activité transcriptionnelle de HIF-1**

Afin de déterminer si l'inhibition de l'expression de Bnip3 est due à une suppression de l'activité transcriptionnelle de HIF-1, nous avons mesuré l'activité transcriptionnelle de HIF-1 à l'aide d'un système rapporteur et en suivant l'expression d'un autre de ses gènes cibles, la LDHA (lactate déshydrogénase). Pour ce faire, un plasmide rapporteur (pGL3-(PGK-HRE<sub>6</sub>)tk-luc) et un plasmide de normalisation (pCMV- $\beta$ -gal) pour le système rapporteur sont intégrés dans les cellules à l'aide d'un agent transfectant, le superfect. Le plasmide rapporteur

porte le gène de la luciférase dont le promoteur contient la séquence consensus reconnue par HIF-1. Le plasmide de normalisation est un plasmide qui possède le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase placé sous contrôle d'un promoteur constitutif.

### **1.4.1. Description de l'expérience**

Les cellules ont été repiquées dans des plaques 24 puits à une densité de 35 000 cellules par puits 24 heures avant la transfection. Les cellules sont transfectées avec les différents plasmides (12/13 de plasmide rapporteur et 1/13 de plasmide de normalisation) durant 5 heures, puis le milieu est changé 24 heures avant d'incuber les cellules dans du milieu CO<sub>2</sub> indépendant durant 16 heures en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en présence ou en absence (Ctl) de taxol (Tax) à 50  $\mu$ M ou d'épirubicine (Epi) à 10  $\mu$ M. Après incubation, une mesure de l'activité de la luciférase et de la  $\beta$ -galactosidase est réalisée.

### **1.4.2. Analyse des résultats**

En normoxie, HIF-1 présente une activité transcriptionnelle très faible ; le taxol ou l'épirubicine seul n'induit pas l'activité transcriptionnelle de HIF-1. En hypoxie en absence (H Ctl) et en présence de taxol (H Tax), l'activité transcriptionnelle de HIF-1 augmente de manière importante alors qu'en présence d'épirubicine (H Epi), on observe une suppression complète de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Figure III.7E). Ces résultats démontrent que l'épirubicine inhibe l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Nous avons également étudié l'expression en ARNm d'un autre gène cible de HIF-1 (LDHA) afin de confirmer que lorsque HIF-1 est inactif, l'expression de ses gènes cibles est inhibée. Les résultats, obtenus par PCR en temps réel (Figure III.7C), montrent que l'hypoxie induit bien l'expression de la LDHA, le taxol inhibe légèrement cette induction tandis que l'épirubicine l'inhibe complètement. Ces résultats sont en accord avec les résultats mesurant l'activité transcriptionnelle de HIF-1 à l'aide du système rapporteur.

## **1.5. Conclusion**

L'ensemble de ces résultats indiquent que l'épirubicine inhibe l'activité transcriptionnelle de HIF-1 directement, c'est-à-dire, sans inhiber sa liaison à l'ADN ni la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ . Cette inhibition explique la diminution d'expression de l'ARNm de la LDHA et de Bnip3 observées dans les résultats précédents.

D'autres gènes dont l'expression est régulée par HIF-1 devraient, comme Bnip3 et la LDHA, ne pas être exprimés en hypoxie en présence d'épirubicine. Or, il a été démontré que HIF-1 pouvait être responsable non seulement de l'adaptation des cellules cancéreuses à l'hypoxie mais aussi de leur protection contre l'apoptose induite par certains agents chimiothérapeutiques. Par conséquent, on peut imaginer que lorsque HIF-1 est inactif, comme c'est le cas en présence d'épirubicine, les cellules ne sont plus protégées et meurent par apoptose alors que quand HIF-1 est actif, comme c'est la cas en présence de taxol, les cellules deviennent résistantes à l'apoptose induite par l'agent.

Par conséquent, HIF-1 représente un acteur potentiel dans la protection apportée par l'hypoxie lorsque les cellules MDA-MB-231 sont incubées en présence de taxol. Nous avons donc décidé d'utiliser des siRNA dirigés contre la sous-unité HIF-1 $\alpha$  afin d'inhiber l'activité de HIF-1 et d'étudier les effets induits par cette inhibition sur l'apoptose induite par les agents.

## **2. Effets des siRNA anti-HIF-1 $\alpha$ sur l'apoptose induite par le taxol ou l'épirubicine**

Afin de vérifier si HIF-1 est impliqué dans la protection des cellules MDA-MB-231 en hypoxie, contre l'apoptose induite par le taxol, nous avons utilisé des siRNA qui permettent d'inhiber l'expression protéique de HIF-1 $\alpha$  et ainsi d'inhiber l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Dans un premier temps, nous avons mis au point un protocole de transfection efficace pour ensuite mesurer l'activité de la caspase 3 présente au sein des cellules transfectées avec le siRNA anti-HIF1- $\alpha$ . Le but de cette approche est d'observer si en inhibant l'expression et l'activité de HIF-1, l'activité caspase 3 est augmentée en hypoxie en présence de taxol lorsque la protection est observée. Si l'activité caspase 3 augmente, cela signifie que HIF-1 est impliqué dans la protection des cellules.

### **2.1. Bref rappel du principe de fonctionnement des siRNA**

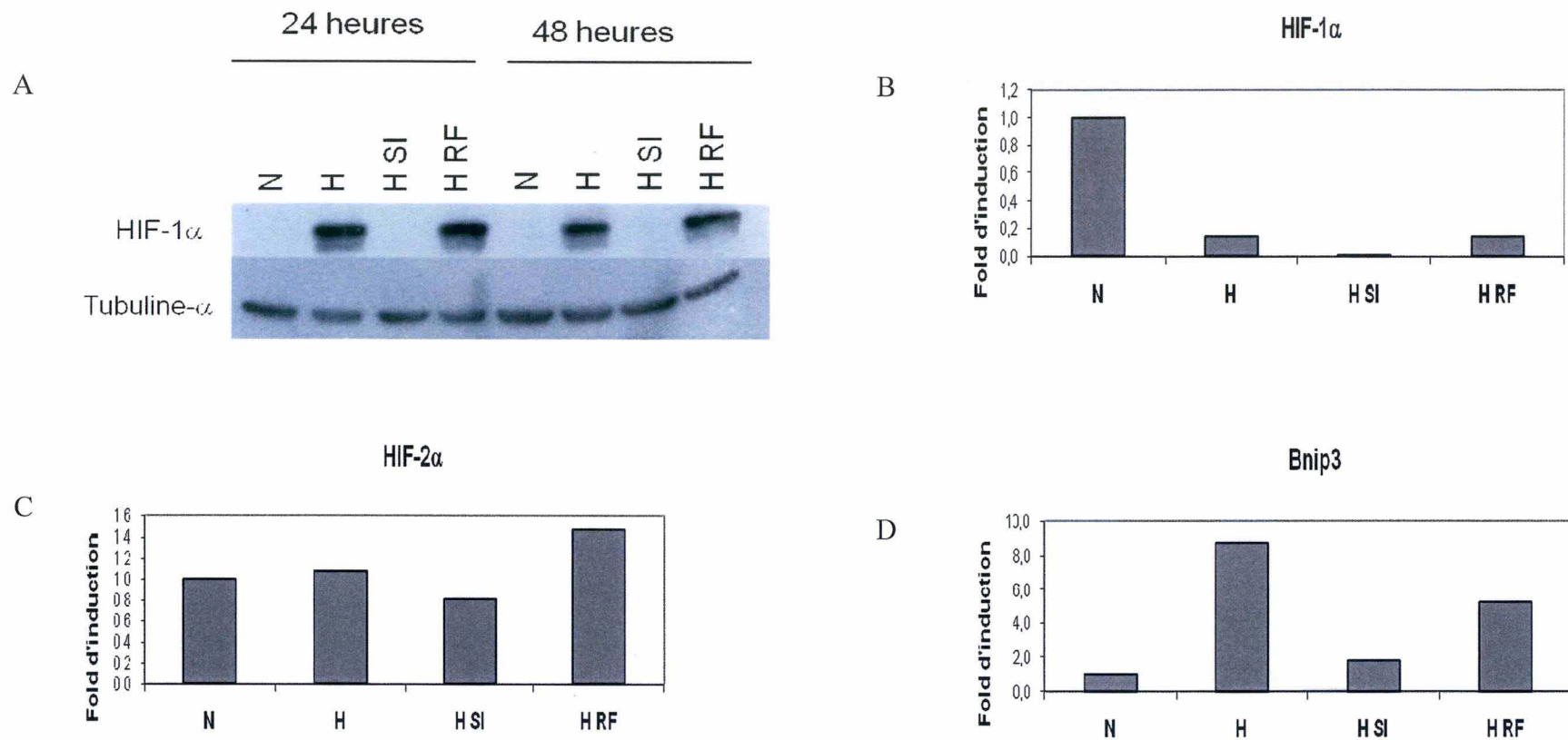
Les siRNA (small interfering RNA) sont des petits ARN double brin d'une longueur de 19 à 21 paires de nucléotides comportant une extrémité 3' « overhang » de 2 nucléotides et une extrémité 5' phosphate. Ils sont obtenus à partir de longs doubles brins d'ARN qui sont produits par transcription de parties de l'ADN et qui ont subi un clivage par la ribonucléase DICER. Les siRNA sont ensuite reconnus dans le cytoplasme de la cellule par le complexe multi-protéique RISC (RNA induced silencing complexe) qui va permettre le désappariement des deux brins. Ensuite, RISC reste associé au brin anti-sens et va reconnaître l'ARN messenger complémentaire au brin antisens. En fonction du degré d'homologie entre le brin antisens et l'ARN messenger, deux réponses sont possibles. Si l'homologie est parfaite, RISC va induire la dégradation de l'ARN messenger par clivage tandis que si l'homologie n'est pas parfaite et que l'appariement comprend quelques mismatch, RISC inhibe la traduction de l'ARNm. La voie des siRNA est une voie qui a été conservée au cours de l'évolution. Dans les deux cas, la protéine encodée par l'ARNm n'est plus ou presque plus traduite. Ce mécanisme est maintenant de plus en plus exploité pour inhiber l'expression de protéines d'intérêt en fabriquant des siRNA artificiels que l'on introduit dans la cellule à l'aide d'un agent transfectant. Les siRNA utilisés au cours de ce mémoire sont un mélange de quatre siRNA différents ciblant l'ARNm de la sous-unité HIF-1 $\alpha$ . Nous avons également utilisé un siRNA « RISC Free » qui n'est pas reconnu par le complexe protéique RISC et qui sert de contrôle négatif. L'agent transfectant utilisé, le Dharmafect n°1, est un agent lipofectant spécialement conçu pour permettre la transfection de petits ARN double brins tout en gardant une très faible toxicité, ce qui permet de réaliser des transfusions de longue durée (24 heures) sans induire de mort cellulaire.

### **2.2. Mise au point**

Une série de mises au point ont été effectuées pour s'assurer de l'efficacité des siRNA choisis ainsi que pour en optimiser les conditions d'utilisation. Dans un premier temps, nous avons suivi l'abondance protéique de HIF-1 $\alpha$  24 et 48 heures après la transfection. Le choix de la concentration en siRNA utilisée est basé sur des mises au point réalisées précédemment avec le même siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  dans un type cellulaire différent, les cellules HepG2. La concentration optimale définie par ces mises au point est de 50 nM et nous avons utilisé cette concentration pour transférer les cellules MDA-MB-231 et suivre l'abondance de HIF-1 $\alpha$ .

#### **2.2.1. Effet du siRNA anti-HIF-1 $\alpha$ sur l'abondance de la protéine HIF-1 $\alpha$**

Le but de cette expérience est de vérifier l'efficacité d'inhibition de l'expression de HIF-1 $\alpha$  après transfection avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  à une concentration de 50 nM.



**Figure III.8: Mise au point des conditions optimales pour la transfection des cellules MDA-MB-231 avec les siRNA anti-HIF-1α.**

Les cellules ont été transfectées durant 24 heures en présence des siRNA anti-HIF-1α (SI) ou du siRNA RiscFree (RF) à 50 nM. Les cellules ont ensuite été incubées en normoxie (N) ou en hypoxie (H). **A.** Après les 24 heures de transfection, un temps de repos de 24 ou 48 heures a été laissé aux cellules avant de les incubées en normoxie ou en hypoxie. Après une incubation de 5 heures, une extraction protéique a été réalisée sur les cellules et l'abondance de HIF-1α a été détectée par western blotting en utilisant un anticorps dirigé contre HIF-1α. La tubuline-α a été détectée par western blotting pour vérifier que la quantité de protéines chargées sur le gel est équivalente pour chaque condition. **B-C-D.** Après les 24 heures de transfection, un temps de repos de 24 heures a été laissé aux cellules avant de les incubées durant 16 heures en normoxie ou en hypoxie. Après incubation, l'ARN total a été extrait et rétrotranscrit en ADNc. Une PCR en temps réel a été réalisée avec des amorces spécifiques à HIF-1α, HIF-2α et Bnip3. RPL13A a été utilisé comme housekeeping gene pour la normalisation des résultats obtenus. Les résultats sont exprimés en fold d'induction par rapport à la condition normoxie contrôle (N).

Description de l'expérience

Les cellules MDA-MB-231 sont repiquées en T25 à 650 000 cellules par boîte 24 heures avant la transfection. La transfection s'effectue durant 24 heures en absence (condition contrôle) ou en présence des siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  (SI) ou RISC Free (RF) à une concentration de 50 nM. Après les 24 heures de transfection, le milieu de transfection est remplacé par du milieu complet et un temps de repos de 24 ou 48 heures est laissé aux cellules avant de les incuber durant 16 heures en normoxie (N) ou en hypoxie (H). Après l'incubation, une extraction protéique totale est réalisée et l'abondance protéique de HIF-1 $\alpha$  est évaluée par western blotting.

Analyse des résultats

La Figure III.8A montre que la sous-unité HIF-1 $\alpha$  n'est pas présente en normoxie (N). L'hypoxie induit une forte stabilisation de la protéine. Lorsque les cellules sont transfectées avec le siRNA Risc Free et incubées en hypoxie (H RF), la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est détectée, ce qui indique que le siRNA Risc Free n'a pas d'effets non spécifiques sur l'abondance de la protéine. Par contre, lorsque les cellules sont transfectées avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  et incubées en hypoxie (H SI), la sous-unité HIF-1 $\alpha$  n'est plus détectée, et ce après 24 et 48 heures de repos après transfection. Les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  sont donc efficaces et la concentration de 50 nM convient pour inhiber l'expression de HIF-1 $\alpha$ . Le temps de repos de 24 heures après la transfection sera conservé pour les prochaines expériences car l'extinction de HIF-1 $\alpha$  est similaire 24 et 48 heures après la transfection.

**2.2.2. Effet du siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  sur l'abondance de son ARNm et de l'ARNm de HIF-2 $\alpha$  et de Bnip3**

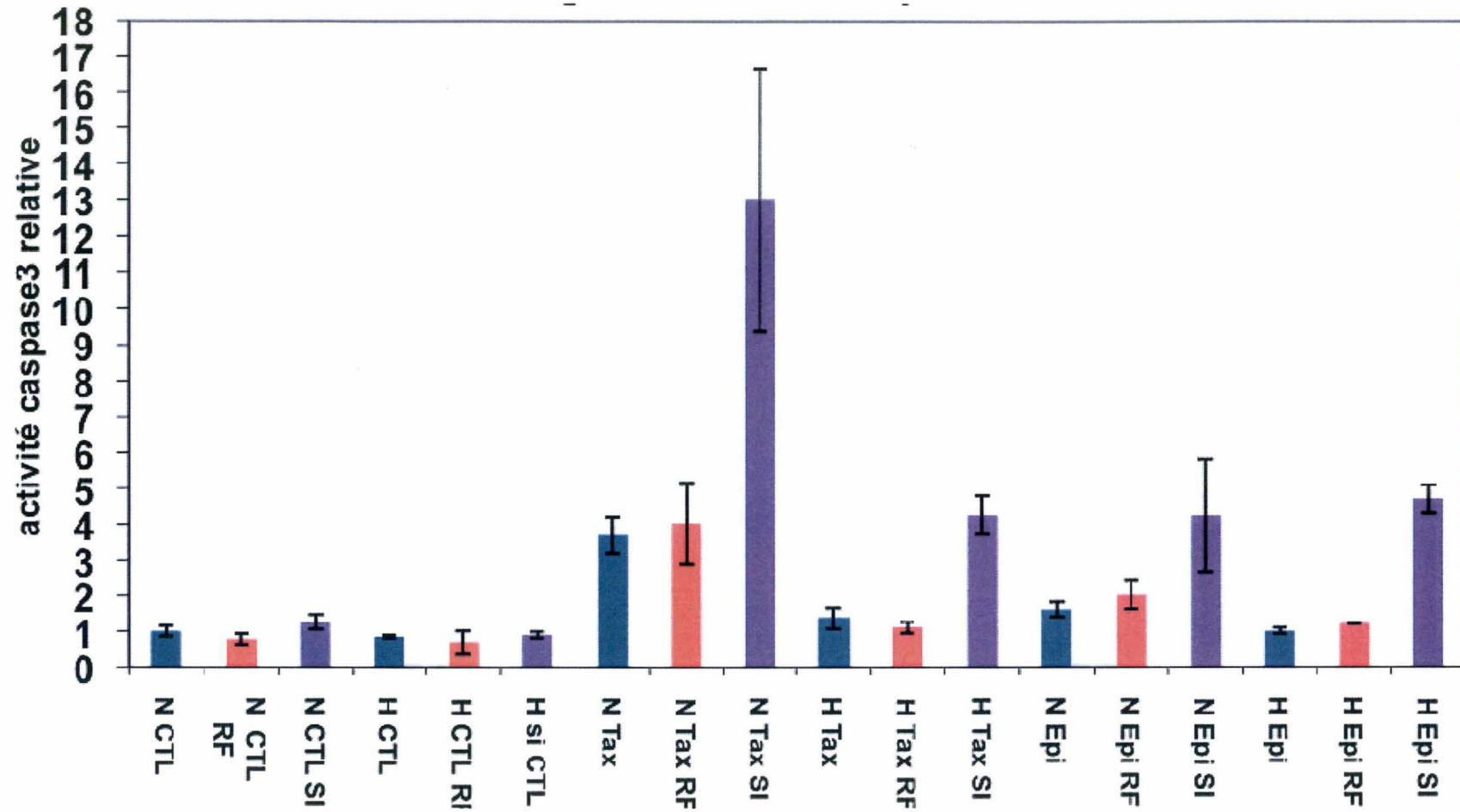
Le but de cette expérience est, premièrement, de confirmer l'efficacité des siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  en vérifiant que l'ARNm de HIF-1 $\alpha$  est dégradé, ensuite, de vérifier la spécificité des siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  en vérifiant que l'ARNm de HIF-2 $\alpha$  n'est pas dégradé et pour finir, de vérifier qu'en inhibant l'expression de HIF-1 $\alpha$ , le facteur de transcription HIF-1 n'est plus actif en étudiant l'expression de l'ARNm d'un de ses gènes cibles, Bnip3.

Description de l'expérience

Les cellules MDA-MB-231 sont repiquées en T75 à 2.10<sup>6</sup> cellules par boîte 24 heures avant la transfection. La transfection s'effectue durant 24 heures en absence ou en présence des siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  (SI) ou RISC Free (RF) à une concentration de 50 nM. Après les 24 heures de transfection, le milieu de transfection est remplacé par du milieu de culture complet et un temps de repos de 24 heures est laissé aux cellules avant de les incuber durant 16 heures en normoxie (N) ou en hypoxie (H). Après incubation, une extraction d'ARNm totale est réalisée, suivie par une transcription inverse et une PCR en temps réel afin d'étudier l'expression en ARNm des gènes d'intérêt HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  et Bnip3.

Analyse des résultats

L'hypoxie diminue par elle-même l'abondance de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$ . Les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  éteignent tout à fait cette expression (Figure III.8B) alors que le siRNA RISC Free n'a pas d'effet. Les siRNA sont spécifiques à HIF-1 $\alpha$  car ils n'ont pas d'effet sur l'expression de l'ARNm de HIF-2 $\alpha$  (Figure III.8C). Enfin, l'inhibition de l'expression de HIF-1 $\alpha$  semble avoir l'effet désiré puisque la quantité de l'ARNm de Bnip3 (Figure III.8D) diminue quand les cellules ont été transfectées avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$ , ce qui indique que l'activité de HIF-1 a bien été inhibée.



**Figure III.9 : Effet de l'inhibition de HIF-1 sur l'activité de la caspase 3.**

Les cellules ont été transfectées pendant 24 heures avec des siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  50 nM (SI) ou avec le siRNA Risc Free à 50 nM (RF). Des cellules non transfectées servent de contrôle. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 16 heures en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en présence ou non (Ctl) de taxol (Tax) à 50  $\mu$ M ou d'épirubicine (Epi) à 10  $\mu$ M. L'activité de la caspase 3 a été mesurée en détectant la fluorescence émise par le fluorochrome AFC libéré suite au clivage du substrat de la caspase 3 : l'Ac-DEVD-AFC. Les résultats sont exprimés en activité caspase 3 relative par rapport à la condition contrôle (N Ctl) en tant que moyenne  $\pm$  1 écart-type (n=3).

### **2.2.3. Conclusion**

Les résultats obtenus lors de ces mises au point nous ont permis de définir les conditions optimales pour la transfection des cellules MDA-MB-231 et nous ont permis de montrer que les siRNA étaient efficaces et spécifiques et qu'ils permettent d'inhiber l'expression de HIF-1 $\alpha$  et ainsi d'inhiber l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Grâce à ce système efficace d'inhibition nous allons pouvoir investiguer si HIF-1 est impliqué dans la protection, apportée par l'hypoxie, des cellules MDA-MB-231 contre l'apoptose induite par le taxol. La seconde étape consiste donc à inhiber l'expression de HIF-1 $\alpha$  par transfection des cellules avec les siRNA et d'étudier les répercussions de cette inhibition sur l'activité apoptotique des cellules en mesurant l'activité de la caspase 3.

## **2.3. Dosage de l'activité caspase 3**

La caspase 3 est une caspase effectrice qui, suite à son activation lors du processus apoptotique, va cliver toute une série de substrats spécifiques menant au phénotype apoptotique. Son activité peut être mesurée facilement en détectant la fluorescence émise par l'AFC libéré suite au clivage du substrat artificiel de la caspase 3 Ac-DEVD-AFC comme décrit précédemment dans la partie I. Pour savoir si HIF-1 est impliqué dans la protection apportée par l'hypoxie, nous allons comparer l'activité de la caspase 3 présente dans des cellules non transfectées et des cellules transfectées avec les siRNA incubées en normoxie ou en hypoxie en absence ou en présence de taxol ou d'épirubicine.

### **2.3.1. Description de l'expérience**

Les cellules ont été repiquées en T75 à  $2.10^6$  cellules par boîte 24 heures avant la transfection. Les cellules sont transfectées durant 24 heures en absence ou en présence de siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  (SI) ou RISC Free (RF). Après les 24 heures de transfection, le milieu de transfection est remplacé par du milieu de culture complet et un temps de repos de 9 heures est laissé aux cellules avant de les repiquer en plaque 6 puits à 300 000 cellules par puits. 24 heures après ce repiquage, les cellules sont incubées durant 16 heures en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en absence (CTL) ou en présence de taxol (Tax) à 50  $\mu$ M ou d'épirubicine (Epi) à 10  $\mu$ M. Chaque condition est réalisée en triple. Après l'incubation, les extraits sont réalisés pour mesurer l'activité de la caspase 3.

Nous avons mis au point la cinétique de cette expérience préalablement en effectuant une série d'expériences (dont les résultats ne sont pas montrés ici) car nous avons rencontré des problèmes de résistance aux agents chimiothérapeutiques induite lorsque la confluence des cellules est trop importante. C'est pourquoi il est indispensable d'effectuer un repiquage intermédiaire en plaque 6 puits.

### **2.3.2. Analyse des résultats**

Les résultats sont présentés graphiquement à la Figure III.9. Lorsque les cellules sont incubées en absence de taxol et d'épirubicine (Ctl), l'activité de la caspase 3 n'augmente pas par rapport à la condition contrôle (N Ctl) en normoxie (N) comme en hypoxie (H) pour les cellules non transfectées et transfectées (SI et RF), ce qui signifie que ni la transfection des siRNA ni l'hypoxie seule n'induisent l'apoptose dans les cellules. En effet, l'activité de la caspase 3 n'augmente pas lorsque les cellules sont transfectées avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  ou RiscFree ni lorsque les cellules sont incubées en hypoxie en absence de taxol et d'épirubicine (H Ctl) par rapport aux cellules incubées en normoxie en absence de taxol et d'épirubicine (N Ctl).

Lorsque les cellules non transfectées sont incubées en normoxie en présence de taxol (N Tax) ou d'épirubicine (N Epi), l'activité de la caspase 3 augmente, ce qui signifie que les agents induisent l'apoptose. Lorsque les cellules sont incubées en hypoxie et en présence de taxol (H

Gene Symbols	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Port
A	BIRC2	BAK1	BCL3	CASP1	CASP2	CASP5	CASP7	CASP8	CASP9	IKKB	18S	LTB	MCL1	NFKB1	NFKB2	NFKBIB	NFKBIE	PMAIP1	RELB	TNFRSF1B	TNFRSF10A	CARD4	NALP1	CASP14	1
B	BCL2L13	TNFRSF21	HTRA2	TBK1	ESRRRL1	LRDD	CARD15	CARD9	NFKBIZ	BCL2L14	BIRC7	CARD6	BIRC8	DEDD2	APAF1	BIRC3	BIRC4	BIRC5	FAS	FASLG	BAD	BAX	BCL2	BCL2A1	2
C	BCL2L1	BCL2L2	BIK	BNIP3L	BOK	CASP3	CASP6	CASP10	DAPK1	HIP1	BIRC1	NFKBIA	RELA	TNF	IKBKG	PEA15	TRADD	RIPK1	HRK	TNFSF10	FADD	TNFRSF10B	CFLAR	DEDD	3
D	BCL2L10	BCL2L11	BBC3	PYCARD	DIABLO	BIRC6	GAPDH	ACTB	CHUK	REL	TNFRSF1A	RIPK2	IKBKE	BCAP31	ICEBERG	TA-NFKBH	BID	BNIP3	CASP4	LTA	TNFRSF25	CRADD	BCL10	CASP8AP2	4
E	BIRC2	BAK1	BCL3	CASP1	CASP2	CASP5	CASP7	CASP8	CASP9	IKKB	18S	LTB	MCL1	NFKB1	NFKB2	NFKBIB	NFKBIE	PMAIP1	RELB	TNFRSF1B	TNFRSF10A	CARD4	NALP1	CASP14	5
F	BCL2L13	TNFRSF21	HTRA2	TBK1	ESRRRL1	LRDD	CARD15	CARD9	NFKBIZ	BCL2L14	BIRC7	CARD6	BIRC8	DEDD2	APAF1	BIRC3	BIRC4	BIRC5	FAS	FASLG	BAD	BAX	BCL2	BCL2A1	6
G	BCL2L1	BCL2L2	BIK	BNIP3L	BOK	CASP3	CASP6	CASP10	DAPK1	HIP1	BIRC1	NFKBIA	RELA	TNF	IKBKG	PEA15	TRADD	RIPK1	HRK	TNFSF10	FADD	TNFRSF10B	CFLAR	DEDD	7
H	BCL2L10	BCL2L11	BBC3	PYCARD	DIABLO	BIRC6	GAPDH	ACTB	CHUK	REL	TNFRSF1A	RIPK2	IKBKE	BCAP31	ICEBERG	TA-NFKBH	BID	BNIP3	CASP4	LTA	TNFRSF25	CRADD	BCL10	CASP8AP2	8
I	BIRC2	BAK1	BCL3	CASP1	CASP2	CASP5	CASP7	CASP8	CASP9	IKKB	18S	LTB	MCL1	NFKB1	NFKB2	NFKBIB	NFKBIE	PMAIP1	RELB	TNFRSF1B	TNFRSF10A	CARD4	NALP1	CASP14	9
J	BCL2L13	TNFRSF21	HTRA2	TBK1	ESRRRL1	LRDD	CARD15	CARD9	NFKBIZ	BCL2L14	BIRC7	CARD6	BIRC8	DEDD2	APAF1	BIRC3	BIRC4	BIRC5	FAS	FASLG	BAD	BAX	BCL2	BCL2A1	10
K	BCL2L1	BCL2L2	BIK	BNIP3L	BOK	CASP3	CASP6	CASP10	DAPK1	HIP1	BIRC1	NFKBIA	RELA	TNF	IKBKG	PEA15	TRADD	RIPK1	HRK	TNFSF10	FADD	TNFRSF10B	CFLAR	DEDD	11
L	BCL2L10	BCL2L11	BBC3	PYCARD	DIABLO	BIRC6	GAPDH	ACTB	CHUK	REL	TNFRSF1A	RIPK2	IKBKE	BCAP31	ICEBERG	TA-NFKBH	BID	BNIP3	CASP4	LTA	TNFRSF25	CRADD	BCL10	CASP8AP2	12
M	BIRC2	BAK1	BCL3	CASP1	CASP2	CASP5	CASP7	CASP8	CASP9	IKKB	18S	LTB	MCL1	NFKB1	NFKB2	NFKBIB	NFKBIE	PMAIP1	RELB	TNFRSF1B	TNFRSF10A	CARD4	NALP1	CASP14	13
N	BCL2L13	TNFRSF21	HTRA2	TBK1	ESRRRL1	LRDD	CARD15	CARD9	NFKBIZ	BCL2L14	BIRC7	CARD6	BIRC8	DEDD2	APAF1	BIRC3	BIRC4	BIRC5	FAS	FASLG	BAD	BAX	BCL2	BCL2A1	14
O	BCL2L1	BCL2L2	BIK	BNIP3L	BOK	CASP3	CASP6	CASP10	DAPK1	HIP1	BIRC1	NFKBIA	RELA	TNF	IKBKG	PEA15	TRADD	RIPK1	HRK	TNFSF10	FADD	TNFRSF10B	CFLAR	DEDD	15
P	BCL2L10	BCL2L11	BBC3	PYCARD	DIABLO	BIRC6	GAPDH	ACTB	CHUK	REL	TNFRSF1A	RIPK2	IKBKE	BCAP31	ICEBERG	TA-NFKBH	BID	BNIP3	CASP4	LTA	TNFRSF25	CRADD	BCL10	CASP8AP2	16

**Figure III.10 : Schéma de la carte microfluidique « Human Apoptosis Array» utilisée lors de l'étude de l'expression génique.**

Cette carte permet d'étudier des variations d'expression de 96 gènes (La sélection en bleu correspond à une série de 96 gènes) pour 4 échantillons chargés dans les ports de la carte microfluidique (représentés sur la droite du schéma).

Tax), on observe une diminution de l'activité caspase 3 qui correspond à la protection qu'apporte l'hypoxie aux cellules MDA-MB-231 face à l'apoptose induite par le taxol. Le niveau d'activité caspase 3 mesuré dans cette condition (H Tax) est alors similaire à celui observé dans la condition normoxie contrôle (N Ctl). Par contre, lorsque les cellules sont transfectées avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  et sont incubées en hypoxie et en présence de taxol (H Tax SI), l'activité de la caspase 3 augmente pour devenir supérieure à l'activité caspase 3 observée en normoxie contrôle (N Ctl). De plus, l'activité de la caspase 3 dans cette condition (H Tax SI) est similaire à l'activité de la caspase 3 observée dans la condition normoxie taxol (N Tax). Ce résultat indique que HIF-1 est impliqué dans la protection apportée par l'hypoxie puisqu'en l'inhibant, les cellules ne sont plus protégées et l'activité caspase 3 augmente.

Cependant, nous retrouvons une diminution de l'activité caspase 3 pour la condition H Tax SI par rapport à la condition N Tax SI, ce qui pourrait signifier que HIF-1 n'est pas le seul acteur dans la protection apportée par l'hypoxie.

Nous obtenons des résultats similaires pour les cellules incubées en présence d'épirubicine car l'activité caspase 3 augmente également lorsque les cellules sont incubées en hypoxie, en présence d'épirubicine et sont transfectées avec les siRNA anti HIF-1 $\alpha$  (H Epi SI). Cependant, nous avons montré que l'activité transcriptionnelle de HIF-1 est inhibée en présence d'épirubicine. De plus, une augmentation de l'activité caspase 3 est également observée lorsque les cellules transfectées avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  sont incubées en normoxie en présence de taxol ou d'épirubicine (N Tax SI et N Epi si). En effet, l'activité de la caspase 3 augmente par rapport à l'activité de la caspase 3 détectée dans les cellules incubées dans les mêmes conditions mais non transfectées (N Tax et N Epi). Il semble donc qu'à côté du rôle de HIF-1 dans la protection apportée par l'hypoxie, HIF-1 puisse intervenir dans la survie cellulaire en normoxie même avec une activité transcriptionnelle faible.

Enfin, les résultats obtenus sont spécifiques à l'inhibition de HIF-1 par les siRNA car les cellules transfectées avec le siRNA Risc Free (RF) ne présentent aucune augmentation de l'activité caspase 3 par rapport à leur condition contrôle respective. L'augmentation de l'activité caspase 3 n'est donc pas due à une éventuelle toxicité des siRNA.

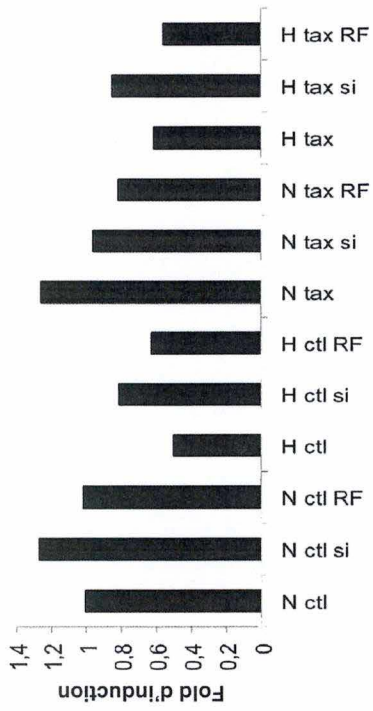
## **Partie IV : Etude de l'effet de l'inhibition de HIF-1 sur l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose**

Les résultats obtenus au cours de l'expérience précédente indiquent clairement que HIF-1 joue un rôle dans la protection des cellules MDA-MB-231 contre l'apoptose induite par le taxol. Pour tenter de comprendre par quels mécanismes HIF-1 est impliqué dans cette protection, nous avons étudié les effets de l'inhibition de HIF-1 sur l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose à l'aide de réactions de PCR en temps réel en cartes microfluidiques. Cette approche nous permet d'analyser quels sont les gènes dont l'expression est régulée par le facteur de transcription HIF-1.

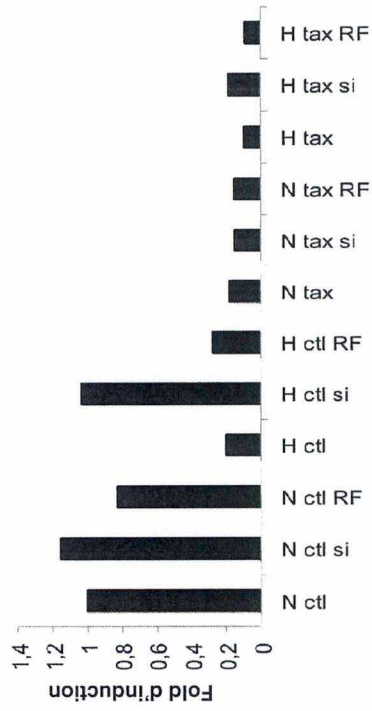
### **1. Les cartes microfluidiques**

Cette méthode permet d'analyser des variations d'expression génique à l'aide de cartes à 384 puits. Ces cartes permettent d'analyser 1 à 8 échantillons et permettent de mesurer l'expression de 12 à 380 gènes. Le modèle utilisé (Figure III.10) lors de cette expérience est la « TaqMan Human Apoptosis Array » de Applied Biosystem, qui permet d'analyser 4 échantillons et permet de mesurer simultanément l'expression de 96 gènes (Annexe 1). Parmi ces 96 gènes, trois gènes servent de contrôles endogènes, 18S, ACTB, GAPDH. Nous avons

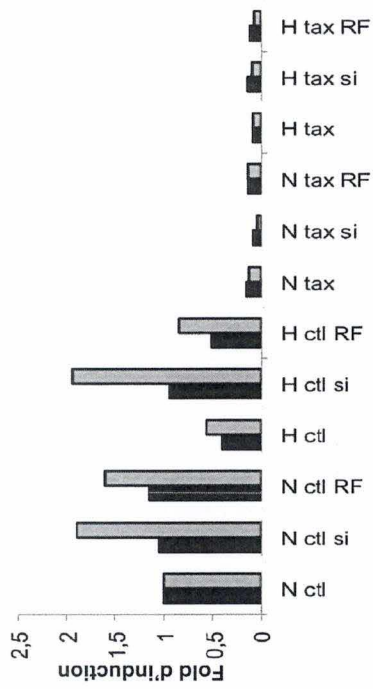
TNF RSF 10A



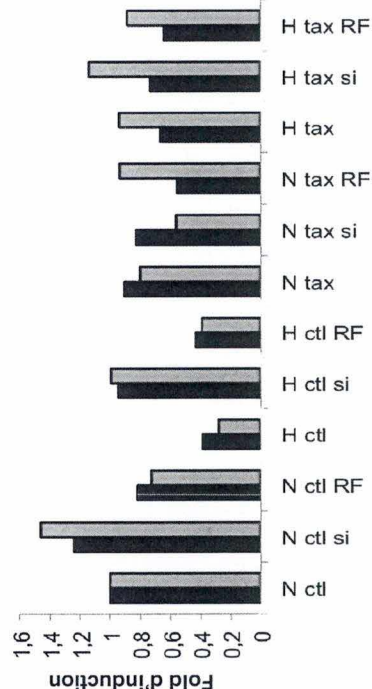
TNF RSF 21



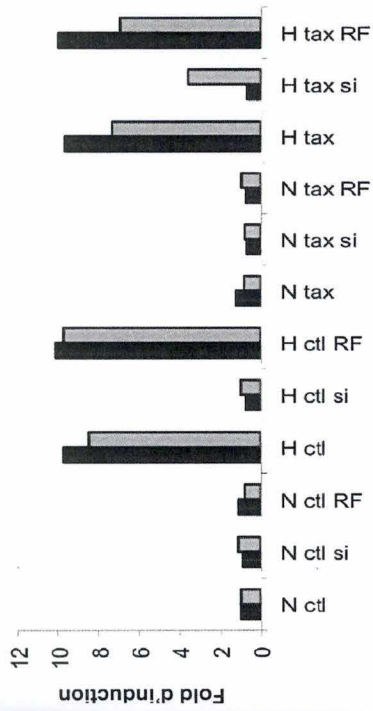
TNF RSF 1B



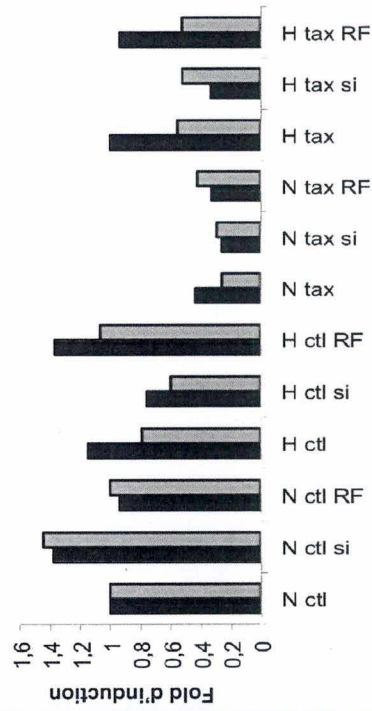
CASP3

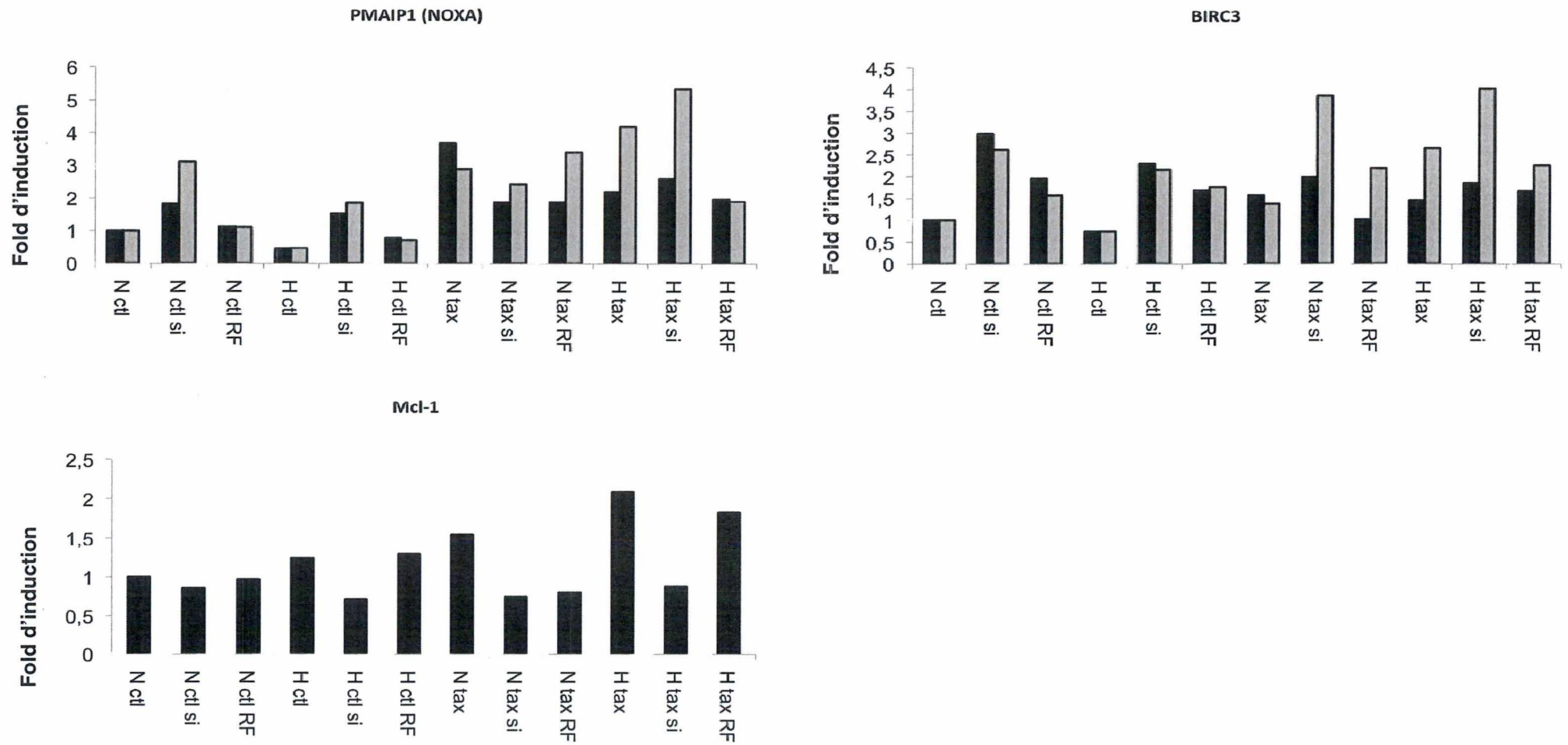


Bnip3



TNF SF 10





**Figure III.11 : Effets de l'inhibition de HIF-1 sur les variations d'expression de gènes induites par l'hypoxie ou par les agents chimiothérapeutiques.**

Les cellules ont été transfectées pendant 24 heures avec des siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  50 nM (SI) et Risc Free 50 nM (RF). Des cellules non transfectées servent de contrôle. Les cellules ont ensuite été incubées en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en absence (Ctl) ou en présence de taxol (Tax), 50  $\mu$ M. Après l'incubation, l'ARNm est extrait et rétrotranscrit en ADNc. Ensuite, la PCR en temps réel est réalisée avec les cartes microfluidiques (série noire) ou par PCR en temps réel classique (série grise) sur des extraits obtenus dans deux expériences indépendantes.

choisi d'utiliser 18S comme contrôle endogène (housekeeping gene) car l'expression des deux autres gènes, ACTB et GADPH, est modifiée par l'hypoxie.

### **1.1. Description de l'expérience**

Les cellules ont été repiquées en T25 à 650 000 cellules par boîte, 24 heures avant d'être transfectées. Les cellules ont été transfectées durant 24 heures en absence ou en présence de siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  (SI) ou RISC Free (RF). Après les 24 heures de transfection, le milieu de transfection est remplacé par du milieu complet et un temps de repos de 9 heures est laissé aux cellules avant de les incuber durant 16 heures en normoxie (N) ou en hypoxie (H) en absence (Ctl) ou en présence de taxol (Tax) à 50  $\mu$ M. Après incubation, une extraction d'ARN est réalisée puis les ARNm sont rétrotranscrits en ADNc à l'aide de « Random Primers ». Les ADNc dilués sont mélangés avec le TaqMan Universal PCR Master Mix et sont injectés dans les pores de la carte. Après la réaction de PCR en temps réel, les résultats sont analysés comme pour une PCR en temps réel classique.

### **1.2. Analyse des résultats**

Sur les 96 gènes dont l'expression génique est mesurée dans les 12 conditions (Annexe 2), nous en avons sélectionné 9 qui semblent intéressants. En effet, leur expression est augmentée ou diminuée lorsque les cellules sont transfectées avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  et non avec le siRNA Risc Free. En effet, lorsqu'on observe une modification d'expression d'un gène due à la présence du siRNA anti HIF-1 $\alpha$ , cela signifie que l'expression du gène en question est probablement régulée par HIF-1. Nous avons donc sélectionné les gènes suivants: Bnip3, TNF SF 10, TNF RSF 21, TNF RSF 1B, TNF RSF 10A, CASP3, PMAIP1 (NOXA), BIRC3 et Mcl-1, et. Les résultats sont représentés à la Figure III.11 (colonnes noires).

#### **1.2.1. Gènes dont l'expression est régulée par HIF-1**

Puisque Bnip3 est connu pour être un gène dont l'expression est induite en hypoxie par HIF-1, nous l'avons utilisé comme contrôle positif des effets des siRNA anti-HIF-1 $\alpha$ . Nous observons que l'expression de Bnip3 est faible pour toutes les conditions en normoxie (N) et qu'elle augmente lorsque les cellules sont incubées en hypoxie en absence (H Ctl) ou en présence de taxol (H Tax). Lorsque les cellules incubées en hypoxie en absence (H Ctl) ou en présence de taxol (H Tax) sont transfectées avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$ , qui inhibent la formation et donc l'activation du facteur de transcription HIF-1, l'expression de Bnip3 diminue pour atteindre le même niveau d'expression que pour les conditions en normoxie. Les effets observés sont bien la conséquence d'une inhibition de HIF-1 $\alpha$  puisque les cellules transfectées avec le siRNA Risc Free ne présentent pas de modification d'expression génique par rapport aux cellules incubées dans les mêmes conditions mais non transfectées. Ces résultats indiquent que la transfection, l'inhibition de la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  et donc de l'activité de HIF-1 par les siRNA ont bien fonctionné.

D'autres gènes dont l'expression semble régulée par HIF-1 ont ensuite été sélectionnés. CASP3, qui est le gène codant pour la caspase 3, semble être régulé par HIF-1 car son expression augmente lorsque les cellules incubées en hypoxie en absence (Ctl) ou en présence de taxol (Tax) sont transfectées avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  (SI). Si son expression augmente en présence des siRNA, cela signifie que HIF-1 pourrait réprimer l'expression du gène CASP3 en hypoxie.

Il semble que l'expression de certains membres de la superfamille des récepteurs au TNF soit également régulée par HIF-1. Parmi ces membres, on trouve TNF RSF 1B, TNF RSF 10A et TNF RSF 21. Ces récepteurs au TNF peuvent jouer un rôle pro-apoptotique en induisant l'apoptose suite à la liaison de leur ligand qui permet le recrutement de protéines adaptatrices

et des caspases initiatrices 8 et 10. Cependant, ces récepteurs n'induisent pas forcément l'apoptose car une voie parallèle à la voie des caspases est activée suite à l'activation de ces récepteurs. Cette voie est la voie de NFκB, impliquée dans la réponse inflammatoire, mais possédant également un rôle anti-apoptotique. L'expression de ces récepteurs varie de manière similaire. En effet, pour chacun des trois gènes, on observe une augmentation de leur expression pour les cellules transfectées avec les siRNA anti-HIF-1α et incubées en hypoxie (H CTL SI) par rapport aux cellules incubées dans les mêmes conditions mais non transfectées (H CTL). Cette augmentation est également observée lorsque les cellules sont incubées en présence de taxol (H Tax SI par rapport à H Tax), sauf pour le récepteur TNF RSF 1B dont l'expression est déjà fortement inhibée par le taxol. Il semble également que le taxol réprime l'expression du récepteur TNF RSF 21. Concernant le récepteur TNF RSF 10A, son expression est diminuée pour la condition N Tax SI, lorsque les cellules sont transfectées avec les siRNA anti-HIF-1α et sont incubées en normoxie en présence de taxol par rapport à la condition N Tax, lorsque les cellules ne sont pas transfectées. Ces résultats indiquent que dans cette condition (N Tax), où l'apoptose est induite, HIF-1 augmente l'expression du récepteur alors que dans les trois autres conditions (N CTL, H CTL, H Tax), où l'apoptose n'est pas induite, HIF-1 diminue l'expression du récepteur. En effet, pour ces trois conditions, on observe une augmentation de l'expression du récepteur lorsque l'expression de HIF-1α est inhibée en présence des siRNA anti-HIF-1α. L'expression du ligand du récepteur TNF RSF 10A appelé TNF SF 10 semble également régulée par HIF-1 car les cellules transfectées avec les siRNA anti-HIF-1α, incubées en hypoxie en absence ou en présence de taxol (H CTL SI et H Tax SI) présentent une diminution de l'expression du ligand TNF SF 10 due aux siRNA. Par conséquent, HIF-1 pourrait induire l'expression de ce ligand en hypoxie.

L'expression du gène PMAIP1 (NOXA), codant pour une protéine pro-apoptotique, semble également être régulée par HIF-1 car son expression est modifiée lorsque les cellules sont transfectées avec les siRNA anti-HIF-1α. Les résultats indiquent que dans les trois conditions N CTL, H CTL et H Tax, le facteur de transcription HIF-1 induit une diminution de l'expression de NOXA (lorsqu'il n'y a pas d'apoptose) puisqu'une augmentation de l'expression de NOXA est observée lorsque les cellules sont transfectées avec les siRNA dans ces trois conditions.

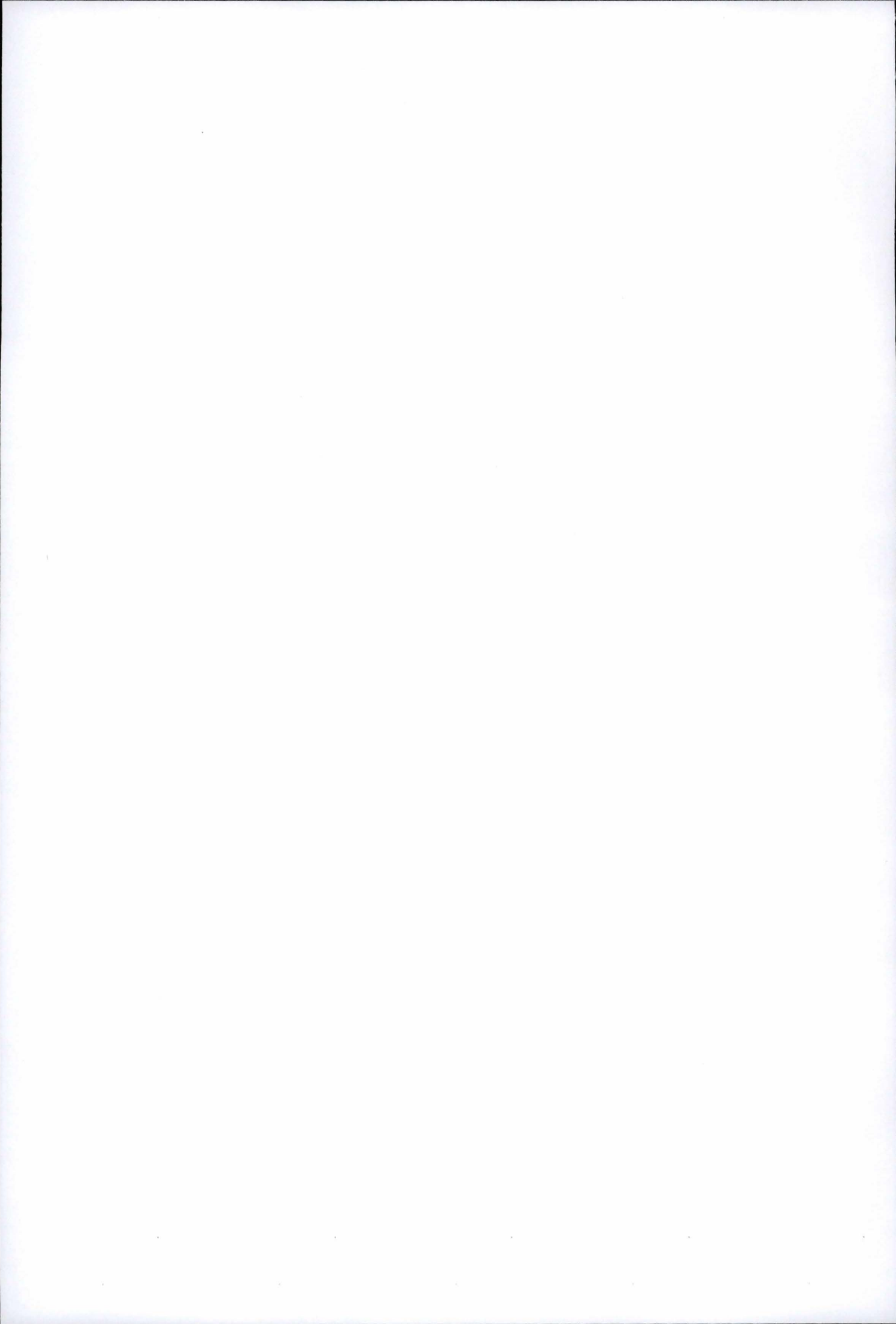
Mcl-1, un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2, est un autre gène dont l'expression semble être induite par HIF-1 car lorsque les cellules sont transfectées avec les siRNA anti-HIF-1α (N CTL SI, H CTL SI, N Tax SI, H Tax SI), on observe une diminution de l'expression de Mcl-1 par rapport aux conditions où les cellules ne sont pas transfectées (N CTL, H CTL, N Tax, H Tax). Piret et al ont déjà montré, au laboratoire, un rôle de HIF-1 dans la régulation de l'expression de HIF-1 (Piret *et al*, 2005).

BIRC3 (Baculoviral IAP Repeat-containing 3) est une protéine anti-apoptotique de la famille des IAP (Inhibitor of Apoptosis) dont l'expression semble être réprimée par HIF-1 car les cellules transfectées avec les siRNA anti-HIF-1α présentent une augmentation de l'expression de BIRC3 par rapport aux cellules qui ne sont pas transfectées.

## **2. Confirmation des résultats par PCR en temps réel.**

Dans le but de confirmer les résultats obtenus avec les cartes microfluidiques « Human Apoptosis Array », nous avons réalisé des PCR en temps réel pour quelques gènes à partir de nouveaux extraits d'ARN. L'expression des gènes étudiés par PCR en temps réel sont Bnip3, TNF RSF 1B, TNF SF 10, CASP3, PMAIP1 et BIRC3. Les résultats sont représentés à la Figure III.11 (colonnes grises).

Dans la plupart des cas, les variations de l'expression génique observées avec les cartes microfluidiques sont similaires aux variations de l'expression génique observées par PCR en temps réel classique avec une série d'extraits différents. Les résultats sont donc reproductibles

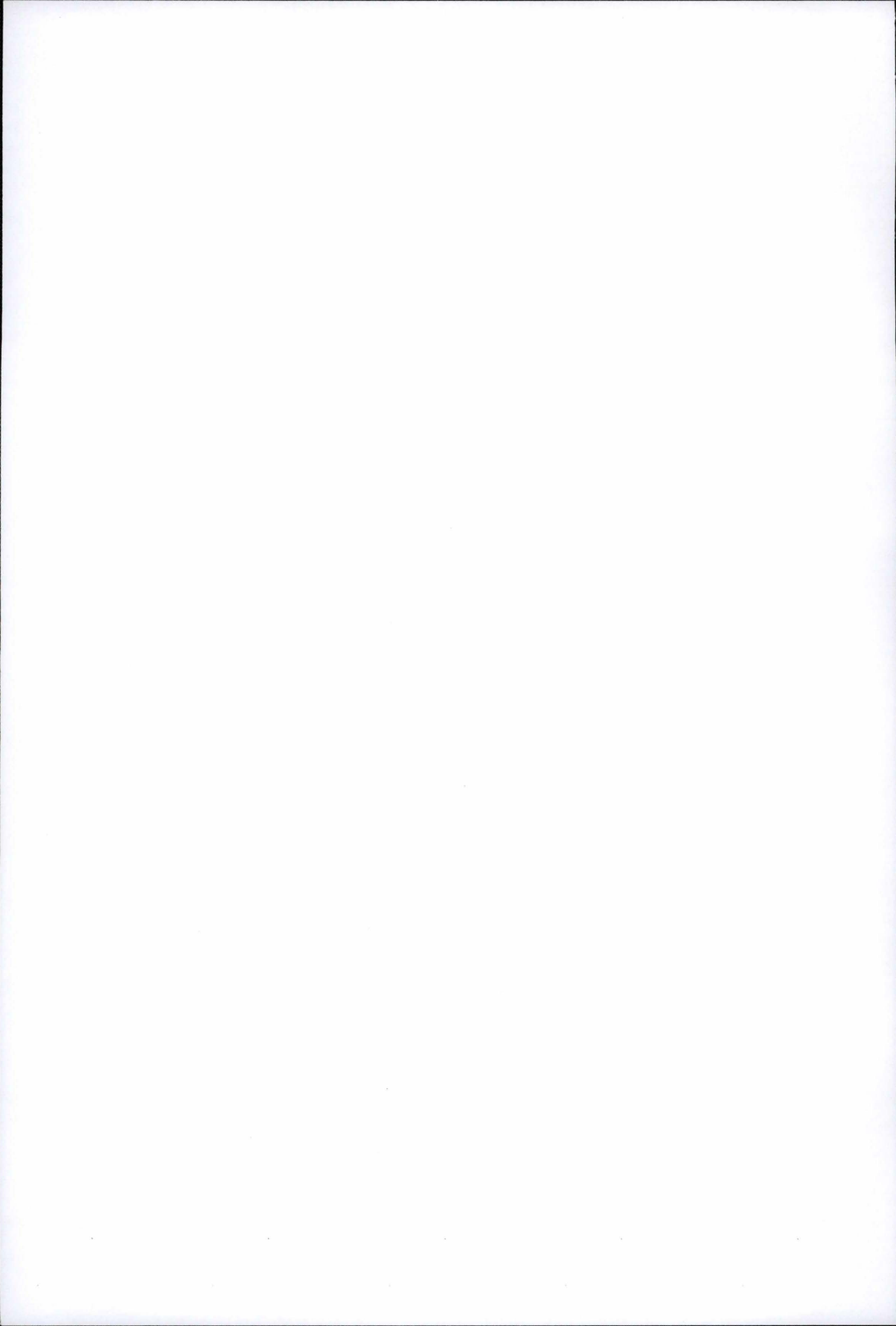


## RESULTATS

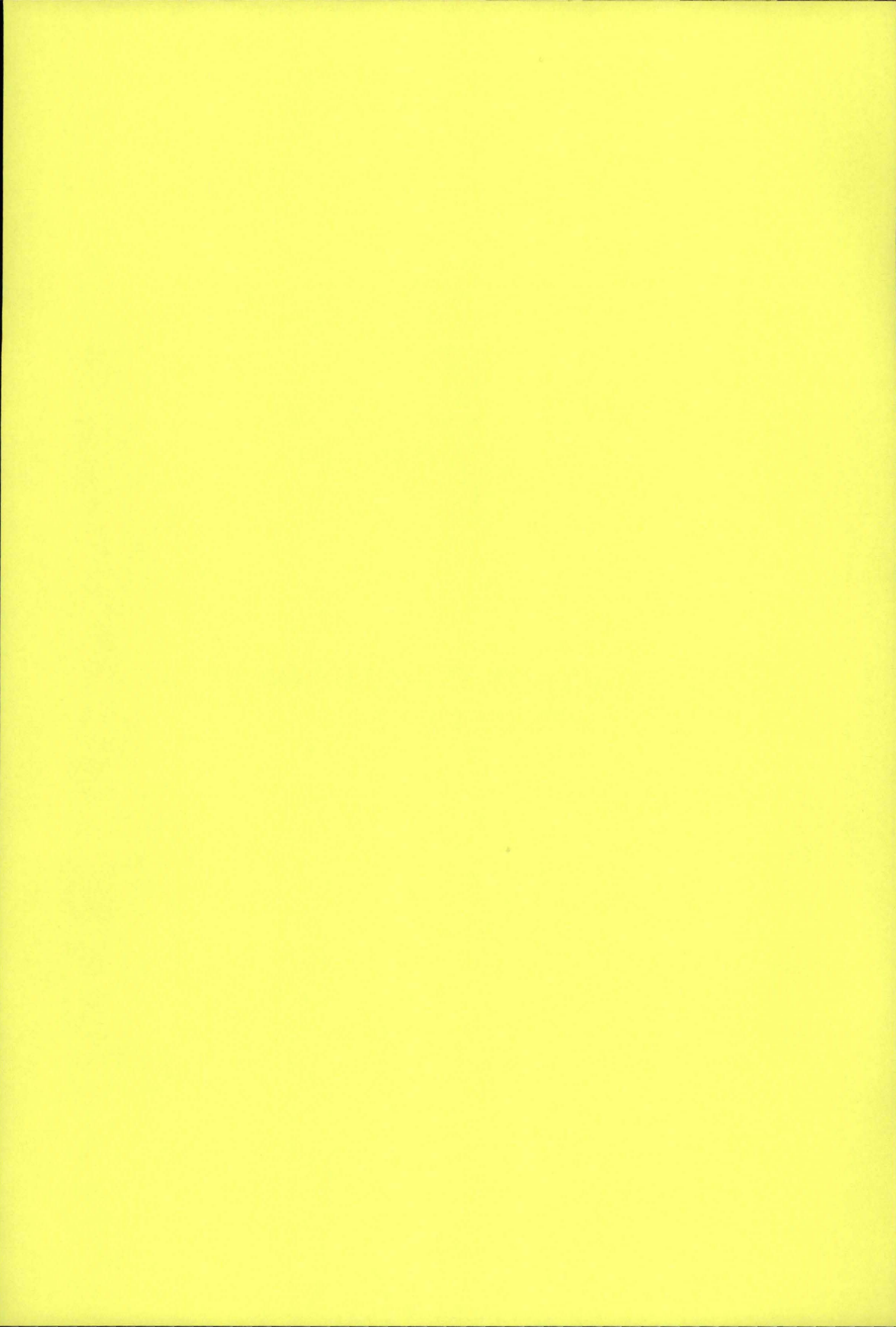
---

et permettent non seulement de valider les résultats obtenus avec les cartes microfluidiques mais aussi de renforcer l'hypothèse selon laquelle l'expression des gènes sélectionnés est bien régulée par HIF-1. Cependant, afin de valider définitivement les résultats obtenus dans la première expérience, d'autres mesures de l'expression de ces gènes par PCR en temps réel devront être réalisés avec de nouveaux extraits.

Les résultats obtenus par PCR en temps sont parfois différents des résultats obtenus avec les cartes. Ces différences peuvent être dues à l'introduction de plusieurs variables entre les deux expériences. Tout d'abord, les extraits d'ARNm utilisés pour réaliser les PCR en temps réel classique sont différents de ceux utilisés pour les cartes microfluidiques. Il peut donc y avoir une variabilité d'expérience à expérience. Ensuite, la PCR en temps réel qui se déroule au sein des cartes microfluidiques s'effectue en présence d'amorces qui peuvent s'hybrider n'importe où sur l'ADNc alors qu'une PCR en temps réel classique s'effectue en présence d'amorces qui s'hybrident à l'extrémité 3' de l'ADNc. Par conséquent, des variants d'épissages alternatif produits à partir d'un même gène peuvent être détectés en quantité différente en fonction de l'épissage et de l'endroit où les amorces viennent s'hybrider sur ce gène. Ces hypothèses seront vérifiées dans la suite du travail.



**IV. DISCUSSION, CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES**



La résistance des cellules cancéreuses face à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques est un problème majeur, souvent rencontré chez les patients suivant une thérapie anti-cancéreuse. Ce phénomène de résistance est souvent corrélé avec la présence, au sein des tumeurs, de cellules hypoxiques. Aujourd'hui, il est clairement démontré que l'hypoxie fait partie des facteurs responsables de la résistance des cellules cancéreuses face à l'apoptose induite par certains agents chimiothérapeutiques. En effet, l'hypoxie induit une modification d'expression génique dans les cellules qui leur permet non seulement de s'adapter à l'hypoxie mais également d'échapper à l'apoptose. Le principal facteur de transcription activé en hypoxie qui régule la modification d'expression génique et qui permet aux cellules d'échapper à l'apoptose est le facteur de transcription HIF-1. Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié les effets de l'hypoxie sur l'apoptose induite par le taxol ou l'épirubicine dans des cellules du cancer du sein appelées MDA-MB-231. Le taxol ou l'épirubicine sont les deux agents les plus utilisés et restent, à l'heure actuelle, les plus prometteurs pour traiter les cancers du sein métastatiques.

### **1. Partie I : Effets de l'hypoxie sur l'apoptose induite par le taxol et l'épirubicine**

Dans un premier temps, nous avons étudié les effets du taxol, de l'épirubicine et de l'hypoxie sur l'apoptose induite dans les cellules MDA-MB-231 en dosant l'activité de la caspase 3. L'hypoxie seule n'induit pas l'apoptose mais le taxol et l'épirubicine induisent l'apoptose dans les cellules MDA-MB-231. Cependant, l'hypoxie protège les cellules de l'apoptose induite par le taxol alors qu'elle n'a aucun effet sur l'apoptose induite par l'épirubicine. Nous avons donc un modèle *in vitro* permettant d'étudier les mécanismes moléculaires de la résistance. Afin de confirmer les résultats obtenus par le dosage de l'activité caspase 3, la quantité de la forme clivée de PARP-1 (poly ADP-ribose polymérase-1), une polymérase impliquée dans la réparation de l'ADN, clivée par les caspases effectrices) ou la fragmentation de l'ADN aurait pu être étudiée. Il aurait également été intéressant d'étudier les mécanismes par lesquels l'apoptose est induite par l'épirubicine, un agent qui induit des dommages à l'ADN, dans les cellules de la lignée MDA-MB-231 qui possèdent un facteur p53 muté dans son domaine de liaison à l'ADN. L'apoptose induite par l'épirubicine dans les cellules MDA-MB-231 peut être induite par d'autres membres de la famille p53 tels que p63 ou p73 ou via l'activation de voies de signalisation indépendantes de p53 pouvant impliquer l'activation ou l'inhibition de kinases ou la formation du PIDosome. Un autre phénomène pouvant être étudié est la catastrophe mitotique. Ce phénomène est souvent observé dans les cellules mutées pour p53 qui échappent à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose induite par des agents qui ciblent l'ADN. Après avoir réalisé quelques mitoses, ces cellules meurent par catastrophe mitotique car les dommages à l'ADN induits par les agents sont trop importants pour permettre aux cellules de survivre.

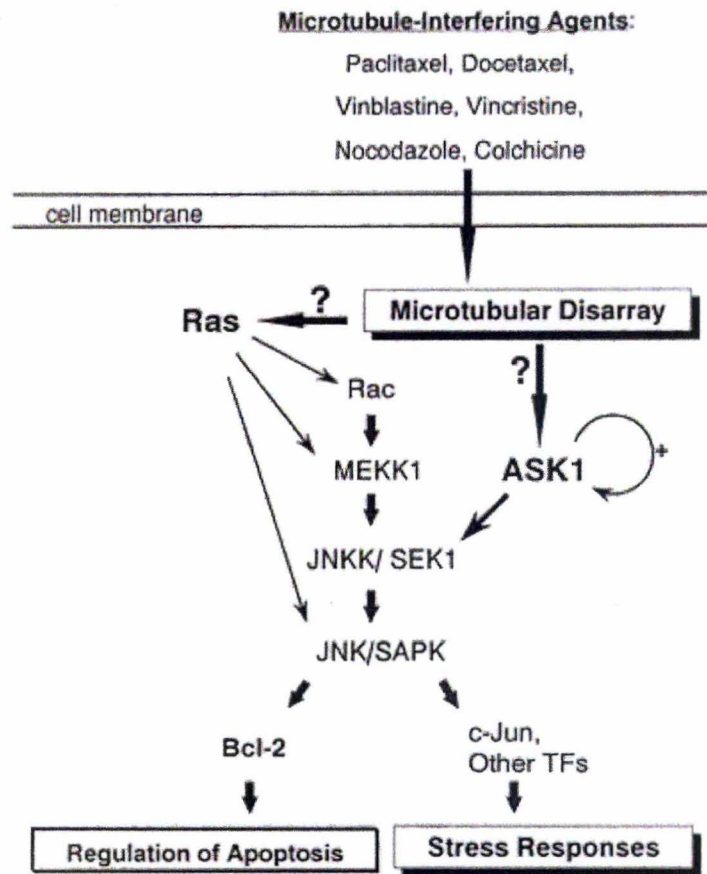
### **2. Partie II : Effets de l'hypoxie et des agents chimiothérapeutiques sur l'expression de certains membres de la famille Bcl-2**

Afin de comprendre par quel mécanisme l'hypoxie induit une protection et de déterminer l'implication potentielle des membres de la famille Bcl-2 dans cette protection, nous avons étudié les variations de localisation subcellulaire, par marquage en immunofluorescence, d'expression des protéines, par western blotting, et des ARNm correspondants, par PCR en temps réel, de certains membres de cette famille. En effet, la localisation subcellulaire des membres de la famille Bcl-2 et la balance entre la quantité de protéines pro- et anti-apoptotiques influencent la prise de décision pour le déclenchement ou non de l'apoptose en conditions de stress cellulaires ou de dommages cellulaires.

Bax est un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2. L'hypoxie, le taxol et l'épirubicine induisent une diminution de l'expression en ARNm de Bax. De plus, l'expression protéique de Bax ne varie pas de manière importante et aucune translocation depuis le cytosol vers la membrane mitochondriale n'a été observée dans les différentes conditions. Par conséquent la diminution d'expression en ARNm de Bax, induite par les agents, nous pousse à penser que Bax n'est pas impliqué dans l'apoptose induite par les agents et par conséquent, la diminution de l'ARNm de Bax induite par l'hypoxie n'est sans doute pas responsable de la protection apportée par l'hypoxie. Bax ne serait donc ni responsable de l'apoptose induite par le taxol ou l'épirubicine ni de la protection induite par l'hypoxie. Ces résultats sont cohérents avec le statut « p53 muté » des cellules MDA-MB-231. En effet, suite à stimulus pro-apoptotique, Bax va subir un changement de conformation qui induit sa translocation dans la membrane mitochondriale où il dimérise pour former un pore ou bien son expression est induite par le facteur de transcription p53, stabilisé et activé suite à un stimulus apoptotique tels que des dommages à l'ADN. Les cellules MDA-MB-231 possèdent un p53 muté dans son domaine de liaison à l'ADN et ce facteur de transcription n'est donc pas actif au niveau transcriptionnel et ne peut induire l'expression de Bax. Ces explications correspondent avec l'hypothèse selon laquelle Bax n'est pas impliqué dans l'apoptose induite par le taxol ou l'épirubicine dans les cellules MDA-MB-231. Cependant, pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier si Bax se retrouve sous forme d'homo ou d'hétérodimère dans la membrane mitochondriale ou associé au VDAC, ce qui induirait la perméabilisation mitochondriale et l'apoptose, sans pour autant nécessiter une augmentation de son expression protéique.

Bak est un autre membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 présent uniquement dans la membrane mitochondriale. Il semblerait que Bak ne soit pas impliqué dans l'apoptose induite par l'épirubicine car l'épirubicine inhibe presque totalement l'expression de l'ARNm et de la protéine de Bak. Cette hypothèse semble plausible car comme Bax, Bak est une protéine dont l'expression est induite par p53. Par contre, Bak pourrait jouer un rôle dans la protection apportée par l'hypoxie puisque l'expression en ARNm de Bak, qui est une protéine pro-apoptotique, diminue de moitié en hypoxie, en absence et en présence de taxol lorsque l'activité apoptotique est faible. Une diminution de l'expression en ARNm de Bak est également induite par le taxol seul. Ces résultats correspondent aux résultats obtenus précédemment par Sermeus et al qui ont démontré, à l'aide du DNA micro damier à ADN (DualChip human apoptosis, Eppendorf), que l'expression en ARNm de Bak est diminuée en hypoxie, dans les cellules HepG2 et que cette diminution pouvait être dépendante de HIF-1 (Sermeus *et al*, 2008). En ce qui concerne l'étude de son expression protéique, aucune diminution, induite par l'hypoxie ou le taxol, n'est observée mais il serait intéressant d'utiliser un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme active de Bak. En effet, en conditions normales, Bak est sous forme inactive dans la membrane mitochondriale et subit un changement de conformation vers une forme active suite au déclenchement de l'apoptose. L'utilisation d'un anticorps reconnaissant la forme active de Bak nous permettrait de discerner la forme active de la forme inactive et d'étudier s'il y a des variations d'activité de la protéine Bak dans les différentes conditions testées. L'activation de Bak est corrélée avec la formation de pores via son homo- ou hétéro-dimérisation, sans nécessiter une augmentation de son expression protéique.

Concernant Mcl-1, un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2, l'hypoxie et le taxol induisent une augmentation de son expression alors que l'épirubicine l'inhibe totalement. Mcl-1 pourrait donc favoriser la survie des cellules et être impliqué dans la protection apportée par l'hypoxie puisque son expression augmente en hypoxie. De plus, Piret et al ont démontré que l'expression de Mcl-1 est augmentée en hypoxie de manière dépendante de HIF-1 et que cette surexpression protège les cellules hypoxiques de l'apoptose induite par le tert-butyl hydroperoxyde, un agent oxydant (Piret *et al*, 2005). Les résultats obtenus avec les



**Figure IV.1:** Voies de signalisation activées par des agents qui interfèrent avec les microtubules. Les stress intracellulaires causés par les agents interférant avec les microtubules activent les cascades de signalisation de Ras et ASK1, résultant en l'activation de JNK/SAPK qui active le facteur de transcription AP-1 ou qui régule l'apoptose en phosphorylant Bcl-2 (Wang *et al*, 1998).

cartes microfluidiques confirment ces résultats : ils montrent également que l'augmentation de Mcl-1 est inhibée lorsque HIF-1 est inhibé par les siRNA. On pourrait imaginer que Mcl-1 protège les cellules MDA-MB-231 de l'apoptose induite par le taxol, en hypoxie. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'utiliser un siRNA anti-Mcl-1 et d'observer les effets de cette inhibition sur l'apoptose induite par le taxol.

Bim est un membre pro-apoptotique qui est fixé aux microtubules en conditions normales et qui se relocalise dans la membrane mitochondriale externe suite à un stimulus pro-apoptotique touchant les microtubules. Etant donné que la protection induite par l'hypoxie est présente quand les cellules sont incubées en présence de taxol et que Bim est capable d'inhiber l'action de Mcl-1 lorsque ces deux protéines sont localisées dans la membrane mitochondriale, nous avons étudié les effets des agents sur la morphologie des microtubules et sur une éventuelle relocalisation de Bim dans la membrane mitochondriale externe. Nous avons d'abord observé que le taxol, seul, a un effet sur la morphologie des microtubules car il induit un raccourcissement et un épaississement des microtubules et ce en normoxie et en hypoxie. Le taxol inhibe donc bien la dépolymérisation des microtubules en normoxie comme en hypoxie et la protection induite par l'hypoxie ne trouve pas son origine dans un défaut de liaison du taxol aux microtubules. De plus, en présence de taxol, Bim est redistribué aux extrémités des cellules et sa distribution apparaît plus ponctuelle. Des dommages induits aux microtubules induisent donc bien une relocalisation de la protéine Bim. Afin de savoir si Bim est relocalisé dans la membrane mitochondriale externe, nous avons d'abord étudié si la morphologie du réseau mitochondrial était influencée par l'hypoxie ou les agents et ensuite si Bim colocalise avec les mitochondries. Nous avons observé que, même si le taxol induit une fragmentation du réseau mitochondrial et que l'hypoxie induit sa relocalisation aux extrémités des cellules, Bim n'est pas relocalisé dans la membrane mitochondriale. Ces résultats indiquent que l'apoptose induite par le taxol s'effectue via la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe indépendamment de Bim qui est capable, lors du processus apoptotique, d'induire la formation de pore en inhibant Bcl-2. De plus, Bim n'étant pas localisé dans la membrane mitochondriale externe, il ne peut inhiber l'action anti-apoptotique de Mcl-1 en interagissant avec, ce qui signifie que Mcl-1 représente toujours un acteur potentiel dans la protection apportée par l'hypoxie. Afin de confirmer les résultats qui montrent que Bim n'est pas relocalisé dans la membrane mitochondriale externe, il serait intéressant de recommencer cette expérience avec différentes cinétiques d'incubation des cellules en présence de taxol afin d'étudier si la relocalisation de Bim dans la membrane mitochondriale ne s'effectue pas plus tôt ou plus tard.

D'autres mécanismes pouvant être responsables de l'apoptose induite par le taxol ont été décrits dans la littérature et pourraient être investigués. Par exemple, la polymérisation des microtubules stabilisée par des agents interférant semble activer différentes kinases telles que JNK (c-jun N-terminal kinase), CDK1 (cyclin dependent kinase 1) ou le facteur de transcription NFκB. L'activation de JNK se fait suite à l'activation de Ras et/ou ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase). L'activation de JNK résulte en l'activation de facteurs de transcription, comme AP-1, qui régulent la réponse cellulaire face à divers stress ou à la régulation de l'apoptose en phosphorylant la protéine Bcl-2 (Figure IV.1) (Wang *et al*, 1998). CDK1 est une kinase dépendante de la cycline, faisant partie de la famille des sérine/thréonine kinases et qui est essentielle à la transition G1/S et G2/M. La polymérisation des microtubules induirait l'activation de la CDK1, l'entrée dans la mitose et l'apoptose. Il semblerait que CDK1, dans certains types cellulaires et en fonction du contexte cellulaire, soit également capable de phosphoryler Bcl-2 sur les résidus S70, S87 et T69, ce qui conduit à son inhibition et de phosphoryler Bad sur le résidu S128, ce qui conduit à son activation. Il a été démontré que le taxol est également capable d'induire l'activation de NFκB. L'activation de NFκB peut déterminer la sensibilité des cellules cancéreuses au taxol car il a été démontré qu'une

inhibition de NFκB augmente l'apoptose induite par le taxol. Plusieurs études ont également démontré qu'une surexpression de Bcl-2 et de Bcl-XL confère une résistance des cellules cancéreuses faces aux agents chimiothérapeutiques dont les agents interférant avec les microtubules (Bhalla *et al*, 2003). Indépendamment de sa liaison aux microtubules, il semble que le taxol induise l'expression de gènes codant pour un facteur de transcription suppresseur de tumeur (krox-24) ou pour des enzymes impliquées dans la prolifération, l'apoptose et l'inflammation (cyclooxygénase-2 et l'IkB kinase) (Moos and Fitzpatrick, 1998). Il serait intéressant d'étudier les effets de l'hypoxie sur ces différentes voies de signalisation intracellulaires.

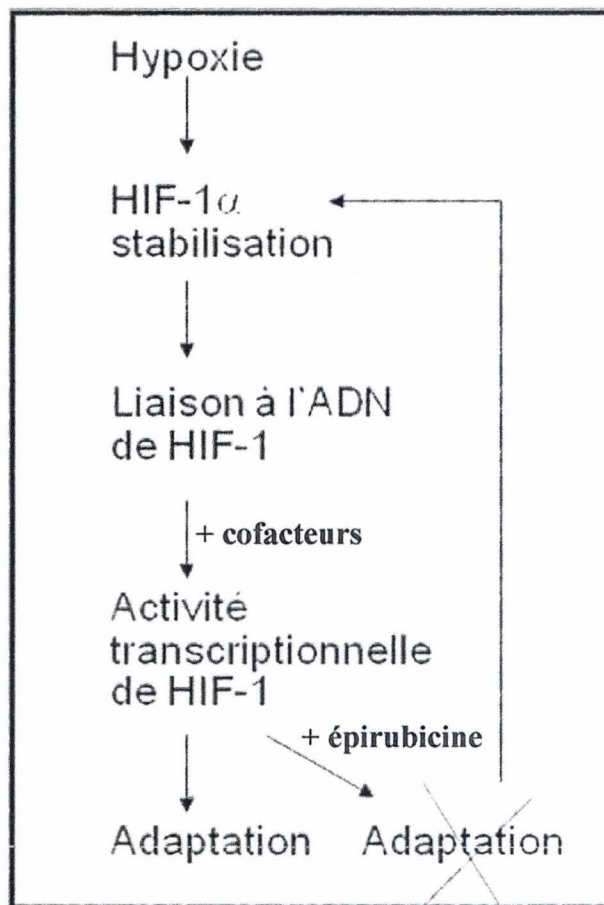
Finalement, le rôle de la protéine Bnip3 dans la protection apportée par l'hypoxie a été investigué. L'expression en ARNm et en protéine de Bnip3 est augmentée en hypoxie, ce qui correspond avec l'observation selon laquelle Bnip3 est un gène cible de HIF-1 et son expression est donc induite en hypoxie (Sowter, 2001). Le taxol n'a aucun effet sur cette expression alors que l'épirubicine l'inhibe complètement. De plus en plus d'études indiquent que Bnip3, outre son rôle pro-apoptotique, serait également impliqué dans l'induction de l'autophagie. En effet, l'hypoxie induirait l'expression de Bnip3 qui activerait l'autophagie de la mitochondrie (mitophagie), ce qui représente une réponse métabolique adaptative à l'hypoxie nécessaire pour maintenir l'homéostasie red-ox et la survie cellulaire (Zhang *et al*, 2008 ; Semenza, 2008). Dans ces conditions, Bnip3, et par conséquent HIF-1, favoriseraient la survie cellulaire. Bnip3 représente donc un acteur potentiel dans la protection apportée par l'hypoxie. Il aurait été intéressant d'inhiber l'expression de Bnip3 à l'aide de siRNA et d'étudier les effets de cette inhibition sur l'apoptose induite par le taxol. Si l'apoptose augmente en présence des siRNA, cela signifie que Bnip3, lorsqu'il est présent, joue un rôle anti-apoptotique et favorise la survie cellulaire, peut-être en activant l'autophagie. Afin d'investiguer si l'autophagie est impliquée dans la protection des cellules, nous aurions pu inhiber l'autophagie, à l'aide de siRNA dirigés contre des protéines clés dans l'activation de l'autophagie telles que becline 1 ou Atg 5 et observer les conséquences de cette inhibition sur le degré de l'apoptose. Si l'apoptose augmente suite à l'inhibition de l'autophagie, cela signifie que l'autophagie protège les cellules de l'apoptose. On pourrait aussi rechercher la présence de vésicules d'autophagie dans les cellules par microscopie électronique ou observer si la protéine LC3 est relocalisée grâce à un marquage en immunofluorescence. En conclusion, ces résultats suggèrent que Mcl-1 et/ou Bnip3 pourraient participer à la protection induite par l'hypoxie de l'apoptose déclenchée par le taxol. Une inhibition, par l'hypoxie, de l'activité pro-apoptotique de Bim n'est pas non plus exclue.

### **3. Partie III : Etude du rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la protection apportée par l'hypoxie**

Le fait que l'épirubicine inhibe fortement l'expression de Bnip3 en hypoxie est intrigant. Afin de comprendre par quels mécanismes l'épirubicine inhibe l'expression de Bnip3 et afin d'investiguer un éventuel rôle de HIF-1 dans la protection apportée par l'hypoxie, nous avons d'abord étudié l'activité de ce facteur de transcription dans les différentes conditions. Nous avons ensuite étudié les effets de l'inhibition de l'activité de HIF-1 sur l'apoptose induite par les différents agents. L'inhibition de l'activité de HIF-1 a été obtenue en inhibant l'expression de la sous-unité HIF-1α à l'aide de siRNA.

#### **3.1. Effets de l'hypoxie et des agents chimiothérapeutiques sur l'activité de HIF-1**

Les résultats obtenus indiquent que l'épirubicine inhibe l'activité transcriptionnelle de HIF-1 sans inhiber sa liaison à l'ADN ni la stabilisation de la sous-unité HIF-1α. Nous observons, au contraire, une forte augmentation de la quantité en protéine de HIF-1α lorsque les cellules



**Figure IV.2 : Représentation de la boucle de rétro-inhibition du facteur de transcription HIF-1.**

Lorsque les cellules subissent un stress hypoxique, la stabilisation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est induite, ce qui permet la translocation de HIF-1 $\alpha$  dans le noyau et son hétéro-dimérisation avec ARNT pour former le facteur de transcription HIF-1. HIF-1 va ensuite se lier à l'ADN et devenir actif en interagissant avec ses cofacteurs. HIF-1 va donc induire l'expression de ses gènes cibles qui vont permettre à la cellule de s'adapter à l'hypoxie et de retrouver une meilleure oxygénation. Lorsque cette réponse est mise en place, la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  induite par une diminution de l'oxygène, est inhibée et la quantité en protéine de HIF-1 $\alpha$  diminue formant une boucle de rétro-inhibition. Par contre, si l'activité transcriptionnelle de HIF-1 est inhibée, par exemple en présence d'épirubicine, la cellule ne pourra pas s'adapter à l'hypoxie et la sous-unité HIF-1 $\alpha$  continuera à être stabilisée.

sont incubées en hypoxie en présence d'épirubicine. Comme il n'y a pas d'augmentation de l'expression de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$ , cette augmentation est probablement due à une augmentation de la stabilisation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$ . En effet, lorsque les cellules subissent un stress hypoxique, la stabilisation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est induite, ce qui permet la translocation de HIF-1 $\alpha$  dans le noyau et son hétéro-dimérisation avec ARNT pour former le facteur de transcription HIF-1. HIF-1 va ensuite se lier à l'ADN et de venir actif en interagissant avec ses cofacteurs. HIF-1 va alors induire l'expression de ses gènes cibles qui vont permettre à la cellule de s'adapter à l'hypoxie et de retrouver une meilleure oxygénation. Lorsque cette réponse est mise en place la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ , induite par une diminution de l'oxygène, est inhibée et la quantité en protéine de HIF-1 $\alpha$  diminue, formant une boucle de retro-inhibition. Par contre, si l'activité transcriptionnelle de HIF-1 est inhibée (comme c'est le cas en présence d'épirubicine), la cellule ne pourra pas s'adapter à l'hypoxie et la sous-unité HIF-1 $\alpha$  continuera d'être stabilisée. Ceci pourrait expliquer pourquoi, en présence d'épirubicine, la quantité protéique de HIF-1 $\alpha$  est élevée alors que l'activité transcriptionnelle de HIF-1 est fortement inhibée (Figure IV.2). L'inhibition de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 explique pourquoi l'expression de Bnip3, en hypoxie, est inhibée en présence d'épirubicine. Il serait intéressant de comprendre ce mécanisme d'inhibition qui pourrait impliquer les cofacteurs p300, CBP, SRC-1 de HIF-1, puisque l'inhibition s'effectue au niveau de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Cette inhibition pourrait être causée par le facteur de transcription p53, de manière indépendante de son activité transcriptionnelle, qui, une fois stabilisé et/ou ayant subi des modifications post-traductionnelles, se lie aux mêmes cofacteurs de HIF-1 provoquant une compétition entre HIF-1 et p53 pour se lier aux cofacteurs. Contrairement au taxol, l'épirubicine est un agent qui induit des dommages à l'ADN et l'on peut imaginer que ces dommages activent les voies de signalisation responsables de la stabilisation et/ou des modifications post-traductionnelles de p53 qui vont permettre le recrutement des cofacteurs par p53. Ces modifications seraient induites uniquement lorsque les cellules sont incubées en présence d'épirubicine. p53, sans nécessairement être actif transcriptionnellement, recruterait les cofacteurs et empêcherait HIF-1 d'être actif transcriptionnellement. Nous avons étudié la localisation subcellulaire de p53 par un marquage en immunofluorescence et les résultats indiquent que p53 est localisé dans le noyau des cellules MDA-MB-231 (résultats non montrés). Cependant, il semble que l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en présence d'épirubicine ne soit pas causée par une surexpression de la protéine p53 qui recruterait une quantité plus importante de cofacteurs, car l'expression en protéine de p53 a été étudiée par western blotting et la quantité de protéine p53 ne varie ni en hypoxie ni en présence de taxol ou d'épirubicine (résultats non montrés). Par contre, une ou plusieurs modification(s) post-traductionnelle(s) de p53 induite(s) par une réponse initiée par les dommages à l'ADN causés par l'épirubicine pourrai(en)t être responsable(s) d'un recrutement plus important des cofacteurs.

Ces résultats suggèrent également que l'expression des autres gènes cibles de HIF-1 (qui permettent aux cellules de s'adapter à l'hypoxie et de résister à l'apoptose induite par les agents) devrait également être réprimée en présence d'épirubicine alors qu'ils sont bels et bien exprimés en présence de taxol et donc empêchent la mise en place d'une réponse adaptative en présence d'épirubicine. HIF-1 pourrait jouer un rôle dans la protection des cellules apportée par l'hypoxie contre l'apoptose induite par le taxol puisque dans ce cas, son activité est préservée. C'est ce que nous avons voulu vérifier dans la suite du travail. Les cellules ont donc été transfectées avec des siRNA dirigés contre la sous-unité HIF-1 $\alpha$  afin d'inhiber l'activité de HIF-1 et les conséquences de cette inhibition sur l'apoptose ont été analysées en suivant l'activité de la caspase 3.

### **3.2. Effets des siRNA anti-HIF-1 $\alpha$ sur l'apoptose induite par le taxol ou l'épirubicine**

Les résultats indiquent que HIF-1 est en partie responsable de la protection apportée par l'hypoxie car les cellules transfectées avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$ , incubées en hypoxie et en présence de taxol possèdent une activité caspase 3 augmentée pour atteindre le niveau de l'activité caspase 3 présente dans les cellules non transfectées, incubées en normoxie en présence de taxol. HIF-1 favoriserait également la survie cellulaire en normoxie car l'apoptose présente au sein des cellules transfectées avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  augmente dans toutes les conditions en normoxie, en présence des agents. HIF-1 ne semble pas être l'unique responsable de la protection apportée par l'hypoxie car même si l'apoptose augmente dans les cellules lorsqu'elles sont transfectées avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$ , une protection apportée par l'hypoxie est toujours observée lorsque l'on compare les cellules incubées en hypoxie ou en normoxie, transfectées avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$ , en présence de taxol. Un second facteur de transcription pourrait être impliqué dans cette protection. Il pourrait s'agir d'AP-1 qui est un facteur de transcription activé en hypoxie. En effet, Piret et al ont démontré que l'hypoxie protège les cellules HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide de manière dépendante d'AP-1 (Piret *et al*, 2006). Par conséquent, il serait intéressant d'utiliser des siRNA dirigés contre la sous-unité c-jun afin d'inhiber l'activité d'AP-1 et d'observer les effets de cette inhibition sur l'apoptose induite dans les cellules MDA-MB-231 par les agents. Si l'activité apoptotique des cellules augmente en présence des siRNA anti-c-jun, cela signifie qu'AP-1 est également impliqué dans la protection induite par l'hypoxie. Il serait également intéressant d'analyser s'il existe des gènes impliqués dans l'apoptose et dans le cycle cellulaire dont l'expression est régulée par AP-1. Des résultats préliminaires, obtenus au laboratoire par PCR en temps réel avec des extraits obtenus à partir de cellules MDA-MB-231 transfectées ou non avec des siRNA anti-c-jun, indiquent qu'AP-1 induit une augmentation de l'expression de l'ARNm de Mcl-1 et une diminution de l'expression de l'ARNm de p21, de NOXA et de PUMA, ce qui pourrait effectivement être corrélé avec une diminution de l'apoptose.

## **4. Partie IV : Etude de l'effet de l'inhibition de HIF-1 sur l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose**

HIF-1 joue un rôle important dans la résistance induite par l'hypoxie. Durant la dernière partie de ce travail, nous avons donc étudié les effets de l'inhibition de HIF-1 sur l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose. Il est intéressant d'étudier les variations de plusieurs gènes impliqués dans l'apoptose car la résistance induite par l'hypoxie n'est certainement pas due à une modification d'expression d'un seul gène mais plutôt d'un ensemble de gènes qui vont permettre de faire pencher la balance vers la survie cellulaire. De manière générale, on observe que l'expression de la plupart des gènes étudiés diminue en hypoxie, de manière dépendante ou indépendante de HIF-1. Cette diminution d'expression constitue sans doute une adaptation de la cellule, face à son environnement hypoxique, qui va diminuer la synthèse protéique afin d'économiser son ATP. Il est également intéressant de préciser que nous n'avons observé aucune augmentation d'expression génique indépendante de HIF-1. En effet, l'augmentation d'expression induite par l'hypoxie de tous les gènes que nous avons détectés est toujours dépendante de HIF-1, c'est-à-dire inhibée lorsque l'activité de HIF-1 est inhibée par les siRNA.

### **4.1. Protéines dont le profil d'expression favorise la survie ou la mort cellulaire**

Les variations d'expression du gène **Bnip3**, dont l'expression est connue pour être induite en hypoxie par HIF-1, nous ont permis de vérifier que la transfection avec les siRNA destinée à

inhiber l'activité de HIF-1 a fonctionné : en effet, en hypoxie, l'expression de Bnip3 est augmentée en absence et en présence de taxol et est inhibée pour ces mêmes conditions lorsque les cellules sont transfectées avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$ . Comme décrit précédemment, la protéine Bnip3 étant une protéine capable de favoriser la survie cellulaire ou l'apoptose, il est donc difficile de décrire quel est son rôle dans l'orientation du destin des cellules dans nos conditions expérimentales. Comme son expression est augmentée dans les cellules incubées en hypoxie en présence de taxol lorsqu'il y a une protection, on pourrait supposer que Bnip3 joue le rôle d'une protéine favorisant la survie cellulaire en activant l'autophagie en hypoxie. L'utilisation de siRNA anti-Bnip3 nous permettrait de confirmer cette hypothèse.

L'interprétation des résultats reprenant les variations d'expression des récepteurs TRAIL et des récepteurs faisant partie de la superfamille des récepteurs au TNF est délicate car ces récepteurs peuvent favoriser la mort ou la survie cellulaire en fonction des voies de signalisation qui sont activées dans la cellule. L'activation de ces voies de signalisation dépend du type cellulaire et du contexte intra- et extra- cellulaire. Les résultats indiquent que l'expression de trois récepteurs (TNF RSF 1B = **TNF RII**, TNF RSF 10A = **TRAIL R1** et TNF RSF 21 = **DR6**) est réprimée dans les cellules incubées en hypoxie en absence et en présence de taxol (H CTL et H Tax), lorsque l'activité apoptotique des cellules est faible, par rapport aux cellules incubées en normoxie. Nous observons que cette diminution d'expression est moins prononcée lorsque les cellules sont transfectées avec les siRNA anti-HIF-1 $\alpha$  dans les conditions suivantes : H CTL SI et H Tax SI. Parallèlement, l'expression de ces trois récepteurs semble être légèrement augmentée pour la condition N Tax, lorsque l'activité apoptotique des cellules est élevée, cette augmentation semble être dépendante de HIF-1. Ces résultats nous poussent à croire que l'hypoxie inhibe l'expression de ces trois récepteurs de manière dépendante de HIF-1, ce qui permettrait d'inhiber, en partie, la réponse apoptotique induite par le taxol, sans l'inhiber complètement. L'expression des récepteurs TNF RSF 1B et TNF RSF 21 est également inhibée par le taxol. Cependant, nous ne pouvons affirmer avec certitude si l'expression de ces récepteurs favorise la mort ou la survie cellulaire dans les différentes conditions. Il serait également intéressant d'étudier comment le taxol induit une modification de l'expression de ces gènes. En ce qui concerne le ligand du récepteur TNF RSF 10 A, nommé TNF SF 10 (= **TRAIL**), les résultats indiquent que le taxol induit une diminution de son expression, alors qu'en hypoxie (H Tax) son expression augmente, de manière dépendante de HIF-1. La diminution d'expression de TNF SF 10 dans la condition N Tax est contradictoire avec le fait que l'activité apoptotique dans cette condition est élevée. Cependant, l'expression de son récepteur TNF RSF 10A est très élevée dans la condition N Tax et il est possible que le niveau d'expression du récepteur au niveau de la membrane de la cellule cancéreuse soit déterminant dans l'induction de l'apoptose. Cependant, ces résultats ne nous permettent pas d'affirmer que l'expression du ligand TNF SF 10 et sa liaison à son récepteur favorisent la survie ou la mort cellulaire des cellules.

#### **4.2. Protéines dont le profil d'expression favorise la survie cellulaire**

Concernant le gène codant la caspase 3 (**CASP 3**), les résultats indiquent que son expression est diminuée en hypoxie en absence et en présence de taxol, de manière dépendante de HIF-1, ce qui pourrait favoriser la survie cellulaire. La régulation de l'expression du gène CASP3 par HIF-1 est moins prononcée lorsque les cellules sont incubées en présence de taxol mais on observe quand-même une légère diminution induite par HIF-1. L'expression du gène CASP3 est légèrement augmentée en normoxie en présence de taxol (N Tax) de manière dépendante de HIF-1. En conclusion, la régulation de l'expression du gène de la caspase 3 semble être, en partie, dépendante de HIF-1, ce qui pourrait favoriser la résistance des cellules, induite par l'hypoxie, face à l'apoptose induite par le taxol.

Le gène **PMAIP1** code pour la protéine NOXA, une protéine pro-apoptotique dont l'expression est induite par le taxol, ce qui favorise sans doute la mort cellulaire. Son expression est réprimée en hypoxie dans la condition contrôle et en présence de taxol, de manière dépendante de HIF-1 alors que pour la condition N Tax, on observe une augmentation de l'expression de NOXA. Par conséquent la répression de l'expression de NOXA en hypoxie, induite par HIF-1, représente un autre mécanisme pouvant être responsable de la protection des cellules apportée par l'hypoxie.

La protéine **Mcl-1** est une protéine anti-apoptotique dont l'expression, apparemment régulée par HIF-1, est augmentée en hypoxie. Son expression est également augmentée lorsque les cellules sont incubées en présence de taxol. Ces résultats correspondent aux résultats obtenus lors de l'étude de l'expression en ARNm de Mcl-1 dans la partie II de ce travail. Comme mentionné plus haut dans cette discussion, Mcl-1 représente un candidat potentiel dans la protection apportée par l'hypoxie.

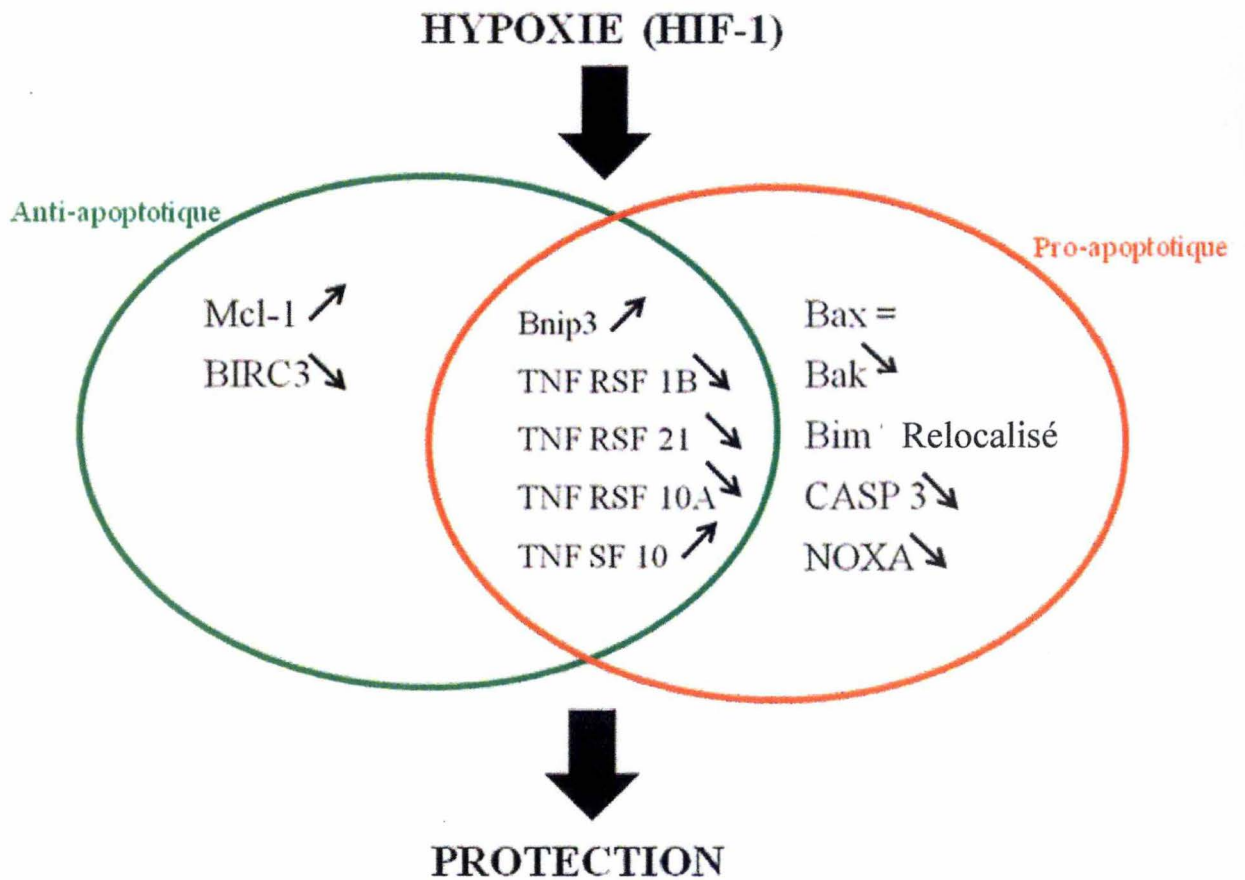
### **4.3. Protéines dont l'expression favorise la mort cellulaire**

**BIRC3**, aussi appelée cIAP2, est un gène codant pour une protéine anti-apoptotique faisant partie de la famille des IPAs et dont l'expression, contrairement à Mcl-1, semble être réprimée en normoxie comme en hypoxie par HIF-1. Ce résultat est contradictoire car on s'attend à ce que HIF-1 augmente l'expression des gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques, ce qui expliquerait la résistance des cellules induite par l'hypoxie. Cependant, il ne faut pas oublier que la prise de décision pour induire ou ne pas induire l'apoptose résulte de la balance entre la quantité de protéines pro- et anti-apoptotiques. Si la balance penche du côté pro-apoptotique, l'apoptose sera induite, si la balance penche du côté anti-apoptotique, il n'y aura pas apoptose. De plus, même si certaines protéines sont décrites actuellement comme ayant un rôle anti-apoptotique, il se peut que dans les années à venir, on découvre qu'elles présentent également une activité pro-apoptotique en fonction du contexte intracellulaire. Bnip3 est une protéine illustrant parfaitement ce concept puisqu'elle fut d'abord décrite comme étant une protéine pro-apoptotique alors qu'elle semble également jouer un rôle anti-apoptotique via son rôle dans l'activation de l'autophagie. Le rôle de BIRC3 dans l'induction ou l'inhibition de l'apoptose dans les cellules MDA-MB-231, en présence de taxol, est donc inconnu.

### **4.4. Perspectives**

L'étude des effets de l'inhibition de HIF-1 sur l'expression des gènes codant les protéines **MRP1** et **P-gp** est également intéressante car ces deux protéines, qui sont des pompes à efflux ATP-dépendant capables d'expulser une variété de drogues anti-cancéreuses hors de la cellule pour maintenir une faible concentration intracellulaire, sont impliquées dans le MDR (multidrug resistance). De plus, des études ont démontré que l'expression de ces protéines est induite en hypoxie par le facteur de transcription HIF-1. En effet, Chen et al ont démontré que des cellules cancéreuses de cerveau humain T98G transfectées à l'aide de siRNA inhibant l'expression de HIF-1 $\alpha$  étaient plus sensibles à la doxorubicine et à l'étoposide par rapport aux cellules non transfectées. Cette augmentation de la sensibilité aux agents serait due à la diminution d'expression des protéines MRP1 et P-gp elle-même due à l'inhibition d'expression de HIF-1 $\alpha$  (Chen *et al*, 2008). Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire suggèrent que les protéines MDR1 et P-gp ne sont cependant pas impliquées dans la protection des cellules MDA-MB-231, apportée par l'hypoxie.

Bien sûr, tous les résultats obtenus à l'aide des cartes microfluidiques sont à prendre avec du recul car même si la plupart des variations de l'expression des gènes ont été confirmées à l'aide de la PCR en temps réel à partir de nouveaux extraits réalisés dans une expérience



**Figure IV.3 :** Représentation schématique reprenant les résultats obtenus lors de l'étude des variations d'expression génique régulée par HIF-1 en hypoxie permettant aux cellules d'être protégées face à l'apoptose induite par le taxol.

indépendante, il est nécessaire de confirmer à nouveau ces résultats en réalisant de nouveaux extraits d'ARNm, pour les mêmes conditions, dont les variations d'expression seront analysées par PCR en temps réel. De plus, le profil d'expression en ARNm d'une protéine ne correspond pas toujours à son profil d'expression en protéine. Il faut donc également étudier les variations d'expression protéique pour chacun des gènes sélectionnés, ce qui permettra de faire un premier tri dans les gènes d'intérêt. Ensuite des siRNA, dirigés contre les gènes d'intérêt, peuvent être utilisés afin d'inhiber leur expression et d'étudier les effets de cette inhibition sur l'apoptose induite par le taxol. Cette étude nous permettrait de définir si l'expression d'un gène d'intérêt (comme les récepteurs au TNF cités ci-dessus) favorise la survie ou la mort cellulaire. En effet, si l'apoptose augmente lorsque les cellules sont transfectées avec des siRNA dirigés contre le gène d'intérêt, cela signifie que la protéine encodée par ce gène joue un rôle anti-apoptotique.

Il faut également noter que nous avons ici étudié l'influence de l'inhibition du facteur HIF-1 sur l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose. Cependant, il est évident que HIF-1 n'est pas le seul facteur de transcription activé en hypoxie, capable de réguler des gènes impliqués l'apoptose. Il serait intéressant d'effectuer la même étude en inhibant d'autres facteurs de transcription tels qu'AP-1 ou NFκB qui peuvent aussi être impliqués dans la protection apportée par l'hypoxie. Il se peut que certains gènes dont l'expression est régulée par HIF-1 soient également régulés par un autre facteur de transcription. C'est donc l'ensemble des différents facteurs de transcription activés par l'hypoxie et leur influence sur l'expression d'un ensemble de gènes qui détermine le devenir d'une cellule. L'activation des différents facteurs de transcription dépend des voies de signalisation activées dans les cellules, ce qui dépend du type cellulaire et des contextes intra et extracellulaires.

## **5. Conclusion générale**

Les résultats obtenus au cours de ce travail indiquent que la protection apportée par l'hypoxie dans les cellules MDA-MB-231 contre l'apoptose induite par le taxol est en partie dépendante de HIF-1. Ce facteur de transcription régule l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose (Figure IV.3): il induit l'expression de gènes codant pour des protéines qui favorisent la survie cellulaire telles que Mcl-1 et diminue l'expression de gènes codant pour des protéines pro- apoptotiques telles que Bak, NOXA et CASP3. L'expression de Bnip3 est également induite par HIF-1 en hypoxie mais nous n'avons pas encore défini si Bnip3 remplit le rôle d'une protéine pro- ou anti-apoptotique. L'expression des récepteurs TNF RSF 21, TNF RSF 1B et TNF RSF 10A est inhibée par HIF-1 en hypoxie mais, comme pour Bnip3, nous n'avons pas encore défini si ces récepteurs favorisent la survie ou la mort cellulaire. Différentes études ont déjà démontré que la présence de HIF-1 dans les tumeurs est corrélée à un pronostic négatif et que l'inhibition de HIF-1 par différents mécanismes interfère avec la croissance tumorale en contribuant à l'effet anti-angiogénique et anti-tumoral des agents chimiothérapeutiques (Semenza, 2003). Par conséquent, ces données indiquent que le facteur de transcription HIF-1 représente une cible thérapeutique intéressante pour la mise au point de nouvelles thérapies anti-cancéreuses.

## **V. BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Ameyar, M., M. Wisniewska, et al. (2003). "A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against." Biochimie **85**(8): 747-52.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-8.
- Baptiste-Okoh, N., A. M. Barsotti, et al. (2008). "A role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(6): 1937-42.
- Bardos, J. I. and M. Ashcroft (2005). "Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network." Biochim Biophys Acta **1755**(2): 107-20.
- Bhalla, K. N. (2003). "Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis." Oncogene **22**(56): 9075-86.
- Brahimi-Horn, M. C., J. Chiche, et al. (2007). "Hypoxia and cancer." J Mol Med **85**(12): 1301-7.
- Bruick, R. K. (2003). "Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor." Genes Dev **17**(21): 2614-23.
- Burlacu, A. (2003). "Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins." J Cell Mol Med **7**(3): 249-57.
- Buttgereit, F. and M. D. Brand (1995). "A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells." Biochem J **312** ( Pt 1): 163-7.
- Cain, K., S. B. Bratton, et al. (2002). "The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex." Biochimie **84**(2-3): 203-14.
- Carrero, P., K. Okamoto, et al. (2000). "Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha." Mol Cell Biol **20**(1): 402-15.
- Chaudary, N. and R. P. Hill (2006). "Hypoxia and metastasis in breast cancer." Breast Dis **26**: 55-64.
- Chen, L., P. Feng, et al. (2008). "Effect of Hypoxia-inducible Factor-1alpha Silencing on the Sensitivity of Human Brain Glioma Cells to Doxorubicin and Etoposide." Neurochem Res.
- Chowdhury, I., B. Tharakan, et al. (2008). "Caspases - an update." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **151**(1): 10-27.
- Chun, Y. S., M. S. Kim, et al. (2002). "Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha." J Korean Med Sci **17**(5): 581-8.
- Comerford, K. M., T. J. Wallace, et al. (2002). "Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene." Cancer Res **62**(12): 3387-94.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer **2**(9): 647-56.
- Cosse, J. P., A. Sermeus, et al. (2007). "Differential effects of hypoxia on etoposide-induced apoptosis according to the cancer cell lines." Mol Cancer **6**: 61.
- Cummins, E. P. and C. T. Taylor (2005). "Hypoxia-responsive transcription factors." Pflugers Arch **450**(6): 363-71.
- Dachs, G. U. and G. M. Tozer (2000). "Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation." Eur J Cancer **36**(13 Spec No): 1649-60.
- Daido, S., T. Kanzawa, et al. (2004). "Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells." Cancer Res **64**(12): 4286-93.
- Daugas, E., S. A. Susin, et al. (2000). "Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis." Faseb J **14**(5): 729-39.
- Degterev, A., M. Boyce, et al. (2003). "A decade of caspases." Oncogene **22**(53): 8543-67.
- Desagher, S. and J. C. Martinou (2000). "Mitochondria as the central control point of apoptosis." Trends Cell Biol **10**(9): 369-77.
- Erler, J. T., C. J. Cawthorne, et al. (2004). "Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to

## BIBLIOGRAPHIE

---

- drug resistance." *Mol Cell Biol* **24**(7): 2875-89.
- Esteva, F. J., V. Valero, et al. (2001). "Chemotherapy of metastatic breast cancer: what to expect in 2001 and beyond." *Oncologist* **6**(2): 133-46.
- Fadeel, B. and S. Orrenius (2005). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease." *J Intern Med* **258**(6): 479-517.
- Fan, T. J., L. H. Han, et al. (2005). "Caspase family proteases and apoptosis." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **37**(11): 719-27.
- Fels, D. R. and C. Koumenis (2005). "HIF-1alpha and p53: the ODD couple?" *Trends Biochem Sci* **30**(8): 426-9.
- Fong, G. H. and K. Takeda (2008). "Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins." *Cell Death Differ* **15**(4): 635-41.
- Gross, A., J. M. McDonnell, et al. (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* **13**(15): 1899-911.
- Han, J., L. A. Goldstein, et al. (2005). "Disruption of Mcl-1.Bim complex in granzyme B-mediated mitochondrial apoptosis." *J Biol Chem* **280**(16): 16383-92.
- Han, J., L. A. Goldstein, et al. (2006). "Interrelated roles for Mcl-1 and BIM in regulation of TRAIL-mediated mitochondrial apoptosis." *J Biol Chem* **281**(15): 10153-63.
- Hirota, K. and G. L. Semenza (2006). "Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1." *Crit Rev Oncol Hematol* **59**(1): 15-26.
- Hopfl, G., O. Ogunshola, et al. (2004). "HIFs and tumors--causes and consequences." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**(4): R608-23.
- Jin, Z. and W. S. El-Deiry (2005). "Overview of cell death signaling pathways." *Cancer Biol Ther* **4**(2): 139-63.
- Kelekar, A. and C. B. Thompson (1998). "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis." *Trends Cell Biol* **8**(8): 324-30.
- Kim, R., M. Emi, et al. (2004). "The role of Fas ligand and transforming growth factor beta in tumor progression: molecular mechanisms of immune privilege via Fas-mediated apoptosis and potential targets for cancer therapy." *Cancer* **100**(11): 2281-91.
- Klimova, T. and N. S. Chandel (2008). "Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF." *Cell Death Differ* **15**(4): 660-6.
- Knowles, H. J. and A. L. Harris (2001). "Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Hypoxia and tumorigenesis." *Breast Cancer Res* **3**(5): 318-22.
- Koong, A. C., E. Y. Chen, et al. (1994). "Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues." *Cancer Res* **54**(6): 1425-30.
- Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, et al. (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." *Cell Death Differ* **7**(12): 1166-73.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." *Physiol Rev* **87**(1): 99-163.
- Lacroix, M. and G. Leclercq (2004). "Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update." *Breast Cancer Res Treat* **83**(3): 249-89.
- Lacroix, M., R. A. Toillon, et al. (2006). "p53 and breast cancer, an update." *Endocr Relat Cancer* **13**(2): 293-325.
- Laderoute, K. R. (2005). "The interaction between HIF-1 and AP-1 transcription factors in response to low oxygen." *Semin Cell Dev Biol* **16**(4-5): 502-13.
- Laughner, E., P. Taghavi, et al. (2001). "HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible

## BIBLIOGRAPHIE

---

- factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression." Mol Cell Biol **21**(12): 3995-4004.
- Lavin, M. F. and N. Gueven (2006). "The complexity of p53 stabilization and activation." Cell Death Differ **13**(6): 941-50.
- Letai, A. G. (2008). "Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis." Nat Rev Cancer **8**(2): 121-32.
- Ley, R., K. E. Ewings, et al. (2005). "Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK." Cell Death Differ **12**(8): 1008-14.
- Lisy, K. and D. J. Peet (2008). "Turn me on: regulating HIF transcriptional activity." Cell Death Differ **15**(4): 642-9.
- Lisy, K. and D. J. Peet (2008). "Turn me on: regulating HIF transcriptional activity." Cell Death Differ **15**(4): 642-9.
- Maiuri, M. C., E. Zalckvar, et al. (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 741-52.
- Majno, G. and I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." Am J Pathol **146**(1): 3-15.
- Martinez-Ruiz, G., V. Maldonado, et al. (2008). "Role of Smac/DIABLO in cancer progression." J Exp Clin Cancer Res **27**: 48.
- Maynard, M. A., A. J. Evans, et al. (2007). "Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression." Cell Cycle **6**(22): 2810-6.
- Meijer, A. J. and P. Codogno (2004). "Regulation and role of autophagy in mammalian cells." Int J Biochem Cell Biol **36**(12): 2445-62.
- Mellor, H. R. and A. L. Harris (2007). "The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer." Cancer Metastasis Rev **26**(3-4): 553-66.
- Michels, J., P. W. Johnson, et al. (2005). "Mcl-1." Int J Biochem Cell Biol **37**(2): 267-71.
- Michiels, C. (2004). "Physiological and pathological responses to hypoxia." Am J Pathol **164**(6): 1875-82.
- Mizuno, Y., H. Mochizuki, et al. (1998). "Apoptosis in neurodegenerative disorders." Intern Med **37**(2): 192-3.
- Moos, P. J. and F. A. Fitzpatrick (1998). "Taxane-mediated gene induction is independent of microtubule stabilization: induction of transcription regulators and enzymes that modulate inflammation and apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3896-901.
- Nakajima, W. and N. Tanaka (2007). "Synergistic induction of apoptosis by p53-inducible Bcl-2 family proteins Noxa and Puma." J Nippon Med Sch **74**(2): 148-57.
- Ogier-Denis, E. and P. Codogno (2003). "Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer." Biochim Biophys Acta **1603**(2): 113-28.
- Osborne, C., P. Wilson, et al. (2004). "Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications." Oncologist **9**(4): 361-77.
- Papa, S., C. Bubici, et al. (2006). "The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease." Cell Death Differ **13**(5): 712-29.
- Papa, S., F. Zazzeroni, et al. (2004). "Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival." J Cell Sci **117**(Pt 22): 5197-208.
- Paredes, A., J. L. Blanco, et al. (2006). "[Expression of multidrug resistance (MDR)-associated proteins in solid tumors]." Cir Esp **79**(4): 202-14.
- Piret, J. P., J. P. Cosse, et al. (2006). "Hypoxia protects HepG2 cells against etoposide-induced apoptosis via a HIF-1-independent pathway." Exp Cell Res **312**(15): 2908-20.
- Piret, J. P., E. Minet, et al. (2005). "Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid

## BIBLIOGRAPHIE

---

- cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis." *J Biol Chem* **280**(10): 9336-44.
- Piret, J. P., D. Mottet, et al. (2002). "Is HIF-1 $\alpha$  a pro- or an anti-apoptotic protein?" *Biochem Pharmacol* **64**(5-6): 889-92.
- Proskuryakov, S. Y., A. G. Konoplyannikov, et al. (2003). "Necrosis: a specific form of programmed cell death?" *Exp Cell Res* **283**(1): 1-16.
- Pugh, C. W., J. F. O'Rourke, et al. (1997). "Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit." *J Biol Chem* **272**(17): 11205-14.
- Puthalakath, H., D. C. Huang, et al. (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex." *Mol Cell* **3**(3): 287-96.
- Rankin, E. B. and A. J. Giaccia (2008). "The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis." *Cell Death Differ* **15**(4): 678-85.
- Rath, P. C. and B. B. Aggarwal (1999). "TNF-induced signaling in apoptosis." *J Clin Immunol* **19**(6): 350-64.
- Reisz-Porszasz, S., M. R. Probst, et al. (1994). "Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT)." *Mol Cell Biol* **14**(9): 6075-86.
- Ricci, M. S. and W. X. Zong (2006). "Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways." *Oncologist* **11**(4): 342-57.
- Rolfs, A., I. Kvietikova, et al. (1997). "Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1." *J Biol Chem* **272**(32): 20055-62.
- Rosenquist, M. (2003). "14-3-3 proteins in apoptosis." *Braz J Med Biol Res* **36**(4): 403-8.
- Schmid, T., J. Zhou, et al. (2004). "HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia." *J Cell Mol Med* **8**(4): 423-31.
- Schmid, T., J. Zhou, et al. (2004). "HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia." *J Cell Mol Med* **8**(4): 423-31.
- Schmid, T., J. Zhou, et al. (2004). "p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)." *Biochem J* **380**(Pt 1): 289-95.
- Schuler, M. and D. R. Green (2001). "Mechanisms of p53-dependent apoptosis." *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 6): 684-8.
- Segal-Bendirdjian, E., C. Dudognon, et al. (2005). "[Cell death signalling: recent advances and therapeutic application]." *Bull Cancer* **92**(1): 23-35.
- Semenza, G. L. (2000). "HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia." *J Appl Physiol* **88**(4): 1474-80.
- Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **3**(10): 721-32.
- Semenza, G. L. (2007). "HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma." *J Bioenerg Biomembr* **39**(3): 231-4.
- Semenza, G. L., P. H. Roth, et al. (1994). "Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1." *J Biol Chem* **269**(38): 23757-63.
- Sermeus, A., J. P. Cosse, et al. (2008). "Hypoxia induces protection against etoposide-induced apoptosis: molecular profiling of changes in gene expression and transcription factor activity." *Mol Cancer* **7**: 27.
- Sowter, H. M., P. J. Ratcliffe, et al. (2001). "HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors." *Cancer Res* **61**(18): 6669-73.
- Srinivasula, S. M., S. Gupta, et al. (2003). "Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2." *J Biol Chem* **278**(34): 31469-72.
- Stockmann, C. and J. Fandrey (2006). "Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33**(10): 968-79.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Suzuki, H., A. Tomida, et al. (2001). "Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia." *Oncogene* **20**(41): 5779-88.
- Szegezdi, E., S. E. Logue, et al. (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." *EMBO Rep* **7**(9): 880-5.
- Tansey, E. A. (2008). "Teaching the physiology of adaptation to hypoxic stress with the aid of a classic paper on high altitude by Houston and Riley." *Adv Physiol Educ* **32**(1): 11-7.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." *Science* **281**(5381): 1312-6.
- Tsujimoto, Y., J. Cossman, et al. (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." *Science* **228**(4706): 1440-3.
- Vande Velde, C., J. Cizeau, et al. (2000). "BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore." *Mol Cell Biol* **20**(15): 5454-68.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (2004). "Cancer genes and the pathways they control." *Nat Med* **10**(8): 789-99.
- Wang, G. L., B. H. Jiang, et al. (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5510-4.
- Wang, T. H., H. S. Wang, et al. (1998). "Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways." *J Biol Chem* **273**(9): 4928-36.
- Wang, T. H., H. S. Wang, et al. (2000). "Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together." *Cancer* **88**(11): 2619-28.
- Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* **15**(22): 2922-33.
- Weidemann, A. and R. S. Johnson (2008). "Biology of HIF-1alpha." *Cell Death Differ* **15**(4): 621-7.
- Wenger, R. H. (2002). "Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression." *Faseb J* **16**(10): 1151-62.
- Wouters, A., B. Pauwels, et al. (2007). "Review: implications of in vitro research on the effect of radiotherapy and chemotherapy under hypoxic conditions." *Oncologist* **12**(6): 690-712.
- Yakovlev, A. G., S. Di Giovanni, et al. (2004). "BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis." *J Biol Chem* **279**(27): 28367-74.
- Yang, Y. L. and X. M. Li (2000). "The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities." *Cell Res* **10**(3): 169-77.
- Young, C. D. and S. M. Anderson (2008). "Sugar and fat - that's where it's at: metabolic changes in tumors." *Breast Cancer Res* **10**(1): 202.
- Yu, E. Z., Y. Y. Li, et al. (2004). "Antiapoptotic action of hypoxia-inducible factor-1 alpha in human endothelial cells." *Lab Invest* **84**(5): 553-61.
- Zagorska, A. and J. Dulak (2004). "HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing." *Acta Biochim Pol* **51**(3): 563-85.

## **VI. ANNEXES**

**Annexe 1:** Liste des gènes détectables à l'aide des cartes microfluidiques et de leurs fonctions

18S	eukaryotic 18S rRNA		
ACTB	actin, beta	PS1TP5BP1	This gene encodes one of six different actin proteins. Actins are highly conserved proteins that are involved in cell motility, structure, and integrity. This actin is a major constituent of the contractile apparatus and one of the two nonmuscle cytoskeletal actins.
APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1	CED4; DKFZp781B1145	This gene encodes a cytoplasmic protein that initiates apoptosis. This protein contains several copies of the WD-40 domain, a caspase recruitment domain (CARD), and an ATPase domain (NB-ARC). Upon binding cytochrome c and dATP, this protein forms an oligomeric apoptosome. The apoptosome binds and cleaves caspase 9 proprotein, releasing its mature, activated form. Activated caspase 9 stimulates the subsequent caspase cascade that commits the cell to apoptosis. Alternative splicing results in several transcript variants encoding different isoforms.
BAD	BCL2-antagonist of cell death	BBC2; BCL2L8	The protein encoded by this gene is a member of the BCL-2 family. BCL-2 family members are known to be regulators of programmed cell death. This protein positively regulates cell apoptosis by forming heterodimers with BCL-xL and BCL-2, and reversing their death repressor activity. Proapoptotic activity of this protein is regulated through its phosphorylation. Protein kinases AKT and MAP kinase, as well as protein phosphatase calcineurin were found to be involved in the regulation of this protein. Alternative splicing of this gene results in two transcript variants which encode the same isoform.
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	BAK; CDN1; BCL2L7; MGC3887; BAK-LIKE; MGC117255	The protein encoded by this gene belongs to the BCL2 protein family. BCL2 family members form oligomers or heterodimers and act as anti- or pro-apoptotic regulators that are involved in a wide variety of cellular activities. This protein localizes to mitochondria, and functions to induce apoptosis. It interacts with and accelerates the opening of the mitochondrial voltage-dependent anion channel, which leads to a loss in membrane potential and the release of cytochrome c. This protein also interacts with the tumor suppressor P53 after exposure to cell stress.
BAX	BCL2-associated X protein		The protein encoded by this gene belongs to the BCL2 protein family. BCL2 family members form hetero- or homodimers and act as anti- or pro-apoptotic regulators that are involved in a wide variety of cellular activities. This protein forms a heterodimer with BCL2, and functions as an apoptotic activator. This protein is reported to interact with, and increase the opening of, the mitochondrial voltage dependent anion channel (VDAC), which leads to the loss in membrane potential and the release of cytochrome c. The expression of this gene is regulated by the tumor suppressor P53 and has been shown to be involved in P53-mediated apoptosis. Multiple alternatively spliced transcript variants, which encode different isoforms, have been reported for this gene.
BBC3	BCL2 binding component 3	JFY1; PUMA	This gene encodes a member of the BCL-2 protein family. The protein encoded by this gene is an essential mediator of p53-dependent and p53-independent apoptosis by interacting with BCL2 and BCL2L1/BCL-XL, is localized to the mitochondria in order to induce cytochrome c release and induced by DNA damage, glucocorticoid treatment, growth factor deprivation and p53.
BCAP31	B-cell receptor-associated protein 31	CDM; BAP31; 6C6-AG; DXS1357E	The protein encoded by this gene may play a role in anterograde transport of membrane proteins from the endoplasmic reticulum to the Golgi and may be involved in CASP8-mediated apoptosis.
BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10	CLAP; mE10; CIPER; c-E10; CARMEN	This gene was identified by its translocation in a case of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. The protein encoded by this gene contains a caspase recruitment domain (CARD), and has been shown to induce apoptosis and to activate NF-kappaB. This protein is reported to interact with other CARD domain containing proteins including CARD9, 10, 11 and 14, which are thought to function as upstream regulators in NF-kappaB signaling. This protein is found to form a complex with MALT1, a protein encoded by another gene known to be translocated in MALT lymphoma. MALT1 and this protein are thought to synergize in the activation of NF-kappaB, and the deregulation of either of them may contribute to the same pathogenetic process that leads to the malignancy.
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl-2	This gene encodes an integral outer mitochondrial membrane protein that blocks the apoptotic death of some cells such as lymphocytes. Constitutive expression of BCL2, such as in the case of translocation of BCL2 to Ig heavy chain locus, is thought to be the cause of follicular lymphoma. Two transcript variants, produced by alternate splicing, differ in their C-terminal ends.

BCL2A1	BCL2-related protein A1	GRS; BFL1; ACC-1; ACC-2; HBPA1; BCL2L5	This gene encodes a member of the BCL-2 protein family. The proteins of this family form hetero- or homodimers and act as anti- and pro-apoptotic regulators that are involved in a wide variety of cellular activities such as embryonic development, homeostasis and tumorigenesis. The protein encoded by this gene is able to reduce the release of pro-apoptotic cytochrome c from mitochondria and block caspase activation. This gene is a direct transcription target of NF-kappa B in response to inflammatory mediators, and is up-regulated by different extracellular signals, such as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), CD40, phorbol ester and inflammatory cytokine TNF and IL-1, which suggests a cytoprotective function that is essential for lymphocyte activation as well as cell survival. Alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms have been found for this gene.
BCL2L1	BCL2-like 1	BCLX; BCL2L; Bcl-X; bcl-xL; bcl-xS; BCL-XL/S; DKFZp781P2092	The protein encoded by this gene belongs to the BCL-2 protein family. BCL-2 family members form hetero- or homodimers and act as anti- or pro-apoptotic regulators that are involved in a wide variety of cellular activities. The proteins encoded by this gene are located at the outer mitochondrial membrane, and have been shown to regulate outer mitochondrial membrane channel (VDAC) opening. VDAC regulates mitochondrial membrane potential, and thus controls the production of reactive oxygen species and release of cytochrome C by mitochondria, both of which are the potent inducers of cell apoptosis. Two alternatively spliced transcript variants, which encode distinct isoforms, have been reported. The longer isoform acts as an apoptotic inhibitor and the shorter form acts as an apoptotic activator.
BCL2L10	BCL2-like 10	Boo; Diva; BCL-B; MGC129810; MGC129811	The protein encoded by this gene belongs to the BCL-2 protein family. BCL-2 family members form hetero- or homodimers and act as anti- or pro-apoptotic regulators that are involved in a wide variety of cellular activities. The protein encoded by this gene contains conserved BH4, BH1 and BH2 domains. This protein can interact with other members of BCL-2 protein family including BCL2, BCL2L1/BCL-X(L), and BAX. Overexpression of this gene has been shown to suppress cell apoptosis possibly through the prevention of cytochrome C release from the mitochondria, and thus activating caspase-3 activation. The mouse counterpart of this protein is found to interact with Apaf1 and forms a protein complex with Caspase 9, which suggests the involvement of this protein in APAF1 and CASPASE 9 related apoptotic pathway.
BCL2L11	BCL2-like 11	BAM; BIM; BOD; BimL; BimEL; BIM-beta6; BIM-beta7; BIM-alpha6	The protein encoded by this gene belongs to the BCL-2 protein family. BCL-2 family members form hetero- or homodimers and act as anti- or pro-apoptotic regulators that are involved in a wide variety of cellular activities. The protein encoded by this gene contains a Bcl-2 homology domain 3 (BH3). It has been shown to interact with other members of the BCL-2 protein family, including BCL2, BCL2L1/BCL-X(L), and MCL1, and to act as an apoptotic activator. The expression of this gene can be induced by nerve growth factor (NGF), as well as by the forkhead transcription factor FKHR-L1, which suggests a role of this gene in neuronal and lymphocyte apoptosis. Transgenic studies of the mouse counterpart suggested that this gene functions as an essential initiator of apoptosis in thymocyte-negative selection. Several alternatively spliced transcript variants of this gene have been identified.
BCL2L13	BCL2-like 13	MIL1; BCL-RAMBO	The protein encoded by this gene belongs to the BCL-2 protein family and may promote the activation of caspase-3 and apoptosis.
BCL2L14	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)	BCLG	The protein encoded by this gene belongs to the BCL2 protein family. BCL2 family members form hetero- or homodimers and act as anti- or pro-apoptotic regulators that are involved in a wide variety of cellular activities. Overexpression of this gene has been shown to induce apoptosis in cells. Four alternatively spliced transcript variants, which encode three distinct isoforms, have been reported for this gene.
BCL2L2	BCL2-like 2	BCLW; BCL-W; KIAA0271	This gene encodes a member of the BCL-2 protein family. The proteins of this family form hetero- or homodimers and act as anti- and pro-apoptotic regulators. Expression of this gene in cells has been shown to contribute to reduced cell apoptosis under cytotoxic conditions. Studies of the related gene in mice indicated a role in the survival of NGF- and BDNF-dependent neurons. Mutation and knockout studies of the mouse gene demonstrated an essential role in adult spermatogenesis.
BCL3	B-cell CLL/Lymphoma 3	B-cell CLL/lymphoma 3	This gene is a proto-oncogene candidate. It is identified by its translocation into the immunoglobulin alpha-locus in some cases of B-cell leukemia. The protein encoded by this gene contains seven ankyrin repeats, which are most closely related to those found in I kappa B proteins. This protein functions as a transcriptional co-activator that activates through its association with NF-kappa B homodimers. The expression of this gene can be induced by NF-kappa B, which forms a part of the autoregulatory loop that controls the nuclear residence of p50 NF-kappa B.
BID	BH3 interacting domain death agonist	FP497; MGC15319; MGC42355	This gene encodes a death agonist that heterodimerizes with either agonist BAX or antagonist BCL2. The encoded protein is a member of the BCL-2 family of cell death regulators. It is a mediator of mitochondrial damage induced by caspase-8 (CASP8); CASP8 cleaves this encoded protein, and the COOH-terminal part translocates to mitochondria where it triggers cytochrome c release. Multiple alternatively spliced transcript variants have been found, but the full-length nature of some variants has not been defined.
BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	BP4; NBK; BIP1	The protein encoded by this gene is known to interact with cellular and viral survival-promoting proteins, such as BCL2 and the Epstein-Barr virus in order to enhance programmed cell death. Because its activity is suppressed in the presence of survival-promoting proteins, this protein is suggested as a likely target for antiapoptotic proteins. This protein shares a critical BH3 domain with other death-promoting proteins, BAX and BAK.

BIRC1	NLR family, apoptosis inhibitory protein (NAIP)	BIRC1; NLRB1; psiNAIP; FLJ42520	This gene is part of a 500 kb inverted duplication on chromosome 5q13. This duplicated region contains at least four genes and repetitive elements which make it prone to rearrangements and deletions. The repetitiveness and complexity of the sequence have also caused difficulty in determining the organization of this genomic region. This copy of the gene is full length; additional copies with truncations and internal deletions are also present in this region of chromosome 5q13. It is thought that this gene is a modifier of spinal muscular atrophy caused by mutations in a neighboring gene, SMN1. The protein encoded by this gene contains regions of homology to two baculovirus inhibitor of apoptosis proteins, and it is able to suppress apoptosis induced by various signals. Alternatively spliced transcript variants encoding distinct isoforms have been found for this gene.
BIRC2	baculoviral IAP repeat-containing 2	API1; MIHB; HIAP2; RNF48; cIAP1; Hiap-2	The protein encoded by this gene is a member of a family of proteins that inhibits apoptosis by interacting with TNF receptor associated factors 1 and 2 (TRAF1 and TRAF2) to form an heteromeric complex, which is then recruited to the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2).
BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	AIP1; API2; MIHC; CIAP2; HAIP1; HIAP1; MALT2; RNF49	The protein encoded by this gene is a member of a family of proteins that inhibits apoptosis by binding to tumor necrosis factor receptor-associated factors TRAF1 and TRAF2, probably by interfering with activation of ICE-like proteases. The encoded protein inhibits apoptosis induced by serum deprivation but does not affect apoptosis resulting from exposure to menadione, a potent inducer of free radicals. The amino acid sequence predicts three baculovirus IAP repeat domains and a ring finger domain. Transcript variants encoding the same isoform have been identified.
BIRC4	X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)	API3; ILP1; MIHA; XLP2; BIRC4	The protein encoded by this gene is a member of a family of proteins which inhibit apoptosis through binding to tumor necrosis factor receptor-associated factors TRAF1 and TRAF2. This protein inhibits apoptosis induced by menadione, a potent inducer of free radicals, and ICE. It also inhibits at least two members of the caspase family of cell-death proteases, caspase-3 and caspase-7.
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5	API4; EPR-1	This gene is a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) gene family, which encode negative regulatory proteins that prevent apoptotic cell death. IAP family members usually contain multiple baculovirus IAP repeat (BIR) domains, but this gene encodes proteins with only a single BIR domain. The encoded proteins also lack a C-terminus RING finger domain. Gene expression is high during fetal development and in most tumors yet low in adult tissues. Antisense transcripts are involved in the regulation of this gene's expression. At least four transcript variants encoding distinct isoforms have been found for this gene, but the full-length natures of only three of them have been determined.
BIRC6	baculoviral IAP repeat-containing 6	BRUCE; APOLLON; FLJ13726; FLJ13786; KIAA1289	This gene encodes a protein with a BIR (baculoviral inhibition of apoptosis protein repeat) domain and a UBCC (ubiquitin-conjugating enzyme E2, catalytic) domain. This protein inhibits apoptosis by facilitating the degradation of apoptotic proteins by ubiquitination.
BIRC7	baculoviral IAP repeat-containing 7	KIAP; LIVIN; MLIAP; RNF50; ML-IAP	The protein encoded by this gene is a member of the family of inhibitor of apoptosis proteins (IAP) and contains a single copy of a baculovirus IAP repeat (BIR) as well as a RING-type zinc finger domain. The BIR domain is essential for inhibitory activity and interacts with caspases, while the RING finger domain sometimes enhances antiapoptotic activity but does not inhibit apoptosis alone. Two transcript variants encoding different isoforms have been found for this gene. The two isoforms have different antiapoptotic properties, with isoform alpha protecting cells from apoptosis induced by staurosporine and isoform b protecting cells from apoptosis induced by etoposide.
BIRC8	baculoviral IAP repeat-containing 8	ILP2; ILP-2; hILP2	The protein encoded by this gene belongs to the IAP family and protects against apoptosis mediated by BAX by binding to caspase-9.
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	NIP3	This gene is a member of the BCL2/adenovirus E1B 19 kd-interacting protein (BNIP) family. It interacts with the E1B 19 kDa protein which is responsible for the protection of virally-induced cell death, as well as E1B 19 kDa-like sequences of BCL2, also an apoptotic protector. This gene contains a BH3 domain and a transmembrane domain, which have been associated with pro-apoptotic function. The dimeric mitochondrial protein encoded by this gene is known to induce apoptosis, even in the presence of BCL2.
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	NIX; BNIP3a	This gene is a member of the BCL2/adenovirus E1B 19 kd-interacting protein (BNIP) family. It interacts with the E1B 19 kDa protein which is responsible for the protection of virally-induced cell death, as well as E1B 19 kDa-like sequences of BCL2, also an apoptotic protector. The protein encoded by this gene is a functional homolog of BNIP3, a proapoptotic protein. This protein may function simultaneously with BNIP3 and may play a role in tumor suppression.
BOK	BCL2-related ovarian killer	BOKL; BCL2L9; MGC4631	The protein encoded by this gene belongs to the BCL-2 protein family. BCL-2 family members form hetero- or homodimers and act as anti- and pro-apoptotic regulators that are involved in a wide variety of cellular activities. This protein contains all four BCL-2 like domains (BH1, 2, 3 and 4) and is a pro-apoptotic BCL-2 protein identified in the ovary.

CARD15	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2)	CD; ACUG; BLAU; IBD1; NLRC2; NOD2B; CARD15; CLR16.3; PSORAS1	This gene is a member of the Nod1/Apaf-1 family and encodes a protein with two caspase recruitment (CARD) domains and six leucine-rich repeats (LRRs). The protein is primarily expressed in the peripheral blood leukocytes. It plays a role in the immune response to intracellular bacterial lipopolysaccharides (LPS) by recognizing the muramyl dipeptide (MDP) derived from them and activating the NFkB protein.
CARD4	caspase recruitment domain family member 4	CARD4; NLRC1; CLR7.1	The protein encoded by this gene enhances caspase-9-mediated apoptosis and Induces NF-kappa-B activity.
CARD6	caspase recruitment domain family, member 6	CINCIN1	This gene encodes a protein that contains a caspase recruitment domain (CARD), an antiparallel six-helical bundle that mediates homotypic protein-protein interactions. The encoded protein is a microtubule-associated protein that has been shown to interact with receptor-interacting protein kinases and positively modulate signal transduction pathways converging on activation of the inducible transcription factor NF-kB.
CARD9	caspase recruitment domain family, member 9	hCARD9	The protein encoded by this gene is a member of the CARD protein family, which is defined by the presence of a characteristic caspase-associated recruitment domain (CARD). CARD is a protein interaction domain known to participate in activation or suppression of CARD containing members of the caspase family, and thus plays an important regulatory role in cell apoptosis. This protein was identified by its selective association with the CARD domain of BCL10, a positive regulator of apoptosis and NF-kappaB activation, and is thought to function as a molecular scaffold for the assembly of a BCL10 signaling complex that activates NF-kappaB. Several alternatively spliced transcript variants have been observed, but their full-length nature is not clearly defined.
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	ICE; P45; IL1BC	This gene encodes a protein which is a member of the cysteine-aspartic acid protease (caspase) family. Sequential activation of caspases plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis. Caspases exist as inactive proenzymes which undergo proteolytic processing at conserved aspartic residues to produce 2 subunits, large and small, that dimerize to form the active enzyme. This gene was identified by its ability to proteolytically cleave and activate the inactive precursor of interleukin-1, a cytokine involved in the processes such as inflammation, septic shock, and wound healing. This gene has been shown to induce cell apoptosis and may function in various developmental stages. Alternative splicing of this gene results in five transcript variants encoding distinct isoforms.
CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	MCH4; ALPS2; FLICE2	This gene encodes a protein which is a member of the cysteine-aspartic acid protease (caspase) family. Sequential activation of caspases plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis. Caspases exist as inactive proenzymes which undergo proteolytic processing at conserved aspartic residues to produce two subunits, large and small, that dimerize to form the active enzyme. This protein cleaves and activates caspases 3 and 7, and the protein itself is processed by caspase 8. Three alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms have been described for this gene.
CASP14	caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase	MGC119078; MGC119079	This gene encodes a member of the cysteine-aspartic acid protease (caspase) family. Sequential activation of caspases plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis. Caspases exist as inactive proenzymes which undergo proteolytic processing at conserved aspartic residues to produce two subunits, large and small, that dimerize to form the active enzyme. This caspase has been shown to be processed and activated by caspase 8 and caspase 10 in vitro, and by anti-Fas agonist antibody or TNF-related apoptosis inducing ligand in vivo.
CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	ICH1; NEDD2; CASP-2; ICH-1L; ICH-1L/1S	This gene encodes a protein which is a member of the cysteine-aspartic acid protease (caspase) family. Sequential activation of caspases plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis. Caspases exist as inactive proenzymes which undergo proteolytic processing at conserved aspartic residues to produce two subunits, large and small, that dimerize to form the active enzyme. The proteolytic cleavage of this protein is induced by a variety of apoptotic stimuli. Alternative splicing of this gene results in multiple transcript variants that encode different isoforms.
CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	CPP32; SCA-1; CPP32B	This gene encodes a protein which is a member of the cysteine-aspartic acid protease (caspase) family. Sequential activation of caspases plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis. Caspases exist as inactive proenzymes which undergo proteolytic processing at conserved aspartic residues to produce two subunits, large and small, that dimerize to form the active enzyme. This protein cleaves and activates caspases 6, 7 and 9, and the protein itself is processed by caspases 8, 9 and 10. Alternative splicing of this gene results in two transcript variants that encode the same protein.
CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	TX; ICH-2; Mih1/TX; ICEREL-II; ICE(rel)II	This gene encodes a protein that is a member of the cysteine-aspartic acid protease (caspase) family. Sequential activation of caspases plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis. Caspases exist as inactive proenzymes composed of a prodomain and a large and small protease subunit. Activation of caspases requires proteolytic processing at conserved internal aspartic residues to generate a heterodimeric enzyme consisting of the large and small subunits. This caspase is able to cleave and activate its own precursor protein, as well as caspase 1 precursor. When overexpressed, this gene induces cell apoptosis. Alternative splicing results in transcript variants encoding distinct isoforms.

CASP5	caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase	ICH-3; MGC141966; ICEREL-III; ICE(rel)III	This gene encodes a member of the cysteine-aspartic acid protease (caspase) family. Sequential activation of caspases plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis. Caspases exist as inactive proenzymes which undergo proteolytic processing at conserved aspartic residues to produce two subunits, large and small, that dimerize to form the active enzyme. Overexpression of the active form of this enzyme induces apoptosis in fibroblasts. Max, a central component of the Myc/Max/Mad transcription regulation network important for cell growth, differentiation, and apoptosis, is cleaved by this protein; this process requires Fas-mediated dephosphorylation of Max. The expression of this gene is regulated by interferon-gamma and lipopolysaccharide.
CASP6	caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase	MCH2	This gene encodes a protein which is a member of the cysteine-aspartic acid protease (caspase) family. Sequential activation of caspases plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis. Caspases exist as inactive proenzymes which undergo proteolytic processing at conserved aspartic residues to produce two subunits, large and small, that dimerize to form the active enzyme. This protein is processed by caspases 7, 8 and 10, and is thought to function as a downstream enzyme in the caspase activation cascade. Alternative splicing of this gene results in two transcript variants that encode different isoforms.
CASP7	caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	MCH3; CMH-1; ICE-LAP3	This gene encodes a protein which is a member of the cysteine-aspartic acid protease (caspase) family. Sequential activation of caspases plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis. Caspases exist as inactive proenzymes which undergo proteolytic processing at conserved aspartic residues to produce two subunits, large and small, that dimerize to form the active enzyme. The precursor of this caspase is cleaved by caspase 3 and 10. It is activated upon cell death stimuli and induces apoptosis. Alternative splicing results in four transcript variants, encoding three distinct isoforms.
CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	CAP4; MACH; MCH5; FLICE; ALPS2B; FLJ17672; MGC78473	This gene encodes a member of the cysteine-aspartic acid protease (caspase) family. Sequential activation of caspases plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis. Caspases exist as inactive proenzymes composed of a prodomain, a large protease subunit, and a small protease subunit. Activation of caspases requires proteolytic processing at conserved internal aspartic residues to generate a heterodimeric enzyme consisting of the large and small subunits. This protein is involved in the programmed cell death induced by Fas and various apoptotic stimuli. The N-terminal FADD-like death effector domain of this protein suggests that it may interact with Fas-interacting protein FADD. Many alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms have been described, although not all variants have had their full-length sequences determined.
CASP8AP2	CASP8 associated protein 2	CED-4; FLASH; RIP25; FLJ11208; KIAA1315	This protein is highly similar to FLASH, a mouse apoptotic protein identified by its interaction with the death-effector domain (DED) of caspase 8. Studies of FLASH protein suggested that this protein may be a component of the death-inducing signaling complex that includes Fas receptor, Fas-binding adapter FADD, and caspase 8, and plays a regulatory role in Fas-mediated apoptosis.
CASP9	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	MCH6; APAF3; APAF-3; ICE-LAP6; CASPASE-9c	This gene encodes a member of the cysteine-aspartic acid protease (caspase) family. Sequential activation of caspases plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis. Caspases exist as inactive proenzymes which undergo proteolytic processing at conserved aspartic residues to produce two subunits, large and small, that dimerize to form the active enzyme. This protein is processed by caspase APAF1; this step is thought to be one of the earliest in the caspase activation cascade. Alternative splicing results in two transcript variants which encode different isoforms.
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CASH; FLIP; MRIT; CLARP; FLAME; Casper; FLAME1; c-FLIP; FLAME1; I-FLICE; USURPIN; c-FLIPL; c-FLIPR; c-FLIPS; CASP8AP1	The protein encoded by this gene is an apoptosis regulator protein which may function as a crucial link between cell survival and cell death pathways in mammalian cells. The protein encoded by this gene acts as an inhibitor of TNFRSF6 mediated apoptosis. A proteolytic fragment (p43) is likely retained in the death-inducing signaling complex (DISC) thereby blocking further recruitment and processing of caspase-8 at the complex. Full length and shorter isoforms have been shown either to induce apoptosis or to reduce TNFRSF-triggered apoptosis. The caspase domain lacks the active sites residues involved in catalysis.
CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	IKK1; IKKA; IKBKA; TCF16; NFKBIKA; IKK-alpha	This gene encodes a member of the serine/threonine protein kinase family. The encoded protein, a component of a cytokine-activated protein complex that is an inhibitor of the essential transcription factor NF-kappa-B complex, phosphorylates sites that trigger the degradation of the inhibitor via the ubiquitination pathway, thereby activating the transcription factor.
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	RAIDD; MGC9163	The protein encoded by this gene is a death domain (CARD/DD)-containing protein and has been shown to induce cell apoptosis. Through its CARD domain, this protein interacts with, and thus recruits, caspase 2/ICH1 to the cell death signal transduction complex that includes tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1A), RIPK1/RIP kinase, and numbers of other CARD domain-containing proteins.
DAPK1	death-associated protein kinase 1	DAPK; DKFZp781I035	Death-associated protein kinase 1 is a positive mediator of gamma-interferon induced programmed cell death. DAPK1 encodes a structurally unique 160-kD calmodulin dependent serine-threonine kinase that carries 8 ankyrin repeats and 2 putative P-loop consensus sites. It is a tumor suppressor candidate.

DEDD	death effector domain containing	DEFT; KE05; DEDD1; FLDED1; CASP8IP1	This gene encodes a protein that contains a death effector domain (DED). DED is a protein-protein interaction domain shared by adaptors, regulators and executors of the programmed cell death pathway. Overexpression of this gene was shown to induce weak apoptosis. Upon stimulation, this protein was found to translocate from cytoplasm to nucleus and colocalize with UBTF, a basal factor required for RNA polymerase I transcription, in the nucleolus. At least three transcript variants encoding the same protein have been found for this gene.
DEDD2	death effector domain containing 2	FLAME-3	The protein encoded by this gene may play a critical role in death receptor-induced apoptosis, may target CASP8 and CASP10 to the nucleus, may regulate degradation of intermediate filaments during apoptosis and may play a role in the general transcription machinery in the nucleus.
DIABLO	diablo homolog (Drosophila)	SMAC; SMAC3; DIABLO S; FLJ10537; FLJ25049	This gene encodes an inhibitor of apoptosis protein (IAP)-binding protein. The encoded mitochondrial protein enters the cytosol when cells undergo apoptosis, and it moderates the caspase inhibition of IAPs. Multiple polyadenylation sites have been found for this gene. Several alternatively spliced transcript variants that encode distinct isoforms have been described for this gene but the validity of some transcripts, and their predicted ORFs, has not been determined conclusively.
ESRRBL1	estrogen-related receptor beta like 1	HIPPI; MHS4R2; ESRRBL1; FLJ10147	The protein encoded by this gene has pro-apoptotic function via its interaction with HIP1, leading to recruit caspase-8 (CASP8) and trigger apoptosis. The protein encoded by this gene has the ability to bind DNA sequence motif 5'-AAAGACATG-3' present in the promoter of caspase genes such as CASP1, CASP8 and CASP10, suggesting that it may act as a transcription regulator; however the relevance of such function remains unclear.
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	GIG3; MORT1; MGC8528	The protein encoded by this gene is an adaptor molecule that interacts with various cell surface receptors and mediates cell apoptotic signals. Through its C-terminal death domain, this protein can be recruited by TNFRSF6/Fas-receptor, tumor necrosis factor receptor, TNFRSF25, and TNFSF10/TRAIL-receptor, and thus it participates in the death signaling initiated by these receptors. Interaction of this protein with the receptors unmasks the N-terminal effector domain of this protein, which allows it to recruit caspase-8, and thereby activate the cysteine protease cascade.
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	APT1; CD95; FAS1; APO-1; FASTM; ALPS1A; TNFRSF6	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. This receptor contains a death domain. It has been shown to play a central role in the physiological regulation of programmed cell death, and has been implicated in the pathogenesis of various malignancies and diseases of the immune system. The interaction of this receptor with its ligand allows the formation of a death-inducing signaling complex that includes Fas-associated death domain protein (FADD), caspase 8, and caspase 10. The autoproteolytic processing of the caspases in the complex triggers a downstream caspase cascade, and leads to apoptosis. This receptor has been also shown to activate NF-kappaB, MAPK3/ERK1, and MAPK8/JNK, and is found to be involved in transducing the proliferating signals in normal diploid fibroblast and T cells. At least eight alternatively spliced transcript variants encoding seven distinct isoforms have been described. The isoforms lacking the transmembrane domain may negatively regulate the apoptosis mediated by the full length isoform.
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	FASL; CD178; CD95L; TNFSF6; APT1LG1	The protein encoded by this gene is the ligand for FAS. Both are transmembrane proteins. Interaction of FAS with this ligand is critical in triggering apoptosis of some types of cells such as lymphocytes.
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD; GAPD; MGC88685	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase catalyzes an important energy-yielding step in carbohydrate metabolism, the reversible oxidative phosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate in the presence of inorganic phosphate and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD).
HIP1	huntingtin interacting protein 1	ILWEQ; MGC126506	The product of this gene is a membrane-associated protein that colocalizes with huntingtin. This protein has similarities to cytoskeleton proteins and its interaction with huntingtin is thought to play a functional role in the cell filament network. Loss of normal huntingtin-HIP1 interaction in Huntington disease may contribute to a defect in membrane-cytoskeletal integrity in the brain. This gene could help in the understanding of the normal function of huntingtin and also the pathogenesis of Huntington disease. It also has been implicated in the pathogenesis of hematopoietic malignancies. An alternative splice variant of this gene has been described but its full length sequence has not been determined.
HRK	harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)	DP5; HAKIRI	Activator of apoptosis Hrk regulates apoptosis through interaction with death-repressor proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). The HRK protein lacks significant homology to other BCL2 family members except for an 8-amino acid region that was similar to the BCL2 homology domain-3 (BH3) motif of BIK. HRK interacts with BCL2 and BCLXL via the BH3 domain, but not with the death-promoting BCL2-related proteins BAX, BAK, or BCLXS. HRK localizes to membranes of intracellular organelles in a pattern similar to that previously reported for BCL2 and BCLXL.
HTRA2	HtrA serine peptidase 2	OMI; PARK13; PRSS25	This gene encodes a serine protease. The protein has been localized in the endoplasmic reticulum and interacts with an alternatively spliced form of mitogen-activated protein kinase 14. The protein has also been localized to the mitochondria with release to the cytosol following apoptotic stimulus. The protein is thought to induce apoptosis by binding the apoptosis inhibitory protein baculoviral IAP repeat-containing 4. Nuclear localization of this protein has also been observed. Alternate splicing of this gene results in two transcript variants encoding different isoforms. Additional transcript variants have been described, but their full-length sequences have not been determined.

ICEBERG	ICEBERG caspase-1 inhibitor	ICEBERG	The protein encoded by this gene inhibits generation of IL-1-beta by interacting with caspase-1 and preventing its association with RIP2.
IKBKB	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	IKK2; IKKB; NFKBIKB; FLJ40509; IKK-beta; MGC131801	NFKB1 (MIM 164011) or NFKB2 (MIM 164012) is bound to REL (MIM 164910), RELA (MIM 164014), or RELB (MIM 604758) to form the NFKB complex. The NFKB complex is inhibited by I-kappa-B proteins (NFKBIA, MIM 164008, or NFKBIB, MIM 604495), which inactivate NF-kappa-B by trapping it in the cytoplasm. Phosphorylation of serine residues on the I-kappa-B proteins by kinases (IKBKA, MIM 600664, or IKBKB) marks them for destruction via the ubiquitination pathway, thereby allowing activation of the NF-kappa-B complex. Activated NFKB complex translocates into the nucleus and binds DNA at kappa-B-binding motifs such as 5-prime GGGRNNYYCC 3-prime or 5-prime HGGARNYYCC 3-prime (where H is A, C, or T; R is an A or G purine; and Y is a C or T pyrimidine).
IKBKE	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon	IKKE; IKKI; IKK-i; KIAA0151; MGC125294; MGC125295; MGC125297	The protein encoded by this gene phosphorylates inhibitors of NF-kappa-B thus leading to the dissociation of the inhibitor/NF-kappa-B complex and ultimately the degradation of the inhibitor. The protein encoded by this gene may play a special role in the immune response.
IKBKG	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma	IP; IP1; IP2; FIP3; IPD2; NEMO; FIP-3; Fip3p; AMCBX1; IKK-gamma	Familial incontinentia pigmenti (IP) is a genodermatosis that segregates as an X-linked dominant disorder and is usually lethal prenatally in males (The International Incontinentia Pigmenti Consortium, 2000 [PubMed 10839543]). In affected females it causes highly variable abnormalities of the skin, hair, nails, teeth, eyes, and central nervous system. The prominent skin signs occur in 4 classic cutaneous stages: perinatal inflammatory vesicles, verrucous patches, a distinctive pattern of hyperpigmentation, and dermal scarring. Cells expressing the mutated X chromosome are eliminated selectively around the time of birth, so females with IP exhibit extremely skewed X-inactivation. Familial incontinentia pigmenti is caused by mutations in the NEMO gene and is here referred to as IP2, or 'classical' incontinentia pigmenti. Sporadic incontinentia pigmenti, the so-called IP1, which maps to Xp11, is categorized as hypomelanosis of Ito (MIM 300337).
LRDD	leucine-rich repeats and death domain containing	PIDD; MGC16925; DKFZp434D229	The protein encoded by this gene contains a leucine-rich repeat and a death domain. This protein has been shown to interact with other death domain proteins, such as Fas (TNFRSF6)-associated via death domain (FADD) and MAP-kinase activating death domain-containing protein (MADD), and thus may function as an adaptor protein in cell death-related signaling processes. The expression of the mouse counterpart of this gene has been found to be positively regulated by the tumor suppressor p53 and to induce cell apoptosis in response to DNA damage, which suggests a role for this gene as an effector of p53-dependent apoptosis. Three alternatively spliced transcript variants encoding distinct isoforms have been reported.
LTA	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	LT; TNFB; TNFSF1	Lymphotoxin alpha, a member of the tumor necrosis factor family, is a cytokine produced by lymphocytes. LTA is highly inducible, secreted, and exists as homotrimeric molecule. LTA forms heterotrimers with lymphotoxin-beta which anchors lymphotoxin-alpha to the cell surface. LTA mediates a large variety of inflammatory, immunostimulatory, and antiviral responses. LTA is also involved in the formation of secondary lymphoid organs during development and plays a role in apoptosis.
LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	p33; TNFC; TNFSF3	Lymphotoxin beta is a type II membrane protein of the TNF family. It anchors lymphotoxin-alpha to the cell surface through heterotrimer formation. The predominant form on the lymphocyte surface is the lymphotoxin-alpha 1/beta 2 complex (e.g. 1 molecule alpha/2 molecules beta) and this complex is the primary ligand for the lymphotoxin-beta receptor. The minor complex is lymphotoxin-alpha 2/beta 1. LTB is an inducer of the inflammatory response system and involved in normal development of lymphoid tissue. Lymphotoxin-beta isoform b is unable to complex with lymphotoxin-alpha suggesting a function for lymphotoxin-beta which is independent of lymphotoxin-alpha. Alternative splicing results in multiple transcript variants encoding different isoforms.
MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	TM; EAT; MCL1L; MCL1S; MGC1839; MGC104264	The protein encoded by this gene belongs to the Bcl-2 family. Alternative splicing occurs at this locus and two transcript variants encoding distinct isoforms have been identified. The longer gene product (isoform 1) enhances cell survival by inhibiting apoptosis while the alternatively spliced shorter gene product (isoform 2) promotes apoptosis and is death-inducing.
NALP1	NLR family, pyrin domain containing 1 (NLRP1)	NAC; CARD7; NALP1; SLEV1; DEFCAP; PP1044; VAMAS1; CLR17.1; KIAA0926; DEFCAP-L/S; DKFZp586O1822	This gene encodes a member of the Ced-4 family of apoptosis proteins. Ced-family members contain a caspase recruitment domain (CARD) and are known to be key mediators of programmed cell death. The encoded protein contains a distinct N-terminal pyrin-like motif, which is possibly involved in protein-protein interactions. This protein interacts strongly with caspase 2 and weakly with caspase 9. Overexpression of this gene was demonstrated to induce apoptosis in cells. Multiple alternatively spliced transcript variants encoding distinct isoforms have been found for this gene, but the biological validity of some variants has not been determined.

NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	KBF1; p105; EBP-1; MGC54151; NFKB-p50; NFKB-p105; NF-kappa-B; DKFZp686C01211	This gene encodes a 105 kD protein which can undergo cotranslational processing by the 26S proteasome to produce a 50 kD protein. The 105 kD protein is a Rel protein-specific transcription inhibitor and the 50 kD protein is a DNA binding subunit of the NF-kappa-B (NFKB) protein complex. NFKB is a transcription regulator that is activated by various intra- and extra-cellular stimuli such as cytokines, oxidant-free radicals, ultraviolet irradiation, and bacterial or viral products. Activated NFKB translocates into the nucleus and stimulates the expression of genes involved in a wide variety of biological functions.
NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	LYT10; LYT-10	NFKB has been detected in numerous cell types that express cytokines, chemokines, growth factors, cell adhesion molecules, and some acute phase proteins in health and in various disease states. NFKB is activated by a wide variety of stimuli such as cytokines, oxidant-free radicals, inhaled particles, ultraviolet irradiation, and bacterial or viral products. Inappropriate activation of NF-kappa-B has been linked to inflammatory events associated with autoimmune arthritis, asthma, septic shock, lung fibrosis, glomerulonephritis, atherosclerosis, and AIDS. In contrast, complete and persistent inhibition of NF-kappa-B has been linked directly to apoptosis, inappropriate immune cell development, and delayed cell growth.
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	IKBA; MAD-3; NFKBI	NFKB1 (MIM 164011) or NFKB2 (MIM 164012) is bound to REL (MIM 164910), RELA (MIM 164014), or RELB (MIM 604758) to form the NFKB complex. The NFKB complex is inhibited by I-kappa-B proteins (NFKBIA or NFKBIB, MIM 604495), which inactivate NF-kappa-B by trapping it in the cytoplasm. Phosphorylation of serine residues on the I-kappa-B proteins by kinases (IKBKA, MIM 600664, or IKBKB, MIM 603258) marks them for destruction via the ubiquitination pathway, thereby allowing activation of the NF-kappa-B complex. Activated NFKB complex translocates into the nucleus and binds DNA at kappa-B-binding motifs such as 5-prime GGGRRNYYCC 3-prime or 5-prime HGGARNYYCC 3-prime (where H is A, C, or T; R is an A or G purine; and Y is a C or T pyrimidine).
NFKBIB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	IKBB; TRIP9	NFKB1 (MIM 164011) or NFKB2 (MIM 164012) is bound to REL (MIM 164910), RELA (MIM 164014), or RELB (MIM 604758) to form the NFKB complex. The NFKB complex is inhibited by I-kappa-B proteins (NFKBIA, MIM 164008, or NFKBIB), which inactivate NF-kappa-B by trapping it in the cytoplasm. Phosphorylation of serine residues on the I-kappa-B proteins by kinases (IKBKA, MIM 600664 or IKBKB, MIM 603258) marks them for destruction via the ubiquitination pathway, thereby allowing activation of the NF-kappa-B complex. Activated NFKB complex translocates into the nucleus and binds DNA at kappa-B-binding motifs such as 5-prime GGGRRNYYCC 3-prime or 5-prime HGGARNYYCC 3-prime (where H is A, C, or T; R is an A or G purine; and Y is a C or T pyrimidine).
NFKBIE	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	IKBE	NFKB1 (MIM 164011) or NFKB2 (MIM 164012) is bound to REL (MIM 164910), RELA (MIM 164014), or RELB (MIM 604758) to form the NFKB complex. The NFKB complex is inhibited by I-kappa-B proteins (NFKBIA, MIM 164008 or NFKBIB, MIM 604495), which inactivate NF-kappa-B by trapping it in the cytoplasm. Phosphorylation of serine residues on the I-kappa-B proteins by kinases (IKBKA, MIM 600664, or IKBKB, MIM 603258) marks them for destruction via the ubiquitination pathway, thereby allowing activation of the NF-kappa-B complex. Activated NFKB complex translocates into the nucleus and binds DNA at kappa-B-binding motifs such as 5-prime GGGRRNYYCC 3-prime or 5-prime HGGARNYYCC 3-prime (where H is A, C, or T; R is an A or G purine; and Y is a C or T pyrimidine). For some genes, activation requires NFKB interaction with other transcription factors, such as STAT (see STAT6, MIM 601512), AP1 (JUN, MIM 165160), and NFAT (see NFATC1, MIM 600489).
NFKBIZ	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	IKBZ; INAP; MAIL; FLJ30225; FLJ34463	This gene is a member of the ankyrin-repeat family and is induced by lipopolysaccharide (LPS). The C-terminal portion of the encoded product which contains the ankyrin repeats, shares high sequence similarity with the I kappa B family of proteins. The latter are known to play a role in inflammatory responses to LPS by their interaction with NF-B proteins through ankyrin-repeat domains. Two transcript variants encoding different isoforms have been found for this gene.
PEA15	phosphoprotein enriched in astrocytes 15	PED; MAT1; HMAT1; MAT1H; PEA-15; HUMMAT1H	PEA15 is a death effector domain (DED)-containing protein predominantly expressed in the central nervous system, particularly in astrocytes.
PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	APR; NOXA	The protein encoded by this gene promotes activation of caspases and apoptosis, promotes mitochondrial membrane changes and efflux of apoptogenic proteins from the mitochondria, contributes to p53-dependent apoptosis after radiation exposure, promotes proteasomal degradation of MCL1, competes with BAK1 for binding to MCL1 and can displace BAK1 from its binding site on MCL1, competes with BIM/BCL2L11 for binding to MCL1 and can displace BIM/BCL2L11 from its binding site on MCL1.
PYCARD	PYD and CARD domain containing	ASC; TMS; TMS1; CARD5; MGC10332	This gene encodes an adaptor protein that is composed of two protein-protein interaction domains: a N-terminal PYRIN-PAAD-DAPIN domain (PYD) and a C-terminal caspase-recruitment domain (CARD). The PYD and CARD domains are members of the six-helix bundle death domain-fold superfamily that mediates assembly of large signaling complexes in the inflammatory and apoptotic signaling pathways via the activation of caspase. In normal cells, this protein is localized to the cytoplasm; however, in cells undergoing apoptosis, it forms ball-like aggregates near the nuclear periphery. Two transcript variants encoding different isoforms have been found for this gene.

REL	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)	C-Rel	The REL gene encodes c-Rel, a transcription factor that is a member of the Rel/NFKB family, which also includes RELA (MIM 164014), RELB (604758), NFKB1 (MIM 164011), and NFKB2 (MIM 164012). These proteins are related through a highly conserved N-terminal region termed the 'Rel domain,' which is responsible for DNA binding, dimerization, nuclear localization, and binding to the NFKB inhibitor.
RELA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	p65; NFKB3; MGC131774	NFKB1 (MIM 164011) or NFKB2 (MIM 164012) is bound to REL (MIM 164910), RELA, or RELB (MIM 604758) to form the NFKB complex. The p50 (NFKB1)/p65 (RELA) heterodimer is the most abundant form of NFKB. The NFKB complex is inhibited by I-kappa-B proteins (NFKBIA, MIM 164008 or NFKBIB, MIM 604495), which inactivate NFKB by trapping it in the cytoplasm. Phosphorylation of serine residues on the I-kappa-B proteins by kinases (IKBKA, MIM 600664, or IKBKB, MIM 603258) marks them for destruction via the ubiquitination pathway, thereby allowing activation of the NFKB complex. Activated NFKB complex translocates into the nucleus and binds DNA at kappa-B-binding motifs such as 5-prime GGGRNNYYCC 3-prime or 5-prime HGGARNYYCC 3-prime (where H is A, C, or T; R is an A or G purine; and Y is a C or T pyrimidine).
RELB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	IREL; I-REL	NF-kappa-B is a pleiotropic transcription factor which is present in almost all cell types and is involved in many biological processes such as inflammation, immunity, differentiation, cell growth, tumorigenesis and apoptosis. NF-kappa-B is a homo- or heterodimeric complex formed by the Rel-like domain-containing proteins RELA/p65, RELB, NFKB1/p105, NFKB1/p50, REL and NFKB2/p52. The dimers bind at kappa-B sites in the DNA of their target genes and the individual dimers have distinct preferences for different kappa-B sites that they can bind with distinguishable affinity and specificity. Different dimer combinations act as transcriptional activators or repressors, respectively. NF-kappa-B is controlled by various mechanisms of post-translational modification and subcellular compartmentalization as well as by interactions with other cofactors or corepressors. NF-kappa-B complexes are held in the cytoplasm in an inactive state complexed with members of the NF-kappa-B inhibitor (I-kappa-B) family. In a conventional activation pathway, I-kappa-B is phosphorylated by I-kappa-B kinases (IKKs) in response to different activators, subsequently degraded thus liberating the
RIPK1	receptor (TNFRSF)- interacting serine- threonine kinase 1	RIP; RIP1; FLJ39204	The protein encoded by this gene promotes apoptosis and activation of NF-kappa-B and is required for TNFRSF1A mediated activation of NF-kappa-B.
RIPK2	receptor- interacting serine- threonine kinase 2	CCK; RICK; RIP2; CARD3; GIG30; CARDIAK	This gene encodes a member of the receptor-interacting protein (RIP) family of serine/threonine protein kinases. The encoded protein contains a C-terminal caspase activation and recruitment domain (CARD), and is a component of signaling complexes in both the innate and adaptive immune pathways. It is a potent activator of NF-kappaB and inducer of apoptosis in response to various stimuli.
TA-NFKBH	T-cell activation NFKB-like protein		
TBK1	TANK-binding kinase 1	NAK; T2K; FLJ11330	The NF-kappa-B (NFKB) complex of proteins is inhibited by I-kappa-B (IKB) proteins, which inactivate NFKB by trapping it in the cytoplasm. Phosphorylation of serine residues on the IKB proteins by IKB kinases marks them for destruction via the ubiquitination pathway, thereby allowing activation and nuclear translocation of the NFKB complex. The protein encoded by this gene is similar to IKB kinases and can mediate NFKB activation in response to certain growth factors. For example, the protein can form a complex with the IKB protein TANK and TRAF2 and release the NFKB inhibition caused by TANK.
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	DIF; TNFA; TNFSF2; TNF-alpha	This gene encodes a multifunctional proinflammatory cytokine that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) superfamily. This cytokine is mainly secreted by macrophages. It can bind to, and thus functions through its receptors TNFRSF1A/TNFR1 and TNFRSF1B/TNFR. This cytokine is involved in the regulation of a wide spectrum of biological processes including cell proliferation, differentiation, apoptosis, lipid metabolism, and coagulation.
TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	DR4; APO2; CD261; MGC9365; TRAILR1; TRAILR-1	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. This receptor is activated by tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TNFSF10/TRAIL), and thus transduces cell death signal and induces cell apoptosis. Studies with FADD-deficient mice suggested that FADD, a death domain containing adaptor protein, is required for the apoptosis mediated by this protein.
TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	DR5; CD262; KILLER; TRICK2; TRICKB; ZTNFR9; TRAILR2; TRICK2A; TRICK2B; TRAIL-R2; KILLER/DR5	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily, and contains an intracellular death domain. This receptor can be activated by tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TNFSF10/TRAIL/APO-2L), and transduces apoptosis signal. Studies with FADD-deficient mice suggested that FADD, a death domain containing adaptor protein, is required for the apoptosis mediated by this protein.

TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	FPF; p55; p60; TBP1; TNF-R; TNFAR; TNFR1; p55-R; CD120a; TNFR55; TNFR60; TNF-R-I; TNF-R55; MGC19588	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. This protein is one of the major receptors for the tumor necrosis factor-alpha. This receptor can activate NF-kappaB, mediate apoptosis, and function as a regulator of inflammation. Antiapoptotic protein BCL2-associated athanogene 4 (BAG4/SODD) and adaptor proteins TRADD and TRAF2 have been shown to interact with this receptor, and thus play regulatory roles in the signal transduction mediated by the receptor.
TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	p75; TBPII; TNFBR; TNFR2; CD120b; TNFR80; TNF-R75; p75TNFR; TNF-R-II	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. This protein and TNF-receptor 1 form a heterocomplex that mediates the recruitment of two anti-apoptotic proteins, c-IAP1 and c-IAP2, which possess E3 ubiquitin ligase activity. The function of IAPs in TNF-receptor signalling is unknown, however, c-IAP1 is thought to potentiate TNF-induced apoptosis by the ubiquitination and degradation of TNF-receptor-associated factor 2, which mediates anti-apoptotic signals. Knockout studies in mice also suggest a role of this protein in protecting neurons from apoptosis by stimulating antioxidative pathways.
TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	DR6; BM-018; MGC31965	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. This receptor has been shown to activate NF-kappaB and MAPK8/JNK, and induce cell apoptosis. Through its death domain, this receptor interacts with TRADD protein, which is known to serve as an adaptor that mediates signal transduction of TNF-receptors.
TNFRSF25	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	DR3; TR3; DDR3; LARD; APO-3; TRAMP; WSL-1; WSL-LR; TNFRSF12	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. This receptor is expressed preferentially in the tissues enriched in lymphocytes, and it may play a role in regulating lymphocyte homeostasis. This receptor has been shown to stimulate NF-kappa B activity and regulate cell apoptosis. The signal transduction of this receptor is mediated by various death domain containing adaptor proteins. Multiple alternatively spliced transcript variants of this gene encoding distinct isoforms have been reported, most of which are potentially secreted molecules. The alternative splicing of this gene in B and T cells encounters a programmed change upon T-cell activation, which predominantly produces full-length, membrane bound isoforms, and is thought to be involved in controlling lymphocyte proliferation induced by T-cell activation.
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TL2; APO2L; CD253; TRAIL; Apo-2L	The protein encoded by this gene is a cytokine that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) ligand family. This protein preferentially induces apoptosis in transformed and tumor cells, but does not appear to kill normal cells although it is expressed at a significant level in most normal tissues. This protein binds to several members of TNF receptor superfamily including TNFRSF10A/TRAILR1, TNFRSF10B/TRAILR2, TNFRSF10C/TRAILR3, TNFRSF10D/TRAILR4, and possibly also to TNFRSF11B/OPG. The activity of this protein may be modulated by binding to the decoy receptors TNFRSF10C/TRAILR3, TNFRSF10D/TRAILR4, and TNFRSF11B/OPG that cannot induce apoptosis. The binding of this protein to its receptors has been shown to trigger the activation of MAPK8/JNK, caspase 8, and caspase 3.
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain	Hs.89862; MGC11078	The protein encoded by this gene is a death domain containing adaptor molecule that interacts with TNFRSF1A/TNFR1 and mediates programmed cell death signaling and NF-kappaB activation. This protein binds adaptor protein TRAF2, reduces the recruitment of inhibitor-of-apoptosis proteins (IAPs) by TRAF2, and thus suppresses TRAF2 mediated apoptosis. This protein can also interact with receptor TNFRSF6/FAS and adaptor protein FADD/MORT1, and is involved in the Fas-induced cell death pathway.

Annexe 2 : Valeurs Ct (Cycle treshold) et FI (Fold d'induction) obtenues pour les gènes à l'aide des cartes microfluidiques dans les différentes conditions

Gène	Conditions	FI	Ct	Gène	Conditions	FI	Ct
18S	N ctl		11,337846	BBC3	N ctl	1	29,94678
18S	N ctl si		10,913809	BBC3	N ctl si	1,1769757	29,287657
18S	N ctl RF		10,870314	BBC3	N ctl RF	1,103253	29,337482
18S	H ctl		10,811282	BBC3	H ctl	1,2147944	29,139502
18S	H ctl si		10,710135	BBC3	H ctl si	2,0560007	28,279226
18S	H ctl RF		10,735668	BBC3	H ctl RF	1,3023101	28,963528
18S	N tax		10,64417	BBC3	N tax	1,583889	28,58963
18S	N tax si		10,144368	BBC3	N tax si	1,86447	27,854536
18S	N tax RF		10,646009	BBC3	N tax RF	1,967917	28,278273
18S	H tax		11,031573	BBC3	H tax	3,3692737	27,888067
18S	H tax si		10,573875	BBC3	H tax si	2,5791192	27,81593
18S	H tax RF		10,562221	BBC3	H tax RF	2,381605	27,919218
ACTB	N ctl	1	18,922821	BCAP31	N ctl	1	24,091413
ACTB	N ctl si	0,7588957	18,89681	BCAP31	N ctl si	1,094657	23,536898
ACTB	N ctl RF	1,0026801	18,451427	BCAP31	N ctl RF	0,8532458	23,852848
ACTB	H ctl	0,5410795	19,282345	BCAP31	H ctl	0,81410086	23,86157
ACTB	H ctl si	0,826267	18,57043	BCAP31	H ctl si	0,7037456	23,970577
ACTB	H ctl RF	0,6805107	18,875954	BCAP31	H ctl RF	0,85497797	23,715277
ACTB	N tax	0,683963	18,777155	BCAP31	N tax	0,74044937	23,831264
ACTB	N tax si	0,53379387	18,634989	BCAP31	N tax si	0,6221508	23,5826
ACTB	N tax RF	0,51673955	19,183475	BCAP31	N tax RF	0,71659833	23,88034
ACTB	H tax	0,456474	19,747944	BCAP31	H tax	0,7749297	24,153004
ACTB	H tax si	0,4167021	19,421762	BCAP31	H tax si	0,60034496	24,06358
ACTB	H tax RF	0,4263232	19,377176	BCAP31	H tax RF	0,718803	23,79212
APAF1	N ctl	1	28,15471	BCL10	N ctl	1	26,54882
APAF1	N ctl si	1,3377419	27,310873	BCL10	N ctl si	0,82889456	26,395523
APAF1	N ctl RF	0,9210866	27,805769	BCL10	N ctl RF	0,86006606	26,298769
APAF1	H ctl	1,0446632	27,565107	BCL10	H ctl	1,2206658	25,734589
APAF1	H ctl si	1,2650675	27,187784	BCL10	H ctl si	0,5859879	26,692167
APAF1	H ctl RF	1,2591157	27,220121	BCL10	H ctl RF	0,93836135	26,038427
APAF1	N tax	0,7411555	27,893187	BCL10	N tax	0,9754359	25,891026
APAF1	N tax si	0,62331575	27,643196	BCL10	N tax si	0,92842335	25,462488
APAF1	N tax RF	0,49307904	28,482983	BCL10	N tax RF	0,8443761	26,101027
APAF1	H tax	1,1326535	27,668732	BCL10	H tax	1,0406753	26,185028
APAF1	H tax si	0,6752808	27,95718	BCL10	H tax si	0,84218425	26,032642
APAF1	H tax RF	1,0369191	27,32678	BCL10	H tax RF	1,7551194	24,961626
BAD	N ctl	1	28,323088	BCL2	N ctl	1	30,96439
BAD	N ctl si	0,7550023	28,304497	BCL2	N ctl si	0,9671802	30,588497
BAD	N ctl RF	0,6891248	28,392717	BCL2	N ctl RF	0,80728006	30,805717
BAD	H ctl	0,53213024	28,70667	BCL2	H ctl	0,15886055	33,091995
BAD	H ctl si	0,63074	28,36026	BCL2	H ctl si	0,64070445	30,978949
BAD	H ctl RF	0,6115566	28,430351	BCL2	H ctl RF	0,35701466	31,848158
BAD	N tax	0,41528067	28,897253	BCL2	N tax	0,5152602	31,22734
BAD	N tax si	0,62746304	27,802008	BCL2	N tax si	0,30457434	31,486046
BAD	N tax RF	0,4835038	28,679651	BCL2	N tax RF	0,42240438	31,515858
BAD	H tax	0,46833134	29,111214	BCL2	H tax	0,25379175	32,636402
BAD	H tax si	0,41301227	28,83486	BCL2	H tax si	0,23626472	32,281944
BAD	H tax RF	0,3709346	28,978226	BCL2	H tax RF	0,2703392	32,075924

BAK1	N ctl	1	27,422237	BCL2L10	N ctl		Undetermined
BAK1	N ctl si	1,098395	26,862804	BCL2L10	N ctl si		Undetermined
BAK1	N ctl RF	0,9139528	27,084515	BCL2L10	N ctl RF		Undetermined
BAK1	H ctl	0,4715322	27,980247	BCL2L10	H ctl		Undetermined
BAK1	H ctl si	0,72960764	27,249336	BCL2L10	H ctl si		Undetermined
BAK1	H ctl RF	0,58341765	27,59746	BCL2L10	H ctl RF		Undetermined
BAK1	N tax	1,0056081	26,720495	BCL2L10	N tax		Undetermined
BAK1	N tax si	0,74432725	26,654753	BCL2L10	N tax si		Undetermined
BAK1	N tax RF	0,9688721	26,776024	BCL2L10	N tax RF		Undetermined
BAK1	H tax	0,6933047	27,644403	BCL2L10	H tax		Undetermined
BAK1	H tax si	0,80691725	26,967775	BCL2L10	H tax si		Undetermined
BAK1	H tax RF	0,6298034	27,31364	BCL2L10	H tax RF		Undetermined
BAX	N ctl	1	25,496058	BID	N ctl	1	27,945744
BAX	N ctl si	1,0479548	25,004444	BID	N ctl si	0,8102322	27,8253
BAX	N ctl RF	0,9859684	25,048912	BID	N ctl RF	0,8975088	27,634214
BAX	H ctl	0,5428766	25,850798	BID	H ctl	0,83469594	27,679857
BAX	H ctl si	0,67110664	25,443733	BID	H ctl si	0,640984	27,959673
BAX	H ctl RF	0,65455186	25,5053	BID	H ctl RF	0,9817209	27,370182
BAX	N tax	0,77691364	25,166555	BID	N tax	0,32280105	28,883352
BAX	N tax si	0,590554	25,062439	BID	N tax si	0,23974922	28,812668
BAX	N tax RF	0,6870139	25,34581	BID	N tax RF	0,3513396	28,76297
BAX	H tax	0,5780968	25,980402	BID	H tax	0,27288586	29,513103
BAX	H tax si	0,6209236	25,4196	BID	H tax si	0,29404014	28,94769
BAX	H tax RF	0,59513205	25,46915	BID	H tax RF	0,4035616	28,47926
BCL2L11	N ctl	1	28,952215	BIK	N ctl	1	32,798668
BCL2L11	N ctl si	1,1638156	28,309315	BIK	N ctl si	1,7636304	31,556084
BCL2L11	N ctl RF	0,94123214	28,57206	BIK	N ctl RF	1,2874525	31,966618
BCL2L11	H ctl	0,65622455	29,033388	BIK	H ctl	0,6607253	32,869984
BCL2L11	H ctl si	0,5586302	29,16454	BIK	H ctl si	1,8502572	31,283234
BCL2L11	H ctl RF	0,51874065	29,296951	BIK	H ctl RF	1,2465525	31,878548
BCL2L11	N tax	1,1114205	28,106133	BIK	N tax	2,1240683	31,018164
BCL2L11	N tax si	0,8009154	28,079014	BIK	N tax si	1,6727058	30,863008
BCL2L11	N tax RF	0,94054794	28,348804	BIK	N tax RF	2,1943054	30,973068
BCL2L11	H tax	1,0662688	28,55337	BIK	H tax	2,9411829	30,936
BCL2L11	H tax si	1,1797878	27,949717	BIK	H tax si	2,8124864	30,542852
BCL2L11	H tax RF	1,377652	27,714378	BIK	H tax RF	3,7475524	30,117094
BCL2L13	N ctl	1	29,41136	BIRC1	N ctl	1	31,871603
BCL2L13	N ctl si	0,9557137	29,052671	BIRC1	N ctl si	1,5390191	30,825554
BCL2L13	N ctl RF	0,7265649	29,404663	BIRC1	N ctl RF	1,3947101	30,924105
BCL2L13	H ctl	0,45415467	30,02354	BIRC1	H ctl	1,4515265	30,807468
BCL2L13	H ctl si	0,95197344	28,854654	BIRC1	H ctl si	0,84095865	31,493784
BCL2L13	H ctl RF	0,86188215	29,023619	BIRC1	H ctl RF	0,98169106	31,296083
BCL2L13	N tax	1,2409486	28,406239	BIRC1	N tax	1,4476782	30,644184
BCL2L13	N tax si	0,7161726	28,699501	BIRC1	N tax si	1,0123123	30,660471
BCL2L13	N tax RF	0,89435333	28,880606	BIRC1	N tax RF	1,2267601	30,884912
BCL2L13	H tax	1,0258254	29,068302	BIRC1	H tax	0,7343456	32,0108
BCL2L13	H tax si	0,8169127	28,939135	BIRC1	H tax si	0,56542826	31,930216
BCL2L13	H tax RF	0,8180248	28,925516	BIRC1	H tax RF	2,0083518	30,089964

BCL2L1	N ctl	1	24,672424	BIRC2	N ctl	1	27,08397
BCL2L1	N ctl si	0,375862	25,660112	BIRC2	N ctl si	1,0353308	26,60984
BCL2L1	N ctl RF	0,7182041	24,682426	BIRC2	N ctl RF	1,5916548	25,94591
BCL2L1	H ctl	0,32292056	25,77661	BIRC2	H ctl	1,1101795	26,406612
BCL2L1	H ctl si	0,19916041	26,372711	BIRC2	H ctl si	1,0498247	26,38611
BCL2L1	H ctl RF	0,4111488	25,352514	BIRC2	H ctl RF	1,7030612	25,713661
BCL2L1	N tax	0,4177388	25,238075	BIRC2	N tax	1,96895	25,412867
BCL2L1	N tax si	0,24342541	25,517395	BIRC2	N tax si	0,9442396	25,973267
BCL2L1	N tax RF	0,23369542	26,077887	BIRC2	N tax RF	0,772074	26,765322
BCL2L1	H tax	0,32610565	25,98274	BIRC2	H tax	1,4106432	26,281343
BCL2L1	H tax si	0,15318261	26,61513	BIRC2	H tax si	1,2027394	26,053675
BCL2L1	H tax RF	0,31076628	25,582897	BIRC2	H tax RF	1,8683144	25,406607
BCL2L2	N ctl	1	27,419884	BIRC3	N ctl	1	30,647135
BCL2L2	N ctl si	0,9342276	27,094002	BIRC3	N ctl si	2,9840121	28,645844
BCL2L2	N ctl RF	0,8494825	27,187696	BIRC3	N ctl RF	1,9586998	29,209705
BCL2L2	H ctl	0,42166397	28,139154	BIRC3	H ctl	0,7395757	30,555801
BCL2L2	H ctl si	0,6291509	27,460695	BIRC3	H ctl si	2,28629	28,826414
BCL2L2	H ctl RF	0,54649806	27,689419	BIRC3	H ctl RF	1,6874901	29,290077
BCL2L2	N tax	1,5863482	26,0605	BIRC3	N tax	1,5801911	29,293358
BCL2L2	N tax si	1,1975145	25,966364	BIRC3	N tax si	1,9877056	28,462553
BCL2L2	N tax RF	1,5241286	26,120064	BIRC3	N tax RF	1,0156288	29,932924
BCL2L2	H tax	1,0280275	27,073732	BIRC3	H tax	1,4650841	29,789877
BCL2L2	H tax si	0,7903536	26,995344	BIRC3	H tax si	1,8534768	28,99293
BCL2L2	H tax RF	1,0943531	26,514181	BIRC3	H tax RF	1,6729181	29,129143
BCL3	N ctl	1	26,262747	BIRC4	N ctl	1	27,899519
BCL3	N ctl si	1,0951086	25,707636	BIRC4	N ctl si	0,7244059	27,94061
BCL3	N ctl RF	0,7974093	26,121822	BIRC4	N ctl RF	0,8779833	27,61972
BCL3	H ctl	0,48561722	26,778292	BIRC4	H ctl	0,52948743	28,290285
BCL3	H ctl si	1,1378992	25,448664	BIRC4	H ctl si	0,6500334	27,89322
BCL3	H ctl RF	0,6256618	26,337114	BIRC4	H ctl RF	0,7452272	27,721588
BCL3	N tax	0,29470506	27,331728	BIRC4	N tax	1,063352	27,117224
BCL3	N tax si	0,28798246	26,865217	BIRC4	N tax si	0,41497004	27,974962
BCL3	N tax RF	0,29224905	27,34564	BIRC4	N tax RF	0,6189569	27,89977
BCL3	H tax	0,23815466	28,026503	BIRC4	H tax	0,83589524	27,85185
BCL3	H tax si	0,3975756	26,829475	BIRC4	H tax si	0,49792075	28,14156
BCL3	H tax RF	0,26264864	27,415916	BIRC4	H tax RF	0,7209701	27,59588
BIRC5	N ctl	1	24,993294	BOK	N ctl	1	27,974102
BIRC5	N ctl si	1,0133333	24,550148	BOK	N ctl si	0,84534395	27,792456
BIRC5	N ctl RF	0,8666176	24,732294	BOK	N ctl RF	0,74535626	27,930569
BIRC5	H ctl	0,4422819	25,643692	BOK	H ctl	0,65258914	28,063292
BIRC5	H ctl si	0,5519789	25,222898	BOK	H ctl si	0,69358706	27,874243
BIRC5	H ctl RF	0,59034365	25,15149	BOK	H ctl RF	0,6514142	27,990278
BIRC5	N tax	0,82306707	24,580536	BOK	N tax	0,784699	27,630217
BIRC5	N tax si	0,5123691	24,76456	BOK	N tax si	0,7164529	27,26168
BIRC5	N tax RF	0,6723148	24,874249	BOK	N tax RF	0,7854692	27,63064
BIRC5	H tax	0,6570719	25,292898	BOK	H tax	0,57930946	28,455423
BIRC5	H tax si	0,6215494	24,915382	BOK	H tax si	0,43227232	28,42012
BIRC5	H tax RF	0,6040115	24,94502	BOK	H tax RF	0,71179837	27,688938

BIRC6	N ctl	1	27,380716	CARD4	N ctl	1	30,719938
BIRC6	N ctl si	0,8532136	27,1857	CARD4	N ctl si	1,3768237	29,834557
BIRC6	N ctl RF	0,8200996	27,199312	CARD4	N ctl RF	1,8287371	29,381557
BIRC6	H ctl	0,50397134	27,842737	CARD4	H ctl	0,27980372	32,030888
BIRC6	H ctl si	0,58743846	27,520496	CARD4	H ctl si	0,6799518	30,648722
BIRC6	H ctl RF	0,6777404	27,339733	CARD4	H ctl RF	0,3947742	31,45866
BIRC6	N tax	0,72995305	27,141165	CARD4	N tax	0,89868665	30,18037
BIRC6	N tax si	0,56759953	27,004293	CARD4	N tax si	0,73642033	29,96786
BIRC6	N tax RF	0,42123884	27,936169	CARD4	N tax RF	0,71483785	30,512413
BIRC6	H tax	0,49127856	28,099829	CARD4	H tax	0,39674988	31,747362
BIRC6	H tax si	0,40173358	27,932434	CARD4	H tax si	0,51417893	30,915625
BIRC6	H tax RF	0,48742142	27,64185	CARD4	H tax RF	0,47761938	31,010378
BIRC8	N ctl	1	31,982365	CARD6	N ctl	1	28,72152
BIRC8	N ctl si	0,9354103	31,654657	CARD6	N ctl si	0,6927742	28,827026
BIRC8	N ctl RF	0,53545773	32,41599	CARD6	N ctl RF	1,1386546	28,066658
BIRC8	H ctl	0,32965848	33,05676	CARD6	H ctl	0,09829093	31,541756
BIRC8	H ctl si	0,701416	31,866314	CARD6	H ctl si	0,1815848	30,555094
BIRC8	H ctl RF	0,7632328	31,769993	CARD6	H ctl RF	4165,9487	16,094913
BIRC8	N tax	0,98988473	31,303356	CARD6	N tax	0,32711434	29,639978
BIRC8	N tax si	0,6849719	31,33477	CARD6	N tax si	0,76696736	27,910807
BIRC8	N tax RF	0,6891257	31,82769	CARD6	N tax RF	0,25958198	29,975422
BIRC8	H tax	0,6618251	32,271572	CARD6	H tax	0,2505877	30,41186
BIRC8	H tax si	0,75824434	31,61766	CARD6	H tax si	0,22252199	30,12553
BIRC8	H tax RF	0,82337177	31,487123	CARD6	H tax RF	1,1174436	27,785692
BNIP3	N ctl	1	26,206192	CASP10	N ctl	1	30,60377
BNIP3	N ctl si	0,90761375	25,922005	CASP10	N ctl si	1,3580225	29,738224
BNIP3	N ctl RF	1,1004277	25,600595	CASP10	N ctl RF	1,5236651	29,52869
BNIP3	H ctl	9,69637	22,402184	CASP10	H ctl	0,4805939	31,134315
BNIP3	H ctl si	0,7426847	26,00766	CASP10	H ctl si	0,752723	30,385868
BNIP3	H ctl RF	10,11537	22,265537	CASP10	H ctl RF	0,7226783	30,470165
BNIP3	N tax	1,2182587	25,227695	CASP10	N tax	1,5869073	29,243874
BNIP3	N tax si	0,6786693	25,571934	CASP10	N tax si	0,92838776	29,517492
BNIP3	N tax RF	0,73602563	25,956528	CASP10	N tax RF	0,94095963	29,999727
BNIP3	H tax	9,641328	22,630688	CASP10	H tax	0,79656684	30,62563
BNIP3	H tax si	0,65978825	26,042147	CASP10	H tax si	0,9233959	29,954777
BNIP3	H tax RF	9,955492	22,115074	CASP10	H tax RF	0,6573812	30,433342
BNIP3L	N ctl	1	25,909317	CASP6	N ctl	1	26,951601
BNIP3L	N ctl si	0,6061894	26,20744	CASP6	N ctl si	1,1075313	26,380217
BNIP3L	N ctl RF	0,74467814	25,867096	CASP6	N ctl RF	1,1560767	26,274832
BNIP3L	H ctl	2,5726352	24,019506	CASP6	H ctl	0,3929374	27,772665
BNIP3L	H ctl si	0,8248339	25,559431	CASP6	H ctl si	0,6757599	26,889307
BNIP3L	H ctl RF	3,1130722	23,6688	CASP6	H ctl RF	0,4123507	27,62748
BNIP3L	N tax	0,73085976	25,667974	CASP6	N tax	0,62157816	26,943916
BNIP3L	N tax si	0,3846856	26,094088	CASP6	N tax si	0,5001841	26,757591
BNIP3L	N tax RF	0,5050889	26,202871	CASP6	N tax RF	0,31139368	27,942953
BNIP3L	H tax	1,7451562	24,799688	CASP6	H tax	0,29467002	28,408157
BNIP3L	H tax si	0,47209266	26,228205	CASP6	H tax si	0,3906376	27,543728
BNIP3L	H tax RF	1,6810726	24,38431	CASP6	H tax RF	0,36619765	27,62528

CASP1	N ctl	1	32,246735	CASP7	N ctl	1	27,958933
CASP1	N ctl si	0,17039092	34,37578	CASP7	N ctl si	0,5743244	28,334957
CASP1	N ctl RF	0,8972715	31,935587	CASP7	N ctl RF	0,97307235	27,53078
CASP1	H ctl	0,00321754	Undetermined	CASP7	H ctl	0,50204813	28,426472
CASP1	H ctl si	0,16746818	34,197067	CASP7	H ctl si	0,42508167	28,565409
CASP1	H ctl RF	0,2635013	33,568676	CASP7	H ctl RF	0,70814615	27,854635
CASP1	N tax	0,45306322	32,695274	CASP7	N tax	0,9294242	27,370848
CASP1	N tax si	0,1151614	34,171528	CASP7	N tax si	0,40046513	28,085707
CASP1	N tax RF	0,13986099	34,392834	CASP7	N tax RF	0,66322833	27,859518
CASP1	H tax	0,00374833	Undetermined	CASP7	H tax	0,58111364	28,435768
CASP1	H tax si	0,02358051	36,889027	CASP7	H tax si	0,38729224	28,563467
CASP1	H tax RF	0,1414006	34,29325	CASP7	H tax RF	0,58863723	27,947855
CASP2	N ctl	1	25,921518	CASP8AP2	N ctl	1	29,363464
CASP2	N ctl si	0,95107585	25,569849	CASP8AP2	N ctl si	0,71921456	29,414934
CASP2	N ctl RF	0,93930346	25,544323	CASP8AP2	N ctl RF	0,80786407	29,203749
CASP2	H ctl	0,34588256	26,926601	CASP8AP2	H ctl	0,4148033	30,106401
CASP2	H ctl si	0,6267989	25,967733	CASP8AP2	H ctl si	0,44280788	29,911001
CASP2	H ctl RF	0,54217976	26,202497	CASP8AP2	H ctl RF	0,5049657	29,74703
CASP2	N tax	0,48871258	26,260784	CASP8AP2	N tax	0,48625	29,710018
CASP2	N tax si	0,3885549	26,09185	CASP8AP2	N tax si	0,23596068	30,25337
CASP2	N tax RF	0,30219287	26,95614	CASP8AP2	N tax RF	0,23543935	30,758202
CASP2	H tax	0,28623793	27,41996	CASP8AP2	H tax	0,32304356	30,687393
CASP2	H tax si	0,3570975	26,643158	CASP8AP2	H tax si	0,21176279	30,838974
CASP2	H tax RF	0,292205	26,920841	CASP8AP2	H tax RF	0,24629746	30,609365
CASP3	N ctl	1	26,745913	CASP8	N ctl	1	27,876137
CASP3	N ctl si	1,2387594	26,01298	CASP8	N ctl si	0,8568921	27,674915
CASP3	N ctl RF	0,8188553	26,5667	CASP8	N ctl RF	0,83587754	27,667242
CASP3	H ctl	0,38757885	27,586786	CASP8	H ctl	0,472402	28,431486
CASP3	H ctl si	0,9454313	26,199158	CASP8	H ctl si	0,67226285	27,821331
CASP3	H ctl RF	0,43576995	27,342096	CASP8	H ctl RF	0,62357295	27,95533
CASP3	N tax	0,9087466	26,190287	CASP8	N tax	0,7605877	27,577274
CASP3	N tax si	0,82846344	25,823925	CASP8	N tax si	0,46291667	27,793837
CASP3	N tax RF	0,5580865	26,895515	CASP8	N tax RF	0,5079413	28,161568
CASP3	H tax	0,67047966	27,016375	CASP8	H tax	0,4694571	28,660799
CASP3	H tax si	0,7335902	26,428896	CASP8	H tax si	0,5936421	27,864502
CASP3	H tax RF	0,6469183	26,598633	CASP8	H tax RF	0,46038744	28,219593
CASP4	N ctl	1	29,192974	CASP9	N ctl	1	25,481249
CASP4	N ctl si	0,71801275	29,246857	CASP9	N ctl si	1,0133829	25,038033
CASP4	N ctl RF	1,1330204	28,545269	CASP9	N ctl RF	3,08E-05	Undetermined
CASP4	H ctl	0,43484712	29,867832	CASP9	H ctl	0,48843485	25,988447
CASP4	H ctl si	0,43342483	29,77141	CASP9	H ctl si	0,51659715	25,806427
CASP4	H ctl RF	0,7574067	28,991657	CASP9	H ctl RF	0,47085536	25,965715
CASP4	N tax	2,6000237	27,120773	CASP9	N tax	0,55076516	25,648064
CASP4	N tax si	1,2269386	27,704433	CASP9	N tax si	0,44410297	25,458805
CASP4	N tax RF	1,5098629	27,906721	CASP9	N tax RF	0,44880453	25,945253
CASP4	H tax	1,3670527	28,435635	CASP9	H tax	0,7587357	25,573307
CASP4	H tax si	0,9705721	28,472097	CASP9	H tax si	0,5142479	25,676743
CASP4	H tax RF	1,3724674	27,960579	CASP9	H tax RF	0,47838467	25,76938

CASP5	N ctl	Undetermined	CFLAR	N ctl	1	28,40193	
CASP5	N ctl si	Undetermined	CFLAR	N ctl si	0,78416806	28,328657	
CASP5	N ctl RF	Undetermined	CFLAR	N ctl RF	1,0753675	27,829567	
CASP5	H ctl	Undetermined	CFLAR	H ctl	0,46181393	28,98998	
CASP5	H ctl si	Undetermined	CFLAR	H ctl si	0,4623613	28,887125	
CASP5	H ctl RF	Undetermined	CFLAR	H ctl RF	0,77289665	28,171404	
CASP5	N tax	Undetermined	CFLAR	N tax	0,96865565	27,754196	
CASP5	N tax si	Undetermined	CFLAR	N tax si	0,42216152	28,452583	
CASP5	N tax RF	Undetermined	CFLAR	N tax RF	0,6704034	28,286991	
CASP5	H tax	Undetermined	CFLAR	H tax	0,77144396	28,470024	
CASP5	H tax si	Undetermined	CFLAR	H tax si	0,3814434	29,028418	
CASP5	H tax RF	Undetermined	CFLAR	H tax RF	0,8194146	27,91364	
CHUK	N ctl	1	28,099298	ESRRBL1	N ctl	1	28,097849
CHUK	N ctl si	1,2212534	27,386898	ESRRBL1	N ctl si	0,94719654	27,752075
CHUK	N ctl RF	0,99127686	27,644405	ESRRBL1	N ctl RF	0,6767644	28,19359
CHUK	H ctl	0,34134775	29,123419	ESRRBL1	H ctl	0,47247946	28,652962
CHUK	H ctl si	0,7697385	27,849146	ESRRBL1	H ctl si	0,8018329	27,788765
CHUK	H ctl RF	0,43703955	28,691284	ESRRBL1	H ctl RF	0,7958132	27,825169
CHUK	N tax	0,86244863	27,61911	ESRRBL1	N tax	0,58907634	28,167646
CHUK	N tax si	0,56908727	27,719097	ESRRBL1	N tax si	0,32717663	28,51623
CHUK	N tax RF	0,3637669	28,866375	ESRRBL1	N tax RF	0,3526277	28,909794
CHUK	H tax	0,43845165	28,982534	ESRRBL1	H tax	0,38544977	29,166962
CHUK	H tax si	0,68964434	27,871403	ESRRBL1	H tax si	0,32678455	28,947466
CHUK	H tax RF	0,3904453	28,68048	ESRRBL1	H tax RF	0,3288662	28,926651
CRADD	N ctl	1	29,62446	FADD	N ctl	1	28,04243
CRADD	N ctl si	0,9239246	29,314575	FADD	N ctl si	0,75882196	28,016562
CRADD	N ctl RF	0,8444849	29,400784	FADD	N ctl RF	0,7027424	28,083832
CRADD	H ctl	0,8039942	29,41264	FADD	H ctl	0,4052393	28,819021
CRADD	H ctl si	0,9877225	29,01457	FADD	H ctl si	0,53707063	28,311539
CRADD	H ctl RF	0,73423105	29,467976	FADD	H ctl RF	0,44862032	28,596687
CRADD	N tax	0,654644	29,542002	FADD	N tax	0,5321598	28,258825
CRADD	N tax si	0,37518606	29,845304	FADD	N tax si	0,58200705	27,629847
CRADD	N tax RF	0,488606	29,96588	FADD	N tax RF	0,54592615	28,223818
CRADD	H tax	0,65344036	29,932058	FADD	H tax	0,43390644	28,940702
CRADD	H tax si	0,5658448	29,68201	FADD	H tax si	0,4691382	28,370377
CRADD	H tax RF	0,5456967	29,722664	FADD	H tax RF	0,3786493	28,667873
DAPK1	N ctl	Undetermined	FAS	N ctl	1	28,912426	
DAPK1	N ctl si	Undetermined	FAS	N ctl si	1,6809571	27,739107	
DAPK1	N ctl RF	Undetermined	FAS	N ctl RF	0,8386959	28,698675	
DAPK1	H ctl	Undetermined	FAS	H ctl	0,7634387	28,77528	
DAPK1	H ctl si	Undetermined	FAS	H ctl si	0,9756938	28,320217	
DAPK1	H ctl RF	Undetermined	FAS	H ctl RF	0,9917842	28,322151	
DAPK1	N tax	Undetermined	FAS	N tax	1,9785502	27,234308	
DAPK1	N tax si	Undetermined	FAS	N tax si	1,5423862	27,093786	
DAPK1	N tax RF	Undetermined	FAS	N tax RF	1,1938069	27,965021	
DAPK1	H tax	Undetermined	FAS	H tax	1,4226936	28,097528	
DAPK1	H tax si	Undetermined	FAS	H tax si	1,3701432	27,69413	
DAPK1	H tax RF	Undetermined	FAS	H tax RF	1,1850543	27,891848	

DEDD2	N ctl	1	28,64694	GAPDH	N ctl	1	19,968512
DEDD2	N ctl si	0,81920016	28,510614	GAPDH	N ctl si	1,1168181	19,38508
DEDD2	N ctl RF	0,7789232	28,539854	GAPDH	N ctl RF	1,0845317	19,383907
DEDD2	H ctl	0,97928905	28,150568	GAPDH	H ctl	2,4732008	18,135569
DEDD2	H ctl si	0,73580724	28,46183	GAPDH	H ctl si	0,7944708	19,672735
DEDD2	H ctl RF	1,0503411	27,973904	GAPDH	H ctl RF	2,100728	18,295444
DEDD2	N tax	1,375861	27,492928	GAPDH	N tax	0,8701048	19,475574
DEDD2	N tax si	1,3326545	27,03916	GAPDH	N tax si	0,8066591	19,085003
DEDD2	N tax RF	1,0659827	27,862919	GAPDH	N tax RF	0,7184871	19,753641
DEDD2	H tax	1,6345578	27,631767	GAPDH	H tax	1,5976728	18,986267
DEDD2	H tax si	1,5547972	27,246243	GAPDH	H tax si	0,73943835	19,64004
DEDD2	H tax RF	1,5033933	27,28309	GAPDH	H tax RF	1,9066043	18,26188
DEDD	N ctl	1	26,600498	HIP1	N ctl	1	28,591864
DEDD	N ctl si	0,58980066	26,938162	HIP1	N ctl si	0,41612816	29,432726
DEDD	N ctl RF	1,072476	26,03202	HIP1	N ctl RF	0,93756586	28,217339
DEDD	H ctl	0,5533024	26,927794	HIP1	H ctl	0,44453707	29,234924
DEDD	H ctl si	0,38146484	27,363167	HIP1	H ctl si	0,52851665	28,884132
DEDD	H ctl RF	0,5916625	26,755474	HIP1	H ctl RF	0,5910406	28,748356
DEDD	N tax	0,81907237	26,19476	HIP1	N tax	0,39756268	29,228931
DEDD	N tax si	0,36565146	26,858479	HIP1	N tax si	0,13977244	30,237234
DEDD	N tax RF	0,6243149	26,588316	HIP1	N tax RF	0,26088387	29,838547
DEDD	H tax	0,6400627	26,93794	HIP1	H tax	0,30572572	29,99528
DEDD	H tax si	0,35140258	27,345331	HIP1	H tax si	0,20313221	30,127401
DEDD	H tax RF	0,61111933	26,535347	HIP1	H tax RF	0,34482855	29,352285
DIABLO	N ctl	1	25,560452	LRDD	N ctl	1	29,709227
DIABLO	N ctl si	1,0992761	24,99986	LRDD	N ctl si	0,965116	29,336414
DIABLO	N ctl RF	0,97645456	25,127295	LRDD	N ctl RF	1,3403354	28,8191
DIABLO	H ctl	0,8366404	25,291208	LRDD	H ctl	0,401724	30,498384
DIABLO	H ctl si	0,97817886	24,964571	LRDD	H ctl si	0,5162448	30,035387
DIABLO	H ctl RF	0,7540073	25,365623	LRDD	H ctl RF	0,6262133	29,782322
DIABLO	N tax	0,68953675	25,403076	LRDD	N tax	0,50530434	30,000324
DIABLO	N tax si	0,792355	24,702755	LRDD	N tax si	0,4227301	29,75794
DIABLO	N tax RF	0,6176927	25,563654	LRDD	N tax RF	0,2487018	31,0249
DIABLO	H tax	0,88114506	25,436728	LRDD	H tax	0,34985498	30,918125
DIABLO	H tax si	0,7010596	25,308872	LRDD	H tax si	0,4107633	30,228876
DIABLO	H tax RF	0,8435387	25,0303	LRDD	H tax RF	0,37311247	30,355917
HTRA2	N ctl	1	27,978352	LTA	N ctl	1	35,708336
HTRA2	N ctl si	0,87088627	27,75376	LTA	N ctl si	6,7344947	32,53273
HTRA2	N ctl RF	0,735182	27,954647	LTA	N ctl RF	7,985027	32,243507
HTRA2	H ctl	0,31296015	29,127739	LTA	H ctl	6,7342367	32,43026
HTRA2	H ctl si	0,55464894	28,200996	LTA	H ctl si	3,4536188	33,29252
HTRA2	H ctl RF	0,5027801	28,368176	LTA	H ctl RF	11,724144	31,554749
HTRA2	N tax	0,8577138	27,50611	LTA	N tax	8,663329	31,89974
HTRA2	N tax si	0,5088278	27,759626	LTA	N tax si	2,9732888	32,9428
HTRA2	N tax RF	0,68094766	27,8409	LTA	N tax RF	8,0949335	31,999481
HTRA2	H tax	0,6111573	28,382465	LTA	H tax	10,3446665	32,03125
HTRA2	H tax si	0,44278213	28,389713	LTA	H tax si	7,752842	31,989641
HTRA2	H tax RF	0,51935273	28,147942	LTA	H tax RF	6,758747	32,175957

ICEBERG	N ctl		Undetermined	MCL1	N ctl	1	24,954468
ICEBERG	N ctl si		Undetermined	MCL1	N ctl si	0,8561068	24,754568
ICEBERG	N ctl RF		Undetermined	MCL1	N ctl RF	0,96661836	24,535917
ICEBERG	H ctl		Undetermined	MCL1	H ctl	1,2369584	24,121107
ICEBERG	H ctl si		Undetermined	MCL1	H ctl si	0,70362747	24,833874
ICEBERG	H ctl RF		Undetermined	MCL1	H ctl RF	1,2896287	23,985334
ICEBERG	N tax		Undetermined	MCL1	N tax	1,543351	23,634726
ICEBERG	N tax si		Undetermined	MCL1	N tax si	0,73725325	24,200758
ICEBERG	N tax RF		Undetermined	MCL1	N tax RF	0,8032276	24,57875
ICEBERG	H tax		Undetermined	MCL1	H tax	2,0913105	23,583788
ICEBERG	H tax si		Undetermined	MCL1	H tax si	0,8794163	24,37588
ICEBERG	H tax RF		Undetermined	MCL1	H tax RF	1,8264707	23,309784
IKBKB	N ctl	1	27,198404	NALP1	N ctl	1	30,627722
IKBKB	N ctl si	0,71901065	27,250282	NALP1	N ctl si	0,6616746	30,79949
IKBKB	N ctl RF	0,88421947	26,908396	NALP1	N ctl RF	1,2935057	29,788902
IKBKB	H ctl	0,4657125	27,77433	NALP1	H ctl	1,0934904	29,972216
IKBKB	H ctl si	0,60725147	27,290327	NALP1	H ctl si	0,5690406	30,813406
IKBKB	H ctl RF	0,6570871	27,20207	NALP1	H ctl RF	0,8931528	30,188564
IKBKB	N tax	1,0612327	26,418987	NALP1	N tax	1,6542281	29,207886
IKBKB	N tax si	0,41986635	27,256924	NALP1	N tax si	1,2318959	29,133362
IKBKB	N tax RF	0,71478635	26,990984	NALP1	N tax RF	1,1142085	29,779865
IKBKB	H tax	0,6226227	27,5757	NALP1	H tax	1,0740618	30,218372
IKBKB	H tax si	0,5213371	27,374146	NALP1	H tax si	0,9758125	29,899075
IKBKB	H tax RF	0,6244462	27,10213	NALP1	H tax RF	1,2741684	29,50254
IKBKE	N ctl	1	28,781672	NFKB1	N ctl	1	27,82398
IKBKE	N ctl si	0,91222775	28,490168	NFKB1	N ctl si	1,1507571	27,19736
IKBKE	N ctl RF	1,1729323	28,084019	NFKB1	N ctl RF	1,0204971	27,327175
IKBKE	H ctl	0,55903363	29,094099	NFKB1	H ctl	0,61152583	28,006931
IKBKE	H ctl si	0,5199491	29,097519	NFKB1	H ctl si	0,80621666	27,507029
IKBKE	H ctl RF	0,6847402	28,725864	NFKB1	H ctl RF	0,668573	27,802645
IKBKE	N tax	0,68824345	28,627003	NFKB1	N tax	1,1466173	26,93292
IKBKE	N tax si	0,44555026	28,754534	NFKB1	N tax si	0,6744296	27,198763
IKBKE	N tax RF	0,5319396	29,0005	NFKB1	N tax RF	0,5751732	27,930075
IKBKE	H tax	0,63804847	29,12366	NFKB1	H tax	0,7079486	28,015991
IKBKE	H tax si	0,55621743	28,86398	NFKB1	H tax si	0,85922104	27,278908
IKBKE	H tax RF	0,5925099	28,761133	NFKB1	H tax RF	0,76058966	27,443163
IKBKG	N ctl	1	27,07204	PMAIP1	N ctl	1	28,382736
IKBKG	N ctl si	0,92914474	26,754028	PMAIP1	N ctl si	1,8089687	27,103533
IKBKG	N ctl RF	1,067796	26,509872	PMAIP1	N ctl RF	1,1177067	27,754663
IKBKG	H ctl	0,67507684	27,112352	PMAIP1	H ctl	0,46124282	28,972574
IKBKG	H ctl si	0,7283177	26,901691	PMAIP1	H ctl si	1,5151179	27,155596
IKBKG	H ctl RF	0,99625695	26,475273	PMAIP1	H ctl RF	0,78696495	28,126188
IKBKG	N tax	0,9589741	26,4388	PMAIP1	N tax	3,6832433	25,808084
IKBKG	N tax si	0,8767433	26,068336	PMAIP1	N tax si	1,8511968	26,300802
IKBKG	N tax RF	1,104084	26,237354	PMAIP1	N tax RF	1,8765875	26,78279
IKBKG	H tax	0,8101417	27,06952	PMAIP1	H tax	2,1840756	26,949442
IKBKG	H tax si	0,82641065	26,58314	PMAIP1	H tax si	2,5893757	26,246162
IKBKG	H tax RF	1,0499676	26,22607	PMAIP1	H tax RF	1,9734873	26,626366

NFKB2	N ctl	1	26,22926	PYCARD	N ctl	1	29,009172
NFKB2	N ctl si	1,2623918	25,469063	PYCARD	N ctl si	0,59074533	29,344526
NFKB2	N ctl RF	1,1872803	25,514067	PYCARD	N ctl RF	1,0087945	28,529007
NFKB2	H ctl	0,78443867	26,052963	PYCARD	H ctl	0,62790453	29,15399
NFKB2	H ctl si	1,3128812	25,208813	PYCARD	H ctl si	0,41349906	29,655504
NFKB2	H ctl RF	0,90613425	25,769285	PYCARD	H ctl RF	0,66727936	28,990631
NFKB2	N tax	2,2018232	24,396885	PYCARD	N tax	0,21430433	30,537764
NFKB2	N tax si	1,6199032	24,339874	PYCARD	N tax si	0,11128571	30,983355
NFKB2	N tax RF	1,8579136	24,64374	PYCARD	N tax RF	0,19629021	30,666275
NFKB2	H tax	1,9807173	24,936964	PYCARD	H tax	0,16167304	31,331747
NFKB2	H tax si	2,4952104	24,146128	PYCARD	H tax si	0,19190694	30,626722
NFKB2	H tax RF	1,9188055	24,513426	PYCARD	H tax RF	0,2047356	30,521713
NFKBIA	N ctl	1	25,752169	RELA	N ctl	1	25,029737
NFKBIA	N ctl si	1,3609512	24,883516	RELA	N ctl si	0,9893202	24,621191
NFKBIA	N ctl RF	1,1517471	25,080812	RELA	N ctl RF	0,9880797	24,579506
NFKBIA	H ctl	0,4740349	26,30254	RELA	H ctl	0,72849244	24,960188
NFKBIA	H ctl si	1,0759648	25,018827	RELA	H ctl si	0,6421622	25,041018
NFKBIA	H ctl RF	0,81911516	25,437853	RELA	H ctl RF	0,8833081	24,606571
NFKBIA	N tax	0,5789458	25,846992	RELA	N tax	0,9249011	24,44869
NFKBIA	N tax si	0,5397613	25,448298	RELA	N tax si	0,6604493	24,43474
NFKBIA	N tax RF	0,533304	25,967302	RELA	N tax RF	0,87775874	24,526005
NFKBIA	H tax	0,5103821	26,416246	RELA	H tax	1,2288005	24,426214
NFKBIA	H tax si	0,7401817	25,422247	RELA	H tax si	0,6516687	24,883556
NFKBIA	H tax RF	0,74485	25,401522	RELA	H tax RF	1,0584136	24,172209
NFKBIB	N ctl	1	28,833149	RELB	N ctl	1	30,294767
NFKBIB	N ctl si	1,1703733	28,182144	RELB	N ctl si	2,2079008	28,728054
NFKBIB	N ctl RF	1,2485746	28,045336	RELB	N ctl RF	1,5503635	29,194628
NFKBIB	H ctl	0,50757277	29,2849	RELB	H ctl	1,2096179	29,49365
NFKBIB	H ctl si	0,83996755	28,457035	RELB	H ctl si	2,9061022	28,12797
NFKBIB	H ctl RF	0,58831984	28,9963	RELB	H ctl RF	1,5273175	29,081589
NFKBIB	N tax	1,5404991	27,516077	RELB	N tax	3,7250867	27,703817
NFKBIB	N tax si	1,1053832	27,495127	RELB	N tax si	4,9157805	26,80387
NFKBIB	N tax RF	1,1689012	27,91616	RELB	N tax RF	4,3674726	27,476131
NFKBIB	H tax	0,98105663	28,55447	RELB	H tax	4,0505342	27,97038
NFKBIB	H tax si	1,0376076	28,015919	RELB	H tax si	4,9914002	27,211351
NFKBIB	H tax RF	1,0463274	27,99219	RELB	H tax RF	3,3874788	27,758928
NFKBIE	N ctl	1	29,68503	REL	N ctl	1	30,93685
NFKBIE	N ctl si	1,2627949	28,924372	REL	N ctl si	0,83992535	30,764479
NFKBIE	N ctl RF	1,1131881	29,0628	REL	N ctl RF	0,7576441	30,869724
NFKBIE	H ctl	0,6696974	29,736883	REL	H ctl	0,77643305	30,77535
NFKBIE	H ctl si	1,044572	28,994408	REL	H ctl si	0,90545106	30,452429
NFKBIE	H ctl RF	0,9853527	29,10414	REL	H ctl RF	0,8850282	30,510876
NFKBIE	N tax	1,4710698	28,434488	REL	N tax	0,6064407	30,964735
NFKBIE	N tax si	1,0533254	28,416601	REL	N tax si	0,5583039	30,584248
NFKBIE	N tax RF	1,5126561	28,396109	REL	N tax RF	0,35211664	31,750887
NFKBIE	H tax	1,7916793	28,537443	REL	H tax	0,55903506	31,469564
NFKBIE	H tax si	1,3178827	28,522837	REL	H tax si	0,42567778	31,405045
NFKBIE	H tax RF	1,9931897	27,914324	REL	H tax RF	0,4834322	31,209839

NFKBIZ	N ctl	1	27,975618	RIPK1	N ctl	1	27,787954
NFKBIZ	N ctl si	1,481637	26,984388	RIPK1	N ctl si	0,83283746	27,62781
NFKBIZ	N ctl RF	1,0801322	27,396877	RIPK1	N ctl RF	0,98495674	27,342289
NFKBIZ	H ctl	0,24609631	29,471758	RIPK1	H ctl	0,65190613	27,878654
NFKBIZ	H ctl si	0,77587485	27,714012	RIPK1	H ctl si	0,6726042	27,732414
NFKBIZ	H ctl RF	0,63527167	28,027994	RIPK1	H ctl RF	0,5565926	28,031082
NFKBIZ	N tax	0,62123275	27,968735	RIPK1	N tax	1,1909347	26,842182
NFKBIZ	N tax si	0,31582648	28,444937	RIPK1	N tax si	0,7845372	26,944561
NFKBIZ	N tax RF	0,39088172	28,638977	RIPK1	N tax RF	0,78985745	27,436453
NFKBIZ	H tax	0,53306115	28,576971	RIPK1	H tax	0,8562704	27,705544
NFKBIZ	H tax si	0,377596	28,616732	RIPK1	H tax si	0,73650116	27,465223
NFKBIZ	H tax RF	0,40263322	28,512455	RIPK1	H tax RF	0,93185055	27,114157
PEA15	N ctl	1	23,36924	TNFRSF1A	N ctl	1	24,291853
PEA15	N ctl si	0,7855258	23,293472	TNFRSF1A	N ctl si	1,1526536	23,662857
PEA15	N ctl RF	0,9341776	22,999939	TNFRSF1A	N ctl RF	1,4283731	23,309948
PEA15	H ctl	0,48959532	23,873014	TNFRSF1A	H ctl	1,0887992	23,642551
PEA15	H ctl si	0,5946326	23,491459	TNFRSF1A	H ctl si	0,7986622	23,988485
PEA15	H ctl RF	0,61661816	23,464613	TNFRSF1A	H ctl RF	0,82539517	23,966518
PEA15	N tax	1,2893347	22,308937	TNFRSF1A	N tax	0,89179236	23,763397
PEA15	N tax si	0,5336986	23,081665	TNFRSF1A	N tax si	0,6885001	23,636847
PEA15	N tax RF	0,8287674	22,948364	TNFRSF1A	N tax RF	0,5731188	24,40311
PEA15	H tax	0,9742218	23,100645	TNFRSF1A	H tax	0,54102445	24,871815
PEA15	H tax si	0,6052069	23,32977	TNFRSF1A	H tax si	0,6490154	24,151558
PEA15	H tax RF	0,8508751	22,826595	TNFRSF1A	H tax RF	0,8005195	23,83722
RIPK2	N ctl	1	28,136576	TNFRSF1B	N ctl	1	30,491903
RIPK2	N ctl si	1,0685974	27,61682	TNFRSF1B	N ctl si	1,0456636	30,003447
RIPK2	N ctl RF	0,9032523	27,815842	TNFRSF1B	N ctl RF	1,1489283	29,824081
RIPK2	H ctl	0,7475718	28,029726	TNFRSF1B	H ctl	0,4014702	31,281973
RIPK2	H ctl si	0,76765513	27,890335	TNFRSF1B	H ctl si	0,9443195	29,946846
RIPK2	H ctl RF	0,5151056	28,491457	TNFRSF1B	H ctl RF	0,5060337	30,87242
RIPK2	N tax	1,4734639	26,883688	TNFRSF1B	N tax	0,15548198	32,483406
RIPK2	N tax si	0,83166456	27,209023	TNFRSF1B	N tax si	0,08123571	32,920166
RIPK2	N tax RF	0,70431244	27,95045	TNFRSF1B	N tax RF	0,12980679	32,74563
RIPK2	H tax	1,0005845	27,829458	TNFRSF1B	H tax	0,08412556	33,756943
RIPK2	H tax si	0,8524199	27,602968	TNFRSF1B	H tax si	0,13537598	32,61289
RIPK2	H tax RF	1,0744793	27,25731	TNFRSF1B	H tax RF	0,11187578	32,87631
TA-NFKBH	N ctl	1	31,945234	TNFRSF21	N ctl	1	23,73405
TA-NFKBH	N ctl si	1,3190279	31,121721	TNFRSF21	N ctl si	1,1544485	23,10281
TA-NFKBH	N ctl RF	0,88247997	31,658066	TNFRSF21	N ctl RF	0,8250166	23,544024
TA-NFKBH	H ctl	0,64248234	32,056942	TNFRSF21	H ctl	0,19676283	25,552958
TA-NFKBH	H ctl si	0,8237376	31,597267	TNFRSF21	H ctl si	1,0310506	23,062225
TA-NFKBH	H ctl RF	0,94169265	31,429728	TNFRSF21	H ctl RF	0,27475435	24,995659
TA-NFKBH	N tax	1,7475712	30,446205	TNFRSF21	N tax	0,17889409	25,523197
TA-NFKBH	N tax si	1,2316614	30,451149	TNFRSF21	N tax si	0,14948809	25,28247
TA-NFKBH	N tax RF	0,93965185	31,343199	TNFRSF21	N tax RF	0,15262024	25,754196
TA-NFKBH	H tax	0,7495452	32,054874	TNFRSF21	H tax	0,09218005	26,86718
TA-NFKBH	H tax si	1,1373547	30,99558	TNFRSF21	H tax si	0,18283589	25,42146
TA-NFKBH	H tax RF	0,9217712	31,287128	TNFRSF21	H tax RF	0,08855725	26,455671

TBK1	N ctl	1	27,986073	TNFSF10	N ctl	1	31,766815
TBK1	N ctl si	0,95246565	27,632298	TNFSF10	N ctl si	1,379234	30,878912
TBK1	N ctl RF	0,6173584	28,214361	TNFSF10	N ctl RF	0,93581235	31,394993
TBK1	H ctl	0,44084406	28,64117	TNFSF10	H ctl	1,148787	31,04014
TBK1	H ctl si	0,6749916	27,925423	TNFSF10	H ctl si	0,7557723	31,543083
TBK1	H ctl RF	0,5752819	28,181555	TNFSF10	H ctl RF	1,3647376	30,716015
TBK1	N tax	0,7034796	27,799818	TNFSF10	N tax	0,4377404	32,26499
TBK1	N tax si	0,42958212	28,011591	TNFSF10	N tax si	0,256943	32,533817
TBK1	N tax RF	0,454586	28,431612	TNFSF10	N tax RF	0,328552	32,680786
TBK1	H tax	0,5869385	28,448519	TNFSF10	H tax	1,0033664	31,455694
TBK1	H tax si	0,47092727	28,308527	TNFSF10	H tax si	0,33375525	32,585983
TBK1	H tax RF	0,349124	28,728638	TNFSF10	H tax RF	0,9379093	31,08367
TNFRSF10A	N ctl	1	27,522224	TRADD	N ctl	1	29,109037
TNFRSF10A	N ctl si	1,2695392	26,753883	TRADD	N ctl si	0,7285801	29,14184
TNFRSF10A	N ctl RF	1,0116473	27,037987	TRADD	N ctl RF	0,6884692	29,18004
TNFRSF10A	H ctl	0,49675432	28,005056	TRADD	H ctl	0,862971	28,795088
TNFRSF10A	H ctl si	0,8080029	27,202082	TRADD	H ctl si	0,75233495	28,891878
TNFRSF10A	H ctl RF	0,62158763	27,606018	TRADD	H ctl RF	0,8960114	28,66527
TNFRSF10A	N tax	1,2577689	26,497683	TRADD	N tax	0,63845354	29,062706
TNFRSF10A	N tax si	0,95868254	26,389622	TRADD	N tax si	0,5261588	28,84199
TNFRSF10A	N tax RF	0,81118935	27,132278	TRADD	N tax RF	0,7037214	28,924124
TNFRSF10A	H tax	0,60872847	27,932081	TRADD	H tax	0,8692965	29,004843
TNFRSF10A	H tax si	0,85056806	26,991756	TRADD	H tax si	0,5517819	29,202896
TNFRSF10A	H tax RF	0,5577122	27,589006	TRADD	H tax RF	0,7974562	28,659935
TNFRSF10B	N ctl	1	25,9179				
TNFRSF10B	N ctl si	1,0807714	25,381802				
TNFRSF10B	N ctl RF	1,0783252	25,341576				
TNFRSF10B	H ctl	0,72414446	25,856987				
TNFRSF10B	H ctl si	0,8523692	25,52064				
TNFRSF10B	H ctl RF	0,75214946	25,726631				
TNFRSF10B	N tax	1,1839361	24,980633				
TNFRSF10B	N tax si	0,9616682	24,780811				
TNFRSF10B	N tax RF	0,983604	25,249914				
TNFRSF10B	H tax	1,014405	25,590994				
TNFRSF10B	H tax si	0,9041669	25,299269				
TNFRSF10B	H tax RF	1,0591582	25,059357				