



**HAL**  
open science

# Mécanismes moléculaires de l'acquisition d'une sensibilité à l'apoptose induite par l'ABT-737 et d'une résistance à l'anoïkis de cellules coliques métastatiques

Aida Maamer Maamer - Azzabi

## ► To cite this version:

Aida Maamer Maamer - Azzabi. Mécanismes moléculaires de l'acquisition d'une sensibilité à l'apoptose induite par l'ABT-737 et d'une résistance à l'anoïkis de cellules coliques métastatiques. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T054 . tel-00966853

**HAL Id: tel-00966853**

**<https://theses.hal.science/tel-00966853>**

Submitted on 27 Mar 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## **FACULTÉ DE MÉDECINE**

### **ECOLE DOCTORALE de cancérologie : Biologie-Médecine-Santé**

#### **Thèse de doctorat**

*pour obtenir le grade de*

#### **DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11**

*soutenue le 19 septembre 2013*

*par*

**Aïda MAAMER-AZZABI**

**Mécanismes moléculaires de l'acquisition d'une sensibilité à l'apoptose induite par l'ABT-737 et d'une résistance à l'anoïkis de cellules humaines coliques métastatiques**

*Thèse dirigée par le Dr Jacqueline BREARD*

#### **Composition du jury :**

Pr. Poüs Christian	<i>Président</i> (EA4530, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry)
Dr. Amiot Martine	<i>Rapporteur</i> (UMR-S892, Université de Nantes)
Dr. Dubrez Laurence	<i>Rapporteur</i> (INSERM U866, Faculté de Médecine, Dijon)
Dr. Sebbagh Michael	<i>Examineur</i> (INSERM U891, CRCM, Marseille)



## REMERCIEMENT

*J'exprime mes sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail de thèse.*

*Je tiens à remercier mes rapporteurs de thèse, Dr. Martine AMIOT et Dr. Laurence DUBREZ-DALOZ, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie également Dr. Michael SEBBAGH d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur, ainsi que Pr. Christian POÛS d'avoir accepté de présider le jury.*

*Permettez-moi de vous adresser ma reconnaissance la plus sincère.*

*Je sais infiniment gré à ma directrice de thèse, le Dr. Jacqueline BREARD, de m'avoir accueillie il y a cinq ans pour mon master-2-recherche au sein de l'unité 749 à Châtenay-Malabry, et de m'avoir donnée l'opportunité de poursuivre mes travaux de recherche dans le cadre de ma thèse, cette fois-ci à Villejuif au sein de l'unité 1004. Merci pour tes idées scientifiques et remarques toujours pertinentes ainsi que pour ta disponibilité. Je te remercie également pour avoir su me conseiller, m'encadrer et me recadrer quand il le fallait ainsi que me laisser une liberté d'initiative.*

*Je souhaiterais aussi remercier le Dr. Éric RUBINSTIN, directeur de l'unité Inserm 1004. Merci de m'avoir accueillie au sein de ton unité et de m'avoir donné l'occasion de mener à bien ce travail.*

*Je remercie également tous les membres de l'U1004 : Claude, Martine, Clémentinette, Jean-François, Richard, Manu, Sabrina, Stéphanie, Arnault, Célia, Philippe, Joëlle, Rosella, Raphael, Jocelyne.*

*Un grand merci à Stéphanie CHARRIN pour toutes les fois où j'ai eu besoin d'aide et qu'elle fut présente.*

*Je remercie vivement Franck GESBERT pour ses qualités humaines d'écoute, sa disponibilité et ses précieux conseils aussi bien professionnels que personnels.*



*Un grand merci à mes amies Naouel, Aniya, Monica et Leslie pour votre enthousiasme, votre soutien et votre patience. Merci aussi de m'avoir toujours remontée le moral. Vous êtes parties l'une après l'autre mais j'avais toujours une pensée pour vous.*

*Je remercie toutes les personnes du bâtiment Lavoisier : U1014 et U972 et les personnes du bâtiment André Lwoff (la deuxième moitié de l'U1014) que j'ai côtoyé pendant ces années. Je souhaite également remercier mes amis Perle, Jolywood, AST, Lynn, Cathy, Virginie, Zeina. Je vous remercie pour les bons moments passés ensemble. Je suis toujours partante pour nos superbes soirées.*

*Je remercie du plus profond de mon cœur mes parents (Samira et Jihed), mon frère Zied et ma sœur Rania pour cet amour inconditionnel essentiel à mon bien et mon équilibre, tout le soutien et l'énergie apportés, avec cette question récurrente, « quand est-ce que tu la soutiens cette thèse? », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final.*

*Mes remerciements vont également à ma belle famille, en particulier mes beaux parents (Radia et Farhat), pour leur amour, leur confiance en moi et leurs encouragements. Ils ont toujours cru en moi et j'espère être toujours à leur hauteur.*

*Une pensée pour toutes personnes, d'ici et de la Tunisie, qui m'ont accompagnées et motivées pendant ces dernières années.*

*Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée pour l'homme de ma vie, mon mari RAMZI. Ta présence tout au long de mes études en France et tes encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. Je n'oublierai jamais tes sacrifices avant et surtout après l'arrivée de notre fruit d'amour, Tesnime. L'amour dont vous me donnez chaque jour est un véritable moteur pour moi.*



# TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES .....	1
TABLE DES FIGURES ET LISTE DES TABLEAUX.....	11
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	15
INTRODUCTION .....	19
<b>I. L'apoptose. ....</b>	<b>21</b>
<b>1. Déroulement de l'apoptose. ....</b>	<b>22</b>
<b>1.1. Modifications morphologiques de la cellule. ....</b>	<b>23</b>
<b>1.2. Modifications nucléaires. ....</b>	<b>23</b>
<b>1.3. Modifications mitochondriales. ....</b>	<b>24</b>
<b>2. Les acteurs de l'apoptose. ....</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Les caspases.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.1. Structure et classification. ....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.2. Activation des caspases. ....</b>	<b>27</b>
2.1.2.1. Activation des caspases à domaine DED par l'intermédiaire des récepteurs de mort : la voie extrinsèque.....	28
2.1.2.2. Activation des caspases à domaine CARD au niveau de l'apoptosome : la voie intrinsèque. ....	31
2.1.2.3. Activation des caspases effectrices. ....	31
2.1.2.4. Autres modes d'activation des caspases : le Ripoptosome et le PIDDosome.....	32
<b>2.1.3. Substrats des caspases. ....</b>	<b>33</b>
<b>2.1.4. Les inhibiteurs des caspases. ....</b>	<b>35</b>
2.1.4.1. Régulation de l'activation des caspases au niveau de la formation du DISC.....	36
2.1.4.2. Régulation de l'activité des caspases au niveau de la formation de l'apoptosome. ....	36
2.1.4.3. Régulation de l'activation et de l'activité protéolytique des caspases par les IAPs.....	36
<b>2.2. Les protéines de la famille Bcl-2.....</b>	<b>38</b>
<b>2.2.1. Structure et classification. ....</b>	<b>39</b>
<b>2.2.2. Mécanismes d'action des protéines de la famille Bcl-2 au niveau de la mitochondrie. ....</b>	<b>40</b>
2.2.2.1. La théorie de la rupture de la membrane externe des mitochondries.....	40
2.2.2.2. L'hypothèse des canaux autonomes.....	41
<b>2.2.3. Le rôle des protéines à domaine BH3 seul. ....</b>	<b>42</b>
<b>2.2.4. Régulation de l'activité des membres de la famille Bcl-2. ....</b>	<b>43</b>
2.2.4.1. Régulation des membres anti-apoptotiques. ....	43

2.2.4.2. Régulation des membres pro-apoptotiques .....	47
<b>2.2.5. Thérapie ciblées par les inhibiteurs de Bcl-2.</b> .....	<b>49</b>
2.2.5.1. L'inhibition des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 .....	49
2.2.5.2. Petites molécules antagonistes de Bcl-2 .....	49
2.2.5.3. L'ABT-737 : un inhibiteur spécifique.....	51
2.2.5.4. L'ABT-263 (navitoclax) .....	53
2.2.5.5. L'ABT-199.....	54
2.2.5.6. Le BH3-M6 .....	55
<b>II. La perte d'adhérence : Anoïkis.....</b>	<b>57</b>
<b>1. Les voies de signalisation de l'anoïkis.....</b>	<b>58</b>
<b>2. Protection physiologique contre l'anoïkis. ....</b>	<b>59</b>
2.1. Les interactions cellules-MEC.....	59
2.2. Les interactions cellule-cellule.....	62
2.3. Les modifications du cytosquelette. ....	63
2.4. Protection pathologique contre l'anoïkis.....	64
2.4.1. La permutation des intégrines. ....	64
2.4.2. Hyperactivation des voies de signalisation de survie. ....	65
2.4.3. Génération modérée de ROS (reactive oxygen species).....	65
2.4.4. L'autophagie induite par le détachement.....	66
2.4.5. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).....	66
<b>III. Généralités sur les cancers.....</b>	<b>69</b>
<b>1. Les cancers du côlon.....</b>	<b>70</b>
1.1. Les différents types de cancers du côlon. ....	70
1.2. Instabilité génomique et méthylation de l'ADN dans les cancers du côlon.....	71
1.3. La séquence adénome-carcinome dans les cancers du côlon.....	71
<b>2. Structure de l'épithélium intestinal.....</b>	<b>73</b>
<b>3. Les voies de signalisation cellulaire dans le cancer du côlon.....</b>	<b>74</b>
3.1. La voie Wnt/Wingless.....	74
3.2. Les voies Ras-MAPK.....	75
3.3. La voie du TGF- $\beta$ . ....	75
<b>4. Modèle cellulaire de la progression du cancer colorectal. ....</b>	<b>76</b>
<b>IV. CDCP1 et son rôle dans l'invasion et les métastases des cellules cancéreuses. ....</b>	<b>79</b>
<b>1. Identification et structure de CDCP1.....</b>	<b>79</b>

2. Les interacteurs de CDCP1. ....	80
3. Clivage de CDCP1. ....	81
4. Induction de la phosphorylation de CDCP1 dans les cellules cancéreuses. ....	82
4.1. Détachement cellulaire et phosphorylation. ....	83
4.2. Clivage et Phosphorylation. ....	84
4.3. Phosphorylation par assemblage des protéines CDCP1 en grappes. ....	85
4.4. CDCP1 et SFK. ....	85
5. Dérégulation de l'expression de CDCP1 dans les cancers humains. ....	85
6. CDCP1 et les tumeurs hypoxiques. ....	86
7. CDCP1 et son rôle dans la progression tumorale. ....	87
8. Opportunités et défis pour le ciblage de CDCP1 dans le cancer. ....	88
<b>OBJECTIF DE LA THÈSE</b> .....	<b>91</b>
<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>95</b>
<b>Les cellules coliques métastatiques SW620 sont prédisposées à la mort lorsqu'elles sont détachées et peuvent être sensibilisées à l'anoïkis par le BH3-mimétique ABT-737</b> .....	<b>97</b>
<b>Mécanismes moléculaires de la résistance à l'anoïkis des cellules coliques métastatiques : rôle de la protéine CDCP1</b> .....	<b>101</b>
<b>Introduction.</b> ....	<b>101</b>
<b>Matériels et méthodes</b> .....	<b>102</b>
<b>Résultats</b> .....	<b>107</b>
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE</b> .....	<b>127</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>145</b>
<b>ANNEXE</b> .....	<b>173</b>



## TABLE DES FIGURES ET LISTE DES TABLEAUX

- Figure 1 : Illustration des différentes caractéristiques de l'apoptose.
- Figure 2 : Quantification de l'ADN par analyse en cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium.
- Figure 3 : Les voies apoptotiques conservées au cours de l'évolution.
- Figure 4 : Mécanisme d'activation des caspases.
- Figure 5 : Structure et classification des caspases en fonction de leur degré d'homologie.
- Figure 6 : Activation des caspases au sein du DISC et de l'apoptosome.
- Figure 7 : Modèle de signalisation par le récepteur TNF-R1.
- Figure 8 : Le ripoptosome.
- Figure 9 : Les composants du PIDDosome.
- Figure 10: Les domaines caractéristiques des IAPs.
- Figure 11: Rôle des IAPs dans la régulation des voies de signalisation apoptotiques.
- Figure 12: Classification des différentes protéines de la famille Bcl-2.
- Figure 13: Modèles de sortie du cytochrome c et des autres facteurs apoptogènes de l'espace intermembranaire mitochondrial.
- Figure 14: Deux modèles d'activation de Bax et Bak par les protéines à domaine BH3 seul.
- Figure 15: Modes de régulation des membres pro-apoptotiques à domaine BH3 seul.
- Figure 16: Les grandes lignes de la stratégie « SAR by RMN ».
- Figure 17: Acquisition de la résistance à l'anoïkis.
- Figure 18: Schéma simplifié des voies de signalisation dépendantes de l'intégrine activées par des forces mécaniques dans les fibroblastes.
- Figure 19: Illustration schématique de quelques connexions moléculaires des complexes d'adhérences (adhérences focales) impliquées dans les voies de signalisation de survie.
- Figure 20: Les signaux de transduction médiés par le contact cellule-cellule et conduisant à la survie.
- Figure 21: Modifications acquises au cours de la tumorigénèse.
- Figure 22: Répartition des différents types de cancers du côlon.
- Figure 23: Modèle de tumorigénèse colorectale appelé aussi séquence adénome-carcinome.
- Figure 24: Structure de l'épithélium intestinal.
- Figure 25: Représentation schématique de la voie de signalisation WNT.
- Figure 26: Comparaison de la morphologie des cellules SW480 et SW620.
- Figure 27: Représentation schématique de la structure de la protéine humaine CUB domain-containing protein 1 (CDCP1), y compris le peptide signal.
- Figure 28: CDCP1 interagit avec les SFKs et la PKC  $\delta$ .

Figure 29: La phosphorylation de la protéine CDCP1 est médiée par un certain nombre d'évènements cellulaires.

Figure 30: Profil de tyrosine phosphorylations des cellules SW480 et SW620 (western blot anti-p-tyrosine) cultivées en suspension. A : cellules adhérentes ; Hsc70 : contrôle de charge

Figure 31: Représentation des peptides de CDCP1 identifiés par spectrométrie de masse.

Figure 32: Analyse de l'expression de CDCP1 par western blot en adhérence et en suspension à l'aide d'un anticorps anti-CDCP1.

Figure 33: CDCP1 est exprimée et phosphorylée dans les lignées SW620 et SW480-CDCP1.

Figure 34: CDCP1 protège les cellules SW480 de l'anoïkis

Figure 35: Niveau d'expression des protéines Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bid et Bim dans les cellules SW480 et SW480-CDCP1 en suspension comparé à celui en adhérence (A). Hsc-70 est utilisé comme contrôle de charge.

Figure 36: L'inhibiteur de la voie PI3K/Akt, le LY294002, ne sensibilise pas les cellules SW480-CDCP1 et SW620 à l'anoïkis.

Figure 37: L'inhibition de MEK augmente l'expression de Bim et sensibilise les cellules SW480-CDCP1 à l'anoïkis.

Figure 38: L'expression de CDCP1 dans les cellules SW480 entraîne un changement de morphologie.

Figure 39: La présence de CDCP1 dans les cellules SW480 accélère leur vitesse de migration

Figure 40: L'activité Rho est augmentée dans les cellules SW480-CDCP1.

Figure 41: Les cellules SW480-CDCP1 et SW620 sont toujours résistantes à l'anoïkis en présence de dasatinib et ce malgré la déphosphorylation de Src et de CDCP1.

Figure 42: CDCP1 est phosphorylée sur sérine.

Figure 43: Identification des différents partenaires de CDCP1.

Figure 44: Modèle de signalisation de l'intégrine  $\alpha6\beta4$ .

Figure 45: CDCP1 interagit avec l'ITGB4 en adhérence dans les cellules SW620 .

Figure 46: CDCP1 interagit avec la protéine ITGB4 malgré une totale déphosphorylation des tyrosines en présence du dasatinib.

Figure 47: L'ITGB4 est exprimée dans les cellules SW480 et SW620 adhérentes à des taux comparables.

Figure 48: La diminution de l'expression de l'ITGB4 n'a aucun effet sur la résistance des cellules à l'anoïkis.

Figure 49: Les cellules CT sont sensibles à l'anoïkis malgré une activation de Src et de CDCP1 maintenue tout au long de la cinétique.

Figure 50: La transfection de CDCP1 est sans effet quant à l'activation de Src et la sensibilité des cellules SW480-CDCP1 N°3:C3 à l'anoïkis.

Figure 51: Marquage positif de CDCP1 dans un tissu colique sain (grossissement 400X).

Figure 52: Pourcentage de tumeurs primaires, de métastases ganglionnaires ou hépatiques exprimant CDCP1 ou p-CDCP1.

Figure 53: Marquage négatif de CDCP1 dans un tissu colique tumoral.

Figure 54: Marquage à dominance membranaire de CDCP1 dans un tissu tumoral colique.

Figure 55: Marquage à dominance cytoplasmique de CDCP1 dans un tissu tumoral colique.

Figure 56: Analyse par western blot du taux d'expression de l'EGF-R dans les cellules SW480 et SW620 cultivées en adhérence (A) et en suspension.

Figure 57: Analyse par western blot du taux d'expression de XIAP dans les cellules SW480 et SW620 cultivées en adhérence (A) et en suspension.

Figure 58: Mécanisme d'action de l'ABT-737 et de la réponse à ce traitement en fonction du ratio Bcl-2/Mcl-1 des cellules.

### **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Présentation de substrats des caspases appartenant aux différents groupes.

Tableau 2 : Essais cliniques finalisés ou en cours.



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

### A

**AIF** : Apoptosis inducing factor

**Apaf-1** : Apoptosis activating factor-1

### B

**Bad** : Bcl-2-associated agonist of cell death

**Bak** : Bcl-2 antagonist/killer

**Bax** : Bcl-2 associated x protein

**Bcl-2** : B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins

**Bcl-xL** : Longer alternatively splice form of Bcl-2 homolog X protein

**BH** : Bcl-2 homology

**BIR** : Baculovirus IAP repeat

**Bid** : BH3 interacting domain death agonist

**Bim** : Bcl-2 interacting mediator of cell death

**Bmf** : Bcl-2 modifying factor

### C

**CAD** : Caspase activating Dnase

**CARD** : Caspase recruitment domain

**Caspase** : Cysteine aspartate protéase

**CC-RCC** : clear cell renal cell carcinoma

**CDCP1** : CUB-domain-containing Protein 1

**CDK** : Cyclin-dependant kinases

**Ced** : *Caenorhabditis elegans* death/cell death abnormal

**CIMP** : CpG Island methylator phenotype

**CIN** : Chromosomal instability

**CrmA** : Cytokine response modifier A

**CTL** : Cytotoxic T lymphocyte

### D

**DD** : Death Domain

**DED** : Death Effector Domain

**DDF/CAD** : DNA Fragmentation Factor 40/Caspase-activated désoxyribonuclease

**DISC** : Death inducing signaling complex

### E

**EAO** : Espèces activées de l'Oxygène

**EIM** : Espace intermembranaire mitochondrial

**EGF-R** : Epidermal growth factor receptor

**ERK** : Extracellular signal regulated kinase

### F

**FADD** : Fas associated factor-1

**FAK** : Focal adhesion kinase

**FLIP** : Flice inhibitory protein

### G

**GSK** : Glycogen synthase kinase

### H

**HIF** : hypoxia-inducible factor

**HNPCC** : Hereditary non polyposis colorectal cancer

**Hsp70** : Heat shock protein 70

**HtrA2/Omi** : High-temperature requirement

A2

### I

**IAP** : Inhibitors of apoptosis

**ICAD** : Inhibitor of caspase-activated Dnase

**IκB** : Inhibitor of NF-κB

**IKK** : IκB kinase

### J

**JNK** : c-Jun N-terminal kinase

**JPS** : Syndrôme de polypose juvénile

### L

**LAL** : Leucémie aiguë lymphoblastique

**LLC** : Leucémie lymphoïde chronique

**LRR** : leucine-rich repeats

## **M**

**MAPK** : Mitogen activated protein kinase

**MEC** : Matrice extracellulaire

**Mcl-1** : Myeloid cell leukemia-1

**MMP** : Métalloprotéase de la matrice

**MSI** : Microsatellite instability

**MT-SP1** : Sérine protéase membranaire, matriptase

## **N**

**NK** : Natural killer

**NK- $\kappa$ B** : Nuclear factor kappa B

## **P**

**PARP** : Poly (ADP ribose) polymérase

**PERK** : Endoplasmic reticulum kinase

**PI3K** : Phosphoinoside 3 kinase

**PIDD** : p53-induced protein with a death domain

**PKB** : Protéine kinase B

**PKC** : Protéine kinase C

**PTP** : Pore de transition de perméabilité

**Puma** : p53 upregulated modulator of apoptosis

## **R**

**RAIDD** : RIP associated Ich-1/Ced homologous protein with death domain

**RCC** : renal cell carcinoma

**RE** : Réticulum endoplasmique

**RIP** : Receptor interacting protein

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire

**ROS** : reactive oxygen species

## **S**

**Smac** : Second mitochondrial activator of caspases

## **T**

**TEM** : Transition épithélio-mésenchymateuse

**TME** : Transition mésenchymo-épithéliale

**TNF** : Tumor necrosis factor

**TRADD** : TNF receptor associated death domain

**TRAF-2** : TNF receptor associated factor-2

**TRAIL** : TNF-related apoptosis-inducing ligand

## **V**

**VDAC** : Voltage dépendent anion chanel

**VEGF** : Facteur de croissance de l'épithélium vasculaire

**VHL** : von Hippel-Lindau

## **X**

**XIAP** : X-Linked inhibitor of apoptosis

**$\Delta\Psi_m$**  : Potentiel mitochondrial transmembranaire

## RÉSUMÉ

La progression tumorale est la conséquence de multiples altérations génotypiques et phénotypiques. L'une d'entre elles, nécessaire à la formation de métastases, est l'acquisition d'une résistance à l'anoïkis, forme d'apoptose induite par la perte d'attachement à la matrice extracellulaire. Afin d'étudier l'anoïkis, nous avons utilisé deux lignées colorectales humaines isogéniques : la lignée SW480 dérivée de la tumeur primaire et sensible à l'anoïkis et la lignée SW620 dérivée d'une métastase ganglionnaire de cette même tumeur et résistante à l'anoïkis. Nous avons établi que dans les cellules SW480, l'anoïkis est une forme d'apoptose intrinsèque c'est-à-dire débutant à la mitochondrie et donc sous le contrôle des protéines de la famille Bcl-2. Parmi celles-ci, nous avons trouvé que seule la protéine pro-apoptotique à BH3-seul Bim était régulée différemment dans les deux lignées : tandis que son expression augmente de manière très significative dans les cellules SW480 cultivées en suspension, elle n'augmente que très peu dans les cellules SW620. De manière très intéressante, et malgré cette différence, les deux lignées se sont montrées être sensibles au BH3-mimétique ABT-737 mais seulement lorsqu'elles sont cultivées en suspension. Ces résultats indiquent que, qu'elles soient sensibles ou non à l'anoïkis, les cellules détachées sont « prédisposées à la mort » et que des composés semblables à l'ABT-737 tels que le Navitoclax ou l'ABT-199 pourraient avoir des propriétés anti-métastatiques dans les tumeurs solides. Dans la seconde partie de ce travail, nous montrons que la protéine transmembranaire CDCP1 (CUB Domain Containing Protein 1), qui est surexprimée dans le cancer du colon, semble être nécessaire mais non suffisante pour protéger ces cellules contre l'anoïkis. CDCP1 est un substrat de Src mais sa phosphorylation sur tyrosine n'est pas impliquée dans cette protection. Finalement, nous avons identifié deux nouvelles protéines qui interagissent avec CDCP1, l'ITGB4 et l'EphA2.

## ABSTRACT

Tumour progression is the consequence of multiple genotypic and phenotypic alterations. One of these, necessary for the formation of metastasis, is acquisition of a resistance to anoikis, a form of apoptosis triggered by loss of attachment to the extra-cellular matrix. In order to study anoikis, we used two isogenic human colon cell lines : SW480 cells derived from the primary tumour and sensitive to anoikis, and SW620 cells derived from a lymph node metastasis in the same patient which are resistant to anoikis. We found that anoikis signaling in SW480 cells is a form of intrinsic apoptosis thus starting at the mitochondria and under the control of Bcl-2 family proteins. Among the members of this family, the BH3-only pro-apoptotic protein Bim was the only one that we found to be differentially regulated between the two cell lines: whereas Bim expression augments strongly during the culture in suspension of SW480, it only slightly does so in SW620 cells. Most interestingly, despite this difference, both cell lines turned out to be sensitive to the BH3-mimetic ABT-737 but only when they are in suspension. This shows that, whether or not they are sensitive to anoikis, detached colon cancer cells are "primed for death" and thus that ABT-737 related compounds such as Navitoclax or ABT-199 might have anti-metastatic properties in solid tumors. In the second part of this work, we show that the transmembrane protein CDCP1 (CUB Domain Containing Protein 1) which is over expressed in colon cancer, appears necessary but not sufficient to protect these cells against anoikis. CDCP1 is a Src substrate but its tyrosine phosphorylation is not involved in this protection. Finally, we have identified two new proteins interacting with CDCP1, ITGB4 and EphA2.



---

# **INTRODUCTION**

---



## I. L'apoptose.

La mort cellulaire programmée est un terme utilisé initialement pour décrire des cellules qui meurent à un moment précis et à un lieu précis au cours du développement. Puisque beaucoup de cellules qui meurent de façon programmée meurent par apoptose, les deux termes sont utilisés à tort de manière interchangeable. Le mot apoptose provient d'une locution grecque signifiant "chute des feuilles" et était déjà utilisée par Hippocrate de Kos (460-377 av. J.C.) pour décrire la décomposition des tissus après la mort ("chute des os"). L'intérêt accordé à l'étude du processus de mort cellulaire date de plus d'un siècle. Décrite pour la première fois en 1842 par le naturaliste Carl Vogt chez les batraciens au cours de leur métamorphose, c'est l'embryologiste Alfred Glucksmann qui en 1951 émet l'hypothèse que cette "mort cellulaire" programmée se produirait à des moments bien précis du développement d'un organisme (Clarke and Clarke, 1996, 2012). Ces découvertes ont alors progressivement modifié notre vision des relations que la vie entretient avec la mort. Mais ce n'est que depuis une trentaine d'années qu'a émergé la notion que toutes nos cellules possèdent à tout moment, la capacité de déclencher leur autodestruction. C'est enfin en 1972 que John Kerr, Andrew Wyllie et Alastair Curie introduisent le mot "apoptose" pour désigner un modèle de mort cellulaire nouvellement observé (Kerr et al., 1972). La mort par apoptose est un processus actif, organisé temporellement, au cours duquel la cellule exprime un ensemble de gènes entraînant des modifications morphologiques, biochimiques et structurales aboutissant à sa destruction "sans traces" et complète (Kerr et al., 1972). Enfin, c'est grâce notamment aux recherches menées par John Sulston, Sydney Brenner et Robert Horvitz sur le développement du nématode *Caenorhabditis elegans*, que le programme génétique et moléculaire associé au déclenchement et à la transduction du signal apoptotique a été déchiffré (Horvitz, 1999). John Sulston, Sydney Brenner et Robert Horvitz ont reçu le prix Nobel de Médecine et Physiologie en 2002, couronnant l'importance du concept de mort cellulaire programmée. C'est un processus conservé à travers les espèces et qui est retrouvé chez tous les organismes multicellulaires.

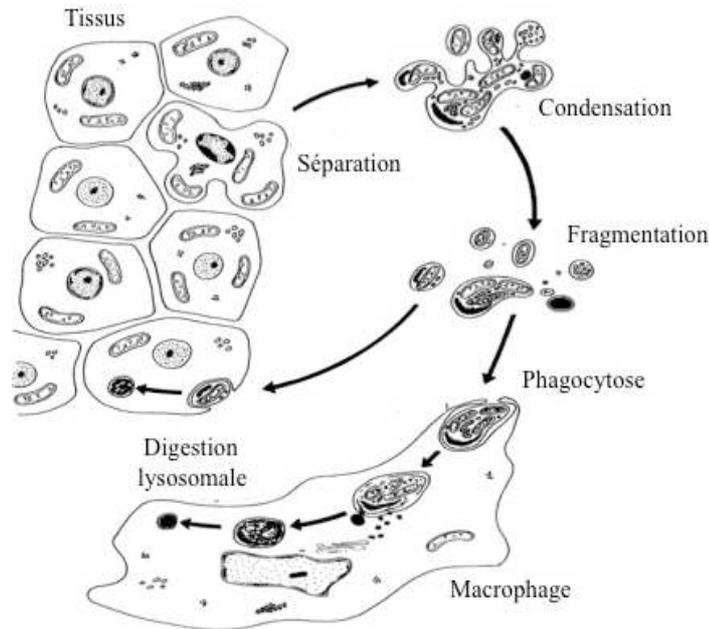
L'apoptose est un processus physiologique par lequel des cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles sont éliminées de l'organisme. L'apoptose joue notamment un rôle déterminant dans l'embryogenèse (par exemple, l'individualisation des doigts), dans certains changements morphologiques (par exemple, la régression de la queue du têtard et la métamorphose de certains insectes), dans l'homéostasie cellulaire, dans l'atrophie (par exemple, les menstruations), dans le fonctionnement et l'homéostasie du système immunitaire (par exemple, l'apprentissage du soi par les lymphocytes), dans la réparation des tissus et dans la régression des tumeurs. Il est estimé qu'environ un million de cellules disparaissent chaque seconde du corps humains afin de laisser la place à de nouvelles cellules fonctionnellement plus compétentes.

Le dérèglement pathologique du processus d'apoptose ou de son contrôle est à l'origine de nombreuses maladies comme les cancers, certains désordres autoimmuns, les maladies neuro-dégénératives (Alzheimer, Parkinson), les maladies cardio-vasculaires (infarctus), le sida (caractérisé par la disparition des lymphocytes T CD4+). Il est donc essentiel de comprendre les mécanismes moléculaires régulant l'apoptose car en effet elle prend de plus en plus d'importance dans le domaine de la biologie, de la recherche thérapeutique et de la médecine.

## **1. Déroulement de l'apoptose.**

Un processus apoptotique, de manière schématique, peut être décomposé en 3 phases successives :

- Phase d'induction ou d'initiation durant laquelle des signaux environnementaux aussi bien physiologiques que pathologiques, seront intégrés par la cellule qui, en fonction de son génotype et de son état physiologique, orientera sa réponse vers la mort, la survie, la prolifération ou la différenciation.
- Phase d'exécution ou effectrice comprenant un point de non retour. Cette phase se caractérise par l'intégration du signal apoptotique et donc l'activation de la machinerie apoptotique par l'intervention notamment des caspases et des protéines de la famille Bcl-2. La cellule subit alors des changements morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose.
- Phase de destruction cellulaire et d'élimination avec fragmentation de la cellule, qui a perdu ses connexions intercellulaires, en corps apoptotiques qui sont phagocytés par d'autres cellules. Cette étape indispensable de phagocytose prévient d'une nécrose secondaire qui s'accompagnerait d'une libération du contenu cellulaire toxique par les cellules avoisinantes et donc d'une réaction inflammatoire locale.



**Figure 1: Illustration des différentes caractéristiques de l'apoptose.**

D'après Kerr et al., 1972.

### 1.1. Modifications morphologiques de la cellule.

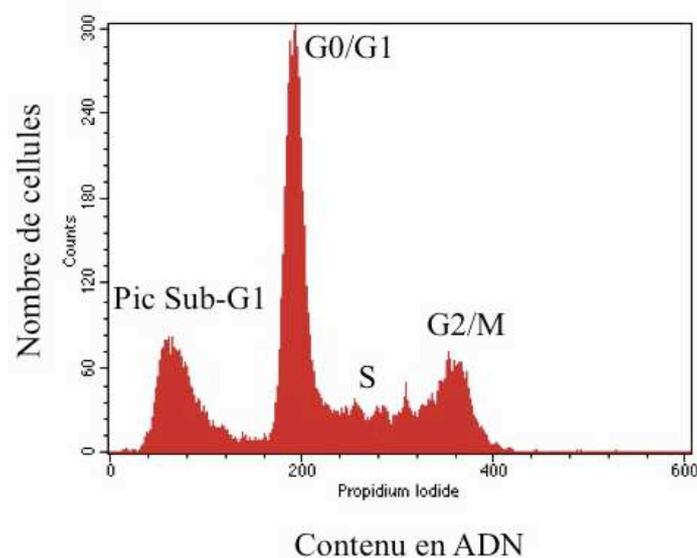
La réduction du volume cellulaire est une des premières modifications morphologiques dues à l'apoptose. Le cytoplasme se condense, la cellule s'arrondit et perd ses contacts avec les cellules voisines. Ces événements sont immédiatement suivis de la formation d'une multitude de protubérances dynamiques à la surface de la membrane plasmique. Lorsque l'on observe les cellules, ce phénomène transitoire donne l'impression d'un « bouillonnement » membranaire que l'on appelle plus couramment « blebbing » (Robertson et al., 1978). Suit une condensation de la chromatine le long de la membrane nucléaire puis une fragmentation du noyau. Dans le même temps, des modifications au niveau de la membrane plasmique telles que l'externalisation de la phosphatidylsérine servent de signal pour déclencher la phagocytose de la cellule mourante. Dans le cas où la cellule n'est pas phagocytée à ce stade, elle se démantèle en nombreuses vésicules contenant différents organites cellulaires (mitochondries, réticulum, fragments nucléaires, ...) entourés par une membrane plasmique intacte : les « corps apoptotiques » (Dive et al., 1992). Ceux-ci seront phagocytés par les macrophages ou par les cellules voisines.

### 1.2. Modifications nucléaires.

L'une des caractéristiques biochimiques de l'apoptose, qui a servi à la définition même de mort par apoptose, est la fragmentation régulière de la chromatine. La première phase de digestion conduit à des fragments de 50 à 300 kilobases (Oberhammer et al., 1993) et est suivie d'une fragmentation oligonucléosomale en fragments multiples de 180 à 200 paires de bases visibles sous la forme dite

« en barreaux d'échelle » sur gel d'agarose. Elles sont dues à l'action d'une nucléase spécifique, la DFF/CAD (DNA Fragmentation Factor 40/Caspase-activated desoxyribonuclease).

Lors de l'analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux après fixation à l'éthanol et marquage à l'iodure de propidium (IP), cette digestion de la chromatine se traduit sur l'histogramme par l'apparition d'un pic de fluorescence d'une intensité de marquage inférieur à celle des cellules en G0/G1 : pic « subG1 » (**figure 2**). Cet effet est attribué à la sortie des fragments d'ADN du noyau dans le cytoplasme puis dans l'espace extracellulaire suite à la perméabilisation des cellules par l'éthanol, conduisant ainsi à un phénotype de cellules « pseudo-hypodiploïdes ». Par cette technique, on peut donc quantifier le pourcentage de cellules apoptotiques présentes dans ce pic subG1.



**Figure 2 : Quantification de l'ADN par analyse en cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium.**

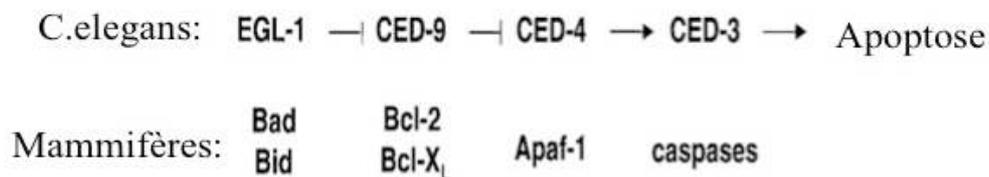
### 1.3. Modifications mitochondriales.

Le rôle principal de cet organe intracellulaire est la production de l'énergie pour les cellules eucaryotes. Cette énergie est produite sous forme d'ATP, par la chaîne respiratoire. Au cours de l'apoptose, la mitochondrie joue un rôle totalement différent. En effet, suite à une perméabilisation partielle de sa membrane externe, il y a sortie vers le cytosol de facteurs apoptogènes tels que le cytochrome c. Ces facteurs régulent l'activité protéolytique d'une famille de cystéine protéases spécifiques, les caspases, qui sont au cœur de la phase d'exécution. Les propriétés de ces protéases sont détaillées dans le chapitre suivant. Dans d'autres cas, un gonflement, une condensation et une fission de la mitochondrie sont observés (Desagher and Martinou, 2000; Frank et al., 2001; Kroemer et al., 1997). Le gonflement de la matrice mitochondriale peut également induire une rupture de la

membrane externe ayant pour conséquence la libération dans le cytoplasme des facteurs apoptogènes (Grimm and Brdiczka, 2007).

## 2. Les acteurs de l'apoptose.

Les premiers composants de la machinerie apoptotique ont été identifiés au cours des années 80 par l'équipe de R. Horvitz en étudiant les mécanismes de l'apoptose durant le développement de *Caenorhabditis elegans*. Le choix de ce modèle d'étude réside dans le fait que ce vers présente le double avantage de se développer rapidement et d'être translucide, ce qui permet de suivre les divisions des cellules directement au microscope. En effet, durant les premières phases du développement de *C. elegans*, 1090 cellules sont générées et 131 vont mourir par apoptose. L'équipe de R. Horvitz, à l'aide de mutants présentant des pertes ou gains de fonctions de certains gènes, a identifié plusieurs gènes appelés ced (**cell death abnormal**) qui sont impliqués au cours de la mort cellulaire programmée développementale de ce nématode. Les gènes ced-3 et ced-4 sont des effecteurs de l'apoptose, tandis que ced-9 est un répresseur (Ellis et al., 1991; Horvitz, 1999). Un quatrième gène egl-1, pour « egg-laying abnormal », a été découvert plus tard. Le produit de ce gène est un antagoniste de la protéine Ced-9 à laquelle il se fixe et neutralise son effet protecteur, permettant à Ced-4 d'activer Ced-3 entraînant ainsi l'autodestruction de la cellule (Conradt and Horvitz, 1998). Ce travail a permis d'identifier quatre familles de gènes qui sont nécessaires à la bonne exécution de la mort cellulaire chez *C.elegans* et des homologues des produits de ces gènes ont été trouvés chez les mammifères (**figure 3**). Ainsi, les caspases sont les homologues de Ced-3 (Miura et al., 1993), Apaf-1 (Apoptosis activating factor-1) de Ced-4, les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 de Ced-9 et les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 de cette famille de Egl-1 (Hengartner, 2000).



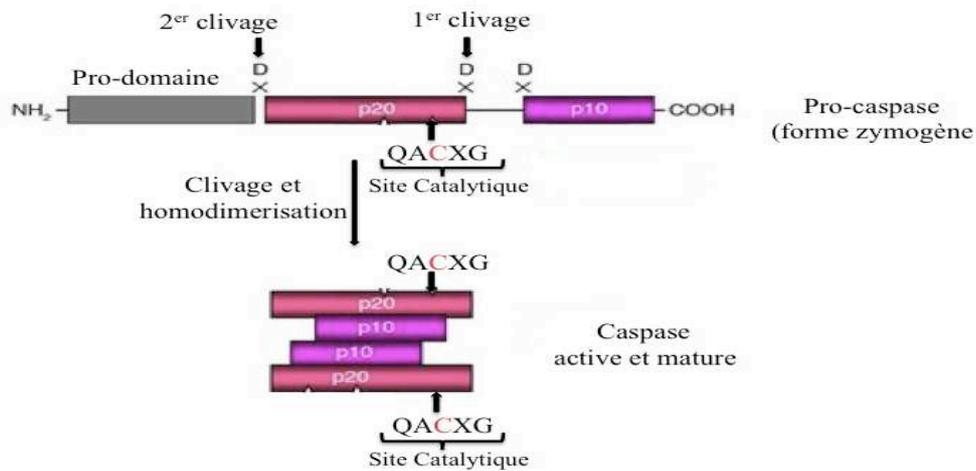
**Figure 3: Les voies apoptotiques conservées au cours de l'évolution.**

D'après Chan et Yang, 2000.

## 2.1. Les caspases.

### 2.1.1. Structure et classification.

Les caspases sont des protéines centrales dans la réponse apoptotique. En effet, ces protéines sont appelées caspases (cystéine aspartate protéase) car ce sont des protéases qui possèdent une cystéine dans leur site catalytique QACxG (où le résidu X est R, Q ou G) qui clivent leurs substrats après un résidu acide aspartique. Ces différentes caspases sont toutes présentes dans la cellule sous la forme de zymogène ou pro-enzyme qui doit être clivé au niveau d'un résidu acide aspartique pour donner la forme active de la protéase. Ces pro-caspases sont constituées de trois domaines : un pro-domaine N-terminal de taille et de séquence variable localisé dans la partie amino-terminale de la protéine et deux domaines, qui après clivage, donnent la grande sous-unité portant le site actif (~20kDa) et la petite sous-unité (~10kDa) localisée dans la partie carboxy-terminale. Cette protéolyse se fait de façon séquentielle. Une première coupure a lieu au niveau de sites consensus présentant des résidus aspartate hautement conservés et libère la grande et la petite sous-unité. Une seconde coupure libère le pro-domaine. L'association de deux hétérodimères constitue la protéine active qui est donc un tétramère constitué de quatre sous-unités et possède deux sites actifs (Walker et al., 1994) (**figure 4**).



**Figure 4: Mécanisme d'activation des caspases.**

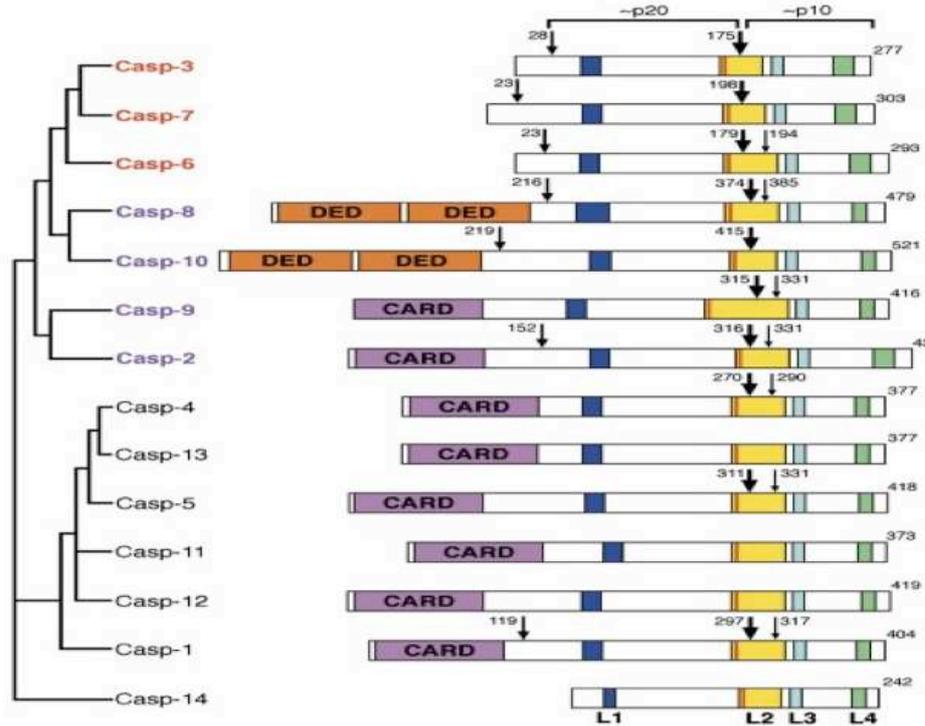
D'après Lavrik et al., J Clin Invest. 2005.

Selon leur fonction, trois groupes de caspases se distinguent selon leur rôle physiologique et leur mode d'activation :

- Un premier groupe (caspases-1, -4, -5 et -11) n'est pas impliqué dans le processus apoptotique mais joue un rôle dans l'inflammation.
- Un deuxième groupe qui comprend les caspases d'amont ou initiatrices (caspase-2, -8, -9 et -10) est impliqué dans l'initiation du signal apoptotique. Ces caspases se caractérisent par un long pro-domaine

au sein duquel se trouvent des domaines d'interaction protéine-protéine servant à leur recrutement au sein de complexes protéiques et leur auto-activation. On distingue deux sous groupes. D'une part, les caspases-8 et -10 qui possèdent deux domaines DED (« Death Effector Domain »), d'autre part, les caspases -2 et -9 avec un pro-domaine de type CARD.

- Un troisième groupe qui comprend les caspases d'aval ou effectrices (caspase-3, -6 et -7). Elles possèdent un pro-domaine court, ne possèdent pas de domaine de recrutement et sont activées principalement par les caspases initiatrices (**figure 5**).



**Figure 5: Structure et classification des caspases en fonction de leur degré d'homologie.**

DED : death effector domain ; CARD : caspase-recruitment domain. Casp-11 et -12 : souris ; caspase-13 : bovin ; autres caspases : homme. Grandes flèches : position du 1<sup>er</sup> clivage d'activation (entre la petite et la grande sous unité) ; moyennes et petites flèches : sites de clivage additionnels. L1-L4 : boucles de surfaces formant le sillon catalytiques. Le résidu catalytique cystéine est représenté en début de la boucle L2 par une ligne orange.

D'après Y. Shi, Mol Cell, 2002.

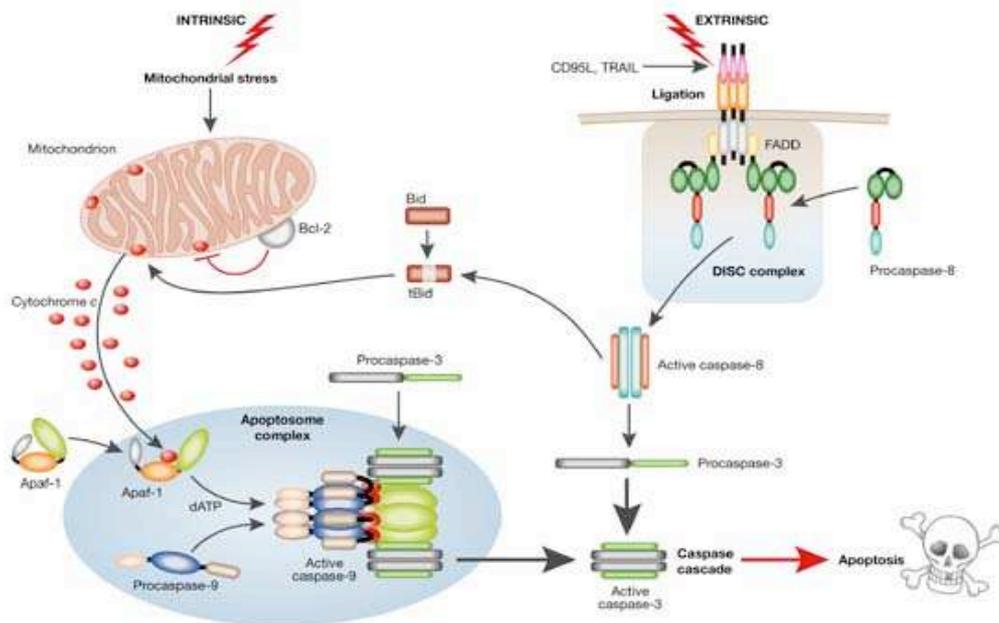
### 2.1.2. Activation des caspases.

Deux grandes voies d'activation des caspases sont décrites : la voie membranaire dite extrinsèque, faisant intervenir la fixation d'un ligand sur son récepteur de « mort » et la voie mitochondriale dite intrinsèque, déclenchée à la suite de stimuli intra- et extracellulaires. Ces deux voies peuvent interagir.

#### 2.1.2.1. Activation des caspases à domaine DED par l'intermédiaire des récepteurs de mort : la voie extrinsèque.

Une des voies qui mène à l'activation des caspases est amorcée par la liaison de ligands spécifiques sur les récepteurs de mort présents à la surface cellulaire. Ces derniers sont une famille de protéines transmembranaires qui appartiennent à la superfamille du récepteur au TNF ; on trouve entre autre le récepteur Fas (ou CD95), les TRAIL-R (Ashkenazi and Dixit, 1998) et TNF-R1. Tous ces récepteurs, qui sont présents à la membrane sous forme de trimères, contiennent un domaine DD (Death Domain) dans leur partie cytoplasmique et sont les seuls parmi les membres de la superfamille du TNF-R qui sont capable d'induire un signal de mort. Le modèle classique de ce sous-groupe est le couple Fas/FasL. La fixation de FasL sur son récepteur induit un changement conformationnel du récepteur, notamment dans sa partie cytoplasmique ce qui aboutit au rapprochement des domaines DD et à l'oligomérisation des trimères préformés. La molécule adaptatrice FADD/MORT1 est recrutée au niveau de la partie intracellulaire du récepteur par son propre DD. Il est important de préciser que le recrutement de FADD est parfois indirect, comme dans le cas du récepteur TNF-R1 où le couplage se fait par l'intermédiaire d'une protéine comportant deux domaine DD : TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain). La protéine FADD possède un domaine DED dans sa partie N-terminale qui lui permet d'interagir avec le pro-domaine de la pro-caspase-8 ((Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996) et de la pro-caspase-10 (Wang et al., 2001) via la dimérisation de leurs domaines DED respectifs. Cet ensemble protéique constitue le DISC (Death Inducing Signaling Complex) (**figure 6**). Les pro-caspases s'autoactivent mutuellement au sein de ce complexe puis médient le clivage des caspases-3 et -7.

L'efficacité avec laquelle la caspase-8 est activée au sein du DISC permet de distinguer deux types de cellules (Scaffidi et al., 1998) selon les voies de signalisation empruntées : les cellules dites de type I dans lesquelles cette activation, très efficace, est suffisante pour conduire directement au clivage et donc à l'activation des caspases effectrices (caspase-3 et -7) (**figure 6**); les cellules de type II qui présentent une formation du DISC notablement réduite et donc une quantité très limitée de caspase-8 activée ne permet pas l'activation directe des caspases effectrices (Algeciras-Schimnich et al., 2003; Barnhart et al., 2003). Dans ce cas, la propagation du signal apoptotique se fera de façon indirecte par le biais d'une boucle d'amplification mitochondriale (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). La caspase-8 va cliver la protéine pro-apoptotique à domaine BH3 seul Bid présente dans le cytosol des cellules. La forme tronquée tBid, qui peut être myristoylée, se transloque alors à la mitochondrie et enclenche la voie intrinsèque de l'apoptose tel que décrit dans le paragraphe suivant (Scaffidi et al., 1998).



**Figure 6: Activation des caspases au sein du DISC et de l'apoptosome.**

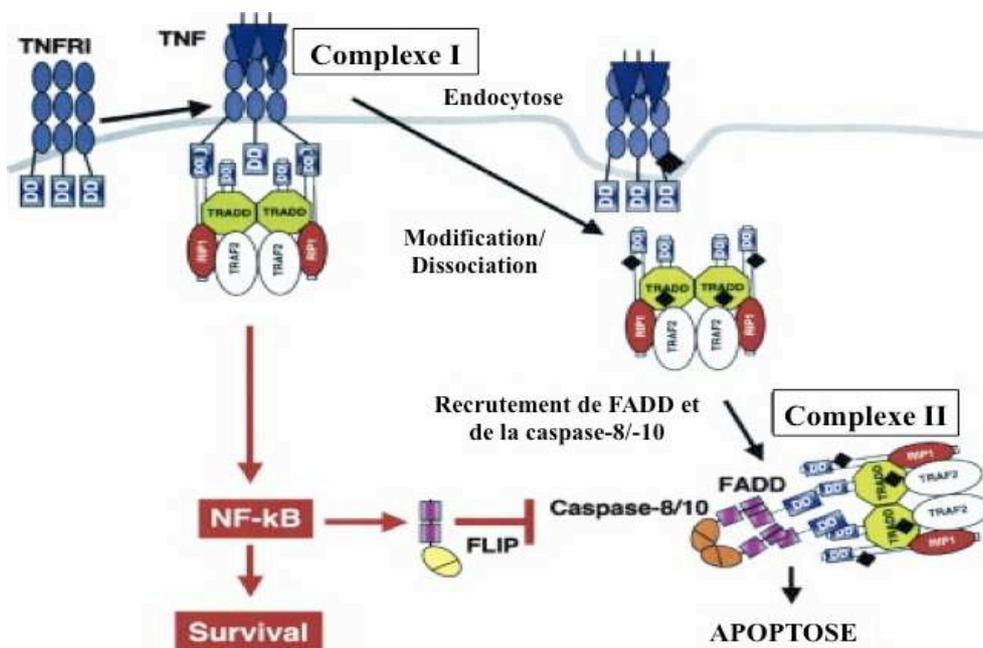
D'après MacFarlane. M & Williams.A.C, EMBO reports, 2004.

La caspase-8 semble être plus importante pour l'induction de l'apoptose que la caspase-10. Bien qu'elle joue un rôle physiologique important dans l'induction de l'apoptose, les fonctions de la caspase-10 sont très mal comprises. Récemment il a été mis en évidence qu'elle était capable de cliver Bid *in vitro* et au niveau d'un site additionnel (Fischer et al., 2006) générant une forme tronquée de Bid plus petite (p13) que celle produite par la caspase-8 (p15). Il n'est pas encore clairement établi si ce clivage différentiel a également lieu *in vivo* après activation des récepteurs de mort. Dans le même ordre d'idées, il faut mentionner que le granzyme B, l'une des sérine protéases contenues dans les granules cytotoxiques des lymphocytes, est capable d'induire l'apoptose par voie mitochondriale en clivant Bid, au niveau du même résidu aspartate que la caspase-10.

La liaison de Fas avec le cytosquelette d'actine se fait par l'intermédiaire de l'eitrine, une protéine de la famille des ERM (Ezrin Radixine Moesine), molécules connues pour notamment assurer un lien entre l'actine et des récepteurs membranaires (Lozupone et al., 2004). Il a été rapporté que cette interaction permettrait la polarisation de Fas à la membrane des cellules et qu'elle favorise la mise en place de la cascade de signalisation de Fas (Lozupone et al., 2004).

La signalisation apoptotique induite par TRAIL est similaire à celle médiée par Fas sauf qu'il existe deux récepteurs : TRAIL-R1 et TRAIL-R2. Deux « récepteurs-leurre », c'est-à-dire ne transduisant aucun signal, TRAIL-R3 et TRAIL-R4, peuvent également être retrouvés à la membrane.

Aussi paradoxal que cela pourrait paraître, certains membres de ce sous-groupe déclenchent, dans certaines conditions, une signalisation de survie, c'est le cas en particulier de TNF-R1. En effet ce récepteur, une fois activé, recrute en premier lieu la protéine adaptatrice TRADD, qui sert de plateforme d'assemblage pour la liaison du facteur TRAF2 et de la sérine-thréonine kinase RIP1 (Receptor Interacting Protein) via des interactions homotypiques des domaines DD ainsi que cIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis 2) qui est recruté par TRAF2. L'ensemble TNF-R1, TRADD, RIP1, TRAF2 et cIAP2 forme le complexe I (Micheau and Tschopp, 2003). TRAF2 entraîne le recrutement de la protéine IKK (I $\kappa$ B kinase) et l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B étant un facteur de transcription qui régule l'expression de gènes de prolifération et d'inhibition de l'apoptose, cette activation soutient, de ce fait, la survie cellulaire. Dans un second temps, l'internalisation du TNF-R1 est accompagnée par une dissociation de TRADD du récepteur et de la formation du complexe II qui comprend TRADD, FADD, caspase-8 et RIP1. Dans le complexe II, la caspase-8 clive RIP1 et initie l'apoptose (**figure 7**). De manière intéressante, si la caspase-8 est inactivée, RIP3 est recruté dans le complexe II qui prend alors le nom de nécrosome. RIP1 et RIP3 sont phosphorylées et enclenchent les mécanismes effecteurs d'une autre forme de mort programmée, la nécroptose (Vandenabeele et al., 2010). Récemment des facteurs critiques agissant en aval de RIP1 et RIP3 dans la nécroptose ont été identifiés (Chan and Baehrecke, 2012).



**Figure 7 : Modèle de signalisation par le récepteur TNF-R1.**

D'après Micheau et J. Tschopp, cell 2003.

#### 2.1.2.2. Activation des caspases à domaine CARD au niveau de l'apoptosome : la voie intrinsèque.

La voie apoptotique dépendante de la mitochondrie est finement régulée au niveau de cet organe par les protéines de la famille de Bcl-2. Cette famille sera décrite dans le chapitre suivant. Cette voie conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et à la libération de protéines apoptogènes de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytoplasme (Green and Kroemer, 2004). Parmi ces protéines, certaines ont un rôle essentiel dans le déroulement du processus apoptotique. C'est en particulier le cas pour le cytochrome c, Smac/Diablo (Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding-protein with a low pI) et Omi/HtrA2 (High temperature requirement protein A2), ou encore l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G (Li et al., 2001b). L'activation auto-protéolytique de la caspase-9 s'effectue au sein d'un complexe protéique appelé apoptosome composé de cytochrome c, Apaf-1, ATP/dATP et pro-caspase-9 (Li et al., 1997). La liaison du cytochrome c cytosolique à Apaf-1 induit un changement de conformation de ce dernier qui peut alors fixer l'ATP ou le dATP. Ceci conduit, avec l'hydrolyse de l'ATP, à un second changement conformationnel d'Apaf-1 permettant l'exposition de son domaine CARD et favorisant la formation de l'apoptosome qui est le résultat de l'association de sept protéines Apaf-1. La pro-caspase-9 est simultanément recrutée par interaction homotypique entre son propre domaine CARD et celui d'Apaf-1. Elle subit alors un changement de conformation induisant une augmentation de son activité catalytique d'un facteur mille. Une fois activée par autoclivage, la caspase-9 est libérée dans le cytosol où elle va être capable d'activer les caspases en aval, comme la caspase-3.

Bien qu'il ait tout d'abord été démontré que l'activation de la caspase-9 était dépendante de son clivage (Li et al., 1997), il semble que celle-ci puisse aussi être active au sein de l'apoptosome et induire l'apoptose sans être clivée. En effet, Srinivasula et al. ont montré qu'*in vitro*, malgré la mutation du site de clivage de la caspase-9, il y a tout de même formation de l'apoptosome et activation des caspases effectrices (Srinivasula et al., 2001).

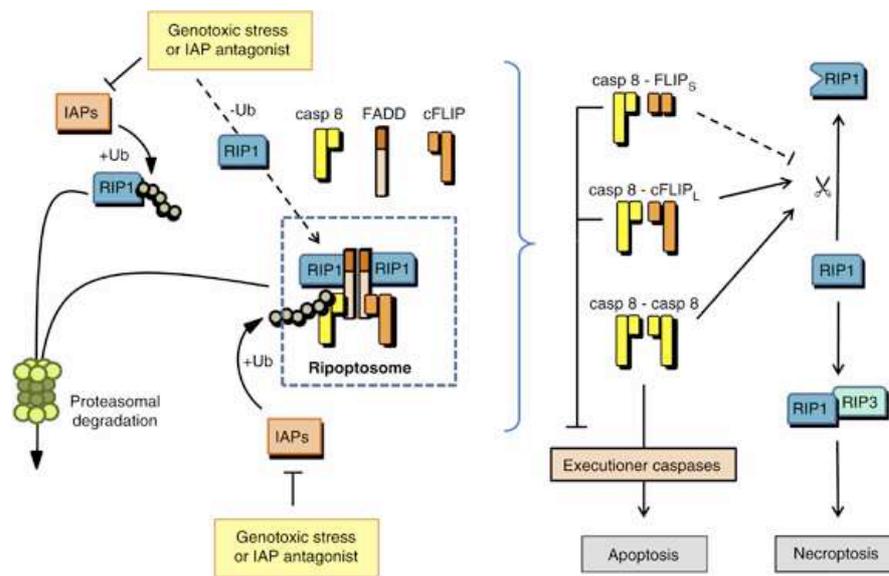
#### 2.1.2.3. Activation des caspases effectrices.

L'activation des caspases effectrices s'effectue en deux étapes. Un premier clivage protéolytique à l'intérieur de l'inter-domaine de liaison par les caspases initiateuses sépare la petite sous-unité et la grande sous-unité. Ceci induit d'importantes modifications de conformation, ce qui confère à la caspase une activité catalytique minimale, mais suffisante pour que dans un second temps elle élimine par protéolyse son prodomaine, permettant la formation de l'hétérotétramère de la caspase totalement active (Riedl et al., 2001).

#### 2.1.2.4. Autres modes d'activation des caspases : le Ripoptosome et le PIDDosome.

##### - Le Ripoptosome.

Récemment il a été suggéré que l'apoptose pouvait être induite par une nouvelle plateforme de signalisation comprenant RIP1, FADD et la caspase-8 appelée Ripoptosome qui s'assemble lorsque les IAP sont inhibées par un stress génotoxique ou par des Smac mimétiques (Feoktistova et al., 2011; Tenev et al., 2011). À la différence du complexe II sous TNF, le ripoptosome ne nécessite pas les récepteurs de mort pour s'assembler (**figure 8**).



**Figure 8: Le Ripoptosome.**

Dans des conditions basales, les IAPs ciblent constitutivement RIP1 pour être dégradé par le protéasome. La diminution ou l'inhibition des IAPs, provoquée par le stress génotoxique ou des antagonistes des IAPs, empêche la dégradation de RIP1 et stimule la formation du complexe du ripoptosome, composé de la caspase-8, FADD, RIP1 et cFLIP, indépendamment de l'activation des récepteurs de mort.

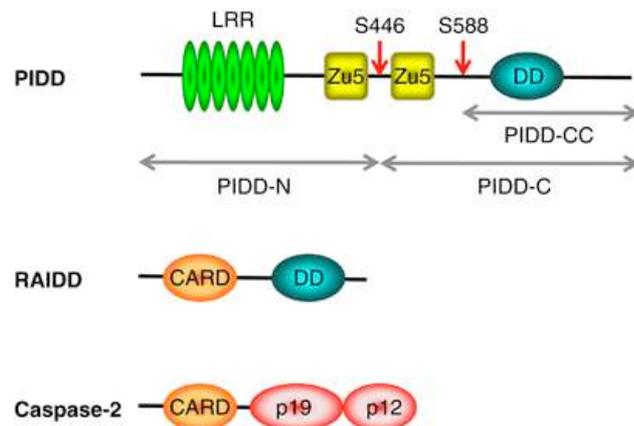
D'après Long JS et Ryan KM, Oncogene 2012.

Dans les conditions basales, les composants de ce complexe sont ubiquitinilés par les IAP et dégradés dans le protéasome. Lors de l'exposition à des Smac mimétiques ou à un stress génotoxique, les IAP sont déplétées résultant en un assemblage spontané du Ripoptosome. Les conséquences de cet assemblage sont sous la dépendance de FLIP. La formation d'homodimères de caspase-8 en l'absence de FLIP conduit à son activité catalytique et à l'apoptose. La formation d'hétérodimères caspase-8/FLIP<sub>L</sub> résulte en une activité catalytique limitée, qui n'est pas suffisante pour induire l'apoptose mais est capable de cliver RIP1, ce qui conduit au désassemblage du Ripoptosome et à la survie. Enfin, la

formation d'hétérodimères caspase-8/FLIP<sub>s</sub> empêche l'activation de la caspase-8. Il y a alors association de RIP3 avec RIP1 ce qui conduit à la nécroptose.

*- Le PIDDosome.*

Le PIDDosome est une plateforme de signalisation dont l'assemblage conduit à l'activation de la caspase-2. Il comprend PIDD, RAIDD et la caspase-2 (Tinel and Tschopp, 2004) (**figure 9**).



**Figure 9 : Les composants du PIDDosome.**  
D'après Bouchier-Hayes et al., CDD, 2012.

PIDD (p53-induced protein with a death domain) a été originellement identifié comme un gène inductible par p53. La protéine comprend un domaine N-terminal riche en leucine deux domaines d'interaction ZU5 et un domaine de mort (DD) similaire à CARD. PIDD est constitutivement clivé à deux sites distincts conduisant à deux fragments C-terminaux : PIDD-CC et PIDD-C. PIDD-CC est le médiateur principal de l'activation de la caspase-2. Le PIDDosome consiste en un anneau de 5 PIDD-CC superposé sur un anneau de 7 RAIDD, ces deux types de protéines interagissant via leur DD. Le domaine CARD des protéines RAIDD s'associe avec 7 molécules de caspase-2 ce qui conduit à leur activation par proximité. Cependant, cette activation de la caspase-2 n'est pas toujours synonyme d'apoptose et les cellules peuvent survivre même à des quantités importants de caspase-2 active. Ainsi, même en réponse aux dommages à l'ADN, le rôle du PIDDosome dans l'apoptose reste controversé et il a été suggéré que dans certains cas la caspase-2 pouvait participer à d'autres événements cellulaires tels que la régulation du cycle cellulaire (Ho et al., 2009).

**2.1.3. Substrats des caspases.**

Une fois activées, les caspases sont capables de se cliver entre elles formant ainsi un réseau intracellulaire dans lequel chaque caspase est capable d'activer par clivage d'autres caspases. Ainsi, la caspase-3 est capable de cliver les caspases-2, -6, -8 et -9, tandis que la caspase-9 est capable de cliver

les caspases-3 et -7 (Slee et al., 1999). Ce processus permet l'amplification du signal quelle que soit la voie initiale d'activation des caspases (récepteurs de mort ou apoptosome). Outre les caspases elles-mêmes, plusieurs centaines de substrats protéiques des caspases ont été découverts. Bien que généralement les conséquences de ces clivages soient mal comprises, certaines coupures de substrats ont été décrites comme étant impliquées dans des modifications morphologiques et biochimiques. La protéolyse conduit suivant les cas à une inactivation ou à une activation dérégulée des protéines cible qui peuvent être cytoplasmiques ou nucléaires et qui participent à de nombreuses fonctions cellulaires comme des protéines de la structure cellulaire, des protéines nucléaires, des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN, des protéines kinases, des protéines impliquées dans les voies de transduction, des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et dans la prolifération. Les différents substrats peuvent être répartis en groupes fonctionnels, dont certains membres représentatifs sont mentionnés dans le **tableau 1** :

	Fonction physiologique	effet du clivage	Conséquence du clivage	site de clivage
<b>Groupe I</b>				
Bad	Pro-apoptotique	activateur	Effets pro-apoptotiques	EQED(14)
Bid	Pro-apoptotique	activateur	Effets pro-apoptotiques	LQTD(59)
Bcl-2	Anti-apoptotique	inactivateur	Effets pro-apoptotiques	DAGD(34)
Bcl-xL	Anti-apoptotique	inactivateur	Effets pro-apoptotiques	HLAD(61)
c-IAP1	inhibiteur de caspases	inactivateur	Effets pro-apoptotiques	ENAD(372)
XIAP	inhibiteur de caspases	inactivateur	Effets pro-apoptotiques	SESD(242)
<b>Groupe II</b>				
FAK	Tyrosine kinase impliquée dans la formation des contacts focaux	inactivateur	Dé-assemblage des complexes d'adhérence focales	DQTD(772)
CAS	Protéine adaptatrice impliquée dans la signalisation intégrine	inactivateur	Dé-assemblage des complexes d'adhérence focales et arrêt des signaux de survie	DVPD(416)
Paxilline	Composant des complexes focaux	inactivateur	Dé-assemblage des complexes d'adhérence focales et détachement cellulaire	NPQD(102)
Plakophilin-1	Composant des desmosomes	inactivateur	Perte des contacts cellule-cellule	inconnu
$\beta$ -caténine	Constituant des jonctions adhérentes	inactivateur	Perte des contacts cellule-cellule	SYLD(32)
E-cadhérine	Protéine d'adhérence des jonctions adhérentes	inactivateur	Perte des contacts cellule-cellule	DTRD(750)
<b>Groupe III</b>				
Filamine	Permet le lien entre l'actine et les protéines membranaires	inactivateur	Impliquée dans la réorganisation cytosquelettique	inconnu
Plectin	Permet l'interconnexion entre les différents types de filaments	inactivateur	Entraîne la réorganisation des filaments intermédiaires	ILRD(2395)
Fodrin	Composant du cytosquelette sous cortical	inactivateur	Déstabilise le cytosquelette cortical	DETD(1185)

Vimentine	Filament intermédiaire	inactivateur	Déstabilise l'organisation des filaments intermédiaires	DSVD(85)
Gelsoline		inactivateur	Entraîne la dépolymérisation de l'actine	DQTD(403)
Cdc 42	Rho GTPase impliquée dans le remodelage de l'actine	inactivateur	Abolie les protéines anti-apoptotiques	DLRD(121)
Tiam 1	Protéine GEF de la Rho GTPase Rac	inactivateur	Incapacité d'induire l'échange GDP-GTP	DETD(993)
Vav-1	Protéine GEF de la Rho GTPase Rac	inactivateur	Incapacité d'induire l'échange GDP-GTP	DQID(150)
<b>Groupe IV</b>				
hnRNPs (A1/b2)	Protéine impliquée dans l'épissage	inactivateur	Réduit	SYND(262)
RHA	Hélicase A d'ARN	inactivateur	Réduit l'efficacité de la transcription	EEVD(167)
eIF4B	Facteur d'initiation de la traduction	inactivateur	Participe à l'arrêt de la traduction	DETD(45)
DAP5	Membres des facteurs de traduction de la famille eIF4g	activateur	Participe à la traduction des protéines liées à l'apoptose (comme Apaf-1)	DETD(772)
<b>Groupe V</b>				
Cycline E	Régule la transition G1-S	inactivateur	Inactivation de cdk2	inconnu
MDMX et MDM2	Se lie à p53 et entraîne sa dégradation	inactivateur	Permet de stabiliser p53	DVPD(361)
NuMa	Protéine impliquée dans la mitose	inactivateur	Contribue au démantèlement du noyau	DSLD(1712)
<b>GROUPE VI</b>				
Akt	Kinase impliquée dans la survie	inactivateur	Perte de l'activité kinase et des propriétés anti-apoptotiques	TVAD(108)
Lyn	Activité tyrosine kinase dans les cellules B	activateur	Elimination d'un domaine inhibiteur	DGVD(233)
CaMK IV	Calcium/calmoduline kinase	inactivateur	Clivage dans le site catalytique, perte de l'activité kinase	YWID(31)
ROCK I	Sérine/thréonine kinase impliquée dans la contraction acto-myosine	activateur	Kinase constitutivement active, blebbing membranaire	DETD(1113)

**Tableau 1 : Présentation de substrats des caspases appartenant aux différents groupes.**

D'après Fischer et al. CDD 2003.

Les caspases peuvent donc agir sur la majorité des fonctions cellulaires et cette grande diversité de substrats semble indispensable à l'exécution du programme apoptotique.

#### **2.1.4. Les inhibiteurs des caspases.**

Les caspases sont les effecteurs centraux de l'apoptose, processus impliqué dans le développement et l'homéostasie des organismes multicellulaires. Son dysfonctionnement participe à la pathogénèse de nombreuses maladies humaines. Par ailleurs, les caspases sont associées à d'autres processus comme la différenciation du muscle squelettique ou des kératinocytes (Hail et al., 2006; Segal-Bendirdjian et al., 2005). Il n'est donc pas surprenant que leur activation soit finement régulée à différents niveaux par des molécules inhibitrices que sont la protéine FLIP (Flice-inhibitory Protein), la Hsp70 et les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein).

#### 2.1.4.1. Régulation de l'activation des caspases au niveau de la formation du DISC.

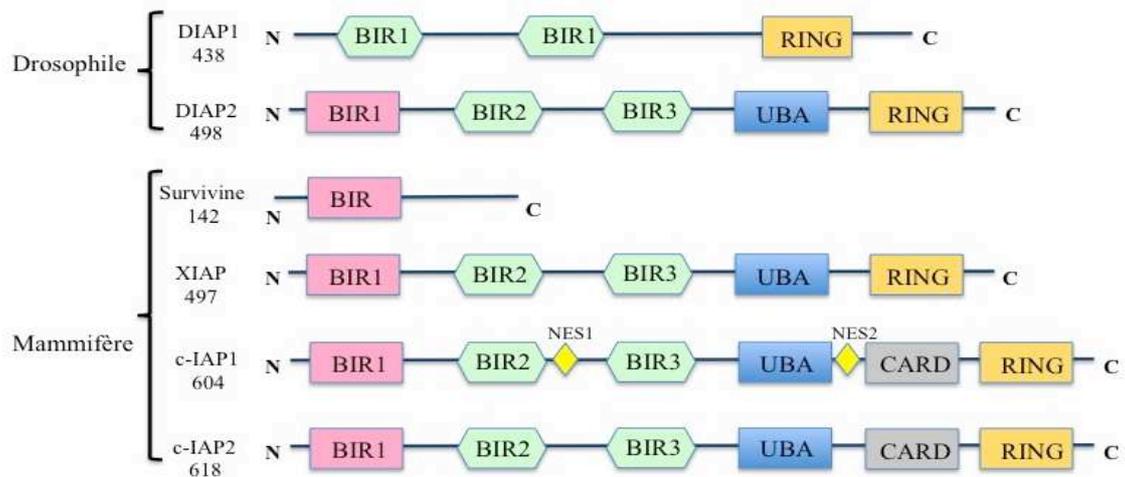
L'étape de recrutement et/ou d'activation de la caspase-8 et -10 au niveau du DISC peut être inhibée par un analogue catalytiquement inactif de ces caspases, la protéine FLIP. C'est une protéine qui possède deux domaines DED et qui fonctionne en se liant à FADD et donc en empêchant le recrutement de la caspase-8 au niveau du DISC (Irmeler et al., 1997). La surexpression de FLIP a été observée dans plusieurs cellules humaines cancéreuses, comme le cancer de l'ovaire, du côlon, du sein, de la prostate et le glioblastome. Cette expression accrue confère à ces cellules tumorales une résistance à l'apoptose induite par les récepteurs de mort (Geserick et al., 2008; Li et al., 2007; Mezzanzanica et al., 2004; Rogers et al., 2007; Wilson et al., 2007). Jusqu'à présent, 11 variants d'épissage de FLIP ont été identifiés et seulement deux d'entre eux sont traduits en protéines cellulaires: la forme courte, FLIP<sub>S</sub> à 26 kDa et la forme longue FLIP<sub>L</sub> à 55 kDa (Bagnoli et al., 2010).

#### 2.1.4.2. Régulation de l'activité des caspases au niveau de la formation de l'apoptosome.

En réponse à un stress, la protéine Hsp70 joue un rôle anti-apoptotique à plusieurs niveaux. En effet, cette protéine inhibe la translocation de Bax à la mitochondrie, bloque la libération du cytochrome c, empêche la formation du complexe Apaf-1/cytochrome c/caspase-9 qui est nécessaire à l'activation de cette caspase (Arya et al., 2007).

#### 2.1.4.3. Régulation de l'activation et de l'activité protéolytique des caspases par les IAPs.

Les IAPs ont été identifiées chez le baculovirus par l'équipe de Miller en 1993. Des homologues ont ensuite été décrits chez la drosophile, les mammifères, le nématode *C.elegans* ou encore les plantes (Kim et al., 2011b). Les cellules de mammifères contiennent huit membres : XIAP (X-linked IAP), cIAP1, cIAP2 (cellular IAP 1 et 2), NAIP (Neuronla Apoptosis Inhibitory Protein), Apollon, Livin, ILP2 (IAP-Like protein 2) et la survivine (Gyrd-Hansen and Meier, 2010) (**figure 10**). Les premières études sur ces protéines se sont focalisées sur leur activité anti-apoptotique et ont montré que parmi toutes les IAPs, seule XIAP possède la capacité d'inhiber par simple contact l'activité enzymatique des caspases -3 et -7 et -9 (Eckelman and Salvesen, 2006). La caractéristique commune de toutes les IAPs est la présence, dans leur structure, d'un ou de plusieurs domaines BIR (Baculovirus IAP Repeat) positionnés en N-terminal, qui permettent leur interaction avec les caspases et sont essentiellement à la fonction anti-apoptotique des IAPs (Miller, 1999).



**Figure 10: Les domaines caractéristiques des IAPs.**

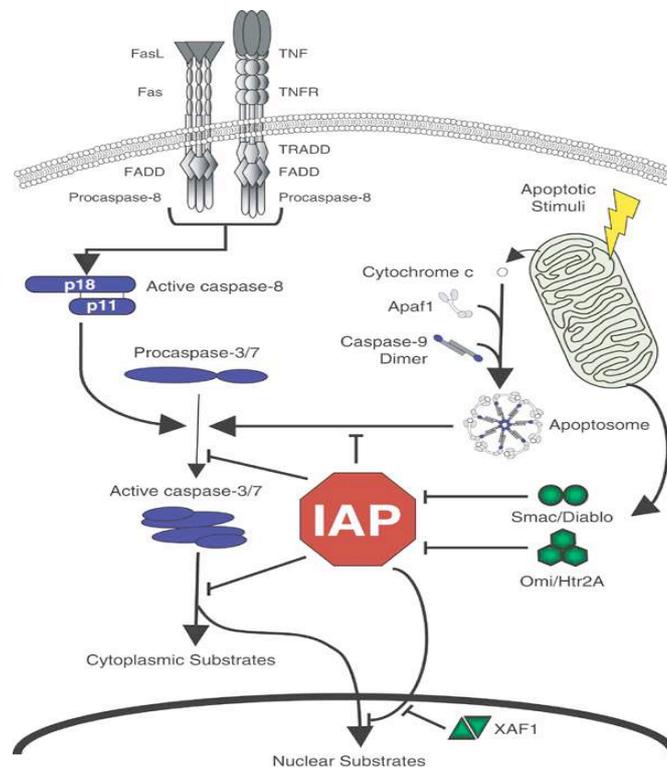
BIR: baculovirus IAP repeat; UBA: Ubiquitine-Associating domain; CARD: caspase-recruitment domain; NES: séquence d'export nucléaire; E2: enzyme de conjugaison de l'ubiquitine.

XIAP est capable d'inhiber les caspases selon deux modes d'actions différents :

- Inhibition du site catalytique : la région entre le BIR1 et le BIR2 de XIAP interagit directement avec la poche catalytique de la caspase-3 et -7 (Chai et al., 2001). Cette interaction bloque l'accessibilité des substrats et empêche ainsi leur protéolyse. Le domaine BIR2 de XIAP lie les motifs IBM (IAP Binding Motif) situé dans la région N-terminale des petites sous-unités catalytiques des caspases-3 et -7 activées. Cette liaison augmente l'affinité de XIAP pour les caspases, ce qui amplifie l'ancrage de XIAP dans le site catalytique de l'enzyme. Cette interaction est indispensable pour une inhibition optimale de ces protéases.
- Inhibition de l'homodimérisation : l'autre stratégie utilisée par XIAP pour inhiber les caspases implique une liaison du domaine de BIR3 sur les sites d'homodimérisation de la caspase-9. Cette interaction va ainsi empêcher la multimérisation indispensable à l'activation de la caspase-9 (Srinivasula et al., 2001).

En plus d'inhiber l'apoptose par ce mécanisme caspase-dépendant, les IAPs exercent leur fonction inhibitrice de la mort cellulaire par un processus non lié directement à leur capacité à interagir avec les caspases. Le domaine RING, joue un rôle central dans ce mécanisme indirect d'inhibition des caspases. Ce domaine RING est présent à l'extrémité carboxy-terminale de XIAP, cIAP1 et 2, ILP2 et ML-IAP, et confère aux IAP une activité E3-ubiquitine ligase. Les IAPs peuvent ainsi catalyser leur propre ubiquitination et celle des protéines associées ce qui entraîne leur dégradation par le protéasome.

XIAP peut être inhibée à son tour par les facteurs Smac/Diablo et Omi/HtrA2 libérés de la mitochondrie. En effet, ces facteurs, en se liant à XIAP, empêchent son interaction avec les caspases (figure 11).



**Figure 11: Rôles des IAPs dans la régulation des voies de signalisation apoptotique.**

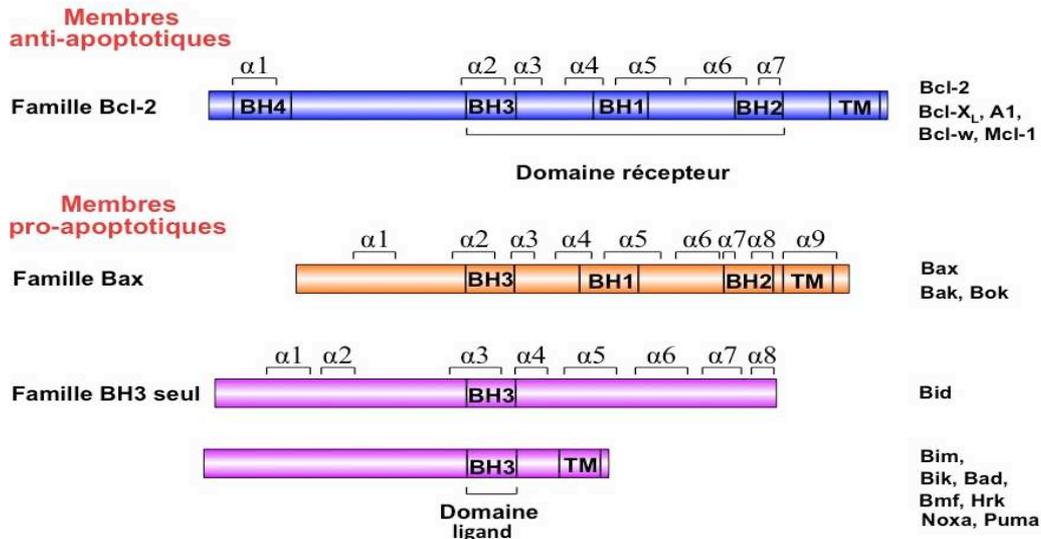
D'après Liston et al., Oncogene, 2003.

## 2.2. Les protéines de la famille Bcl-2.

Bcl-2 « B cell lymphoma 2 », le prototype de cette famille de protéine, qui compte près d'une vingtaine de membres, a été découverte en 1985 dans les lymphomes B de type folliculaire par S.J. Korsmeyer (Bakhshi et al., 1985). Par la suite, d'autres équipes ont montré que la surexpression de la protéine Bcl-2 par des lymphocytes conduisait à la formation de lymphomes et que la translocation chromosomique t(14-18)(q32;q21) du gène bcl-2 dans le locus de la chaîne lourde des immunoglobulines était à l'origine de l'expression constitutive de la protéine Bcl-2 responsable de la transformation des lymphocytes et donc de l'émergence de telles pathologies (Tsujimoto et al., 1985a; Tsujimoto et al., 1985b).

### 2.2.1. Structure et classification.

L'alignement des séquences des membres de la famille de Bcl-2 a permis la mise en évidence de séquences conservées d'acides aminés nommées BH pour « Bcl-2 Homology ». Ces protéines possèdent de un à quatre domaines BH participant à la formation d'hélices  $\alpha$ . Selon le nombre de ces domaines BH et la fonction de ces molécules, on peut diviser les membres de cette famille en trois groupes (Gross et al., 1999) (**figure 12**).



**Figure 12: Classification des différentes protéines de la famille Bcl-2.**

D'après Cory.S et Adams.JM, Nature 2002.

- Le groupe I (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1) est composé des protéines anti-apoptotiques qui possèdent les quatre motifs BH. De plus, à leur extrémité C-terminale, elles présentent une séquence hydrophobe leur permettant de s'ancrer dans la membrane de différentes organelles comme la membrane externe de la mitochondrie, la membrane du réticulum endoplasmique ou l'enveloppe nucléaire (Krajewski et al., 1993).
- Les protéines du groupe II (Bax et Bak) sont des membres pro-apoptotiques à multidomaines. Elles contiennent des domaines BH1, BH2 et BH3. En l'absence de signaux de mort, Bax est localisée dans le cytosol de la cellule sous forme de monomère, tandis que Bak réside à la membrane externe mitochondriale où elle est maintenue sous forme inactive via VDAC2 (Cheng et al., 2003) ou des membres anti-apoptotiques tels que Bcl-xL ou Mcl-1 (Danial, 2007). Au cours de l'apoptose, Bax subit un changement conformationnel induisant sa relocalisation à la mitochondrie, son oligomérisation et son insertion dans la membrane externe de cette dernière (Wolter et al., 1997).
- Celles du groupe III (Bid, Bad, Bim, Bmf, Noxa, Puma) sont des protéines pro-apoptotiques dites à BH3 seul.

### **2.2.2. Mécanismes d'action des protéines de la famille Bcl-2 au niveau de la mitochondrie.**

De nombreuses études ont montré que les protéines Bcl-2 et Bcl-xl inhibent la libération du cytochrome c (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997) alors que Bax et Bak l'induisent (Jurgensmeier et al., 1998).

Les cellules de souris invalidées à la fois pour les gènes Bax et Bak sont résistantes à toutes formes d'induction d'apoptose impliquant la mitochondrie et ne présentent pas de libération de cytochrome c (Wei et al., 2001). Ceci suggère que la présence de Bax ou Bak est indispensable aux événements mitochondriaux de l'apoptose.

Les protéines Bcl-2 et Bax sont capables de s'hétérodimériser par l'intermédiaire des domaines BH ; les régions BH1, 2 et 3 forment une poche hydrophobe capable de lier le domaine BH3 d'un autre membre de la famille (Borner, 2003) et confèrent aux protéines de la famille Bcl-2 la capacité de s'associer sous formes d'homo- ou d'hétérodimères. La surexpression de Bax inhibe les propriétés anti-apoptotiques de la protéine Bcl-2 (Oltvai et al., 1993). Ceci suggère que les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 se neutralisent après hétérodimérisation et que le rapport entre les différents membres présents au niveau de la mitochondrie déterminerait alors la sensibilité ou la résistance d'une cellule à l'apoptose.

Deux modèles ont été proposés pour expliquer la libération de facteurs apoptogènes de la mitochondrie. D'une part, la rupture non spécifique de la membrane externe par gonflement de la matrice mitochondriale et d'autre part, la formation de canaux autonomes par les membres de la famille Bax.

#### **2.2.2.1. La théorie de la rupture de la membrane externe des mitochondries.**

Ce modèle suggère l'ouverture d'un méga-canal mitochondrial appelé PTP (Permeability Transition Pore), complexe multiprotéique inséré à la jonction des membranes mitochondriales interne et externe (Green and Kroemer, 2004). Ce complexe comprendrait le canal anionique voltage dépendant (VDAC) de la membrane externe, le translocateur de nucléotides à adénine (ANT) de la membrane interne, la cyclophiline D localisée dans la matrice et d'autres protéines comme l'hexokinase et le récepteur périphérique des benzodiazépines. Dans les conditions physiologiques, le PTP permet le transport finement régulé des métabolites ( $PM < 1500$  Da) nécessaires au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire et à la synthèse d'ATP. L'ouverture du PTP, induite par le  $Ca^{2+}$ , les espèces activées de l'oxygène, des changements de pH (Crompton, 1999) et probablement par Bax (Marzo et al., 1998), crée une soudaine augmentation dans la perméabilité de la membrane interne aux molécules de masses inférieures à 1,5 kDa. Cet événement, la « perméabilité de transition », résulte de la

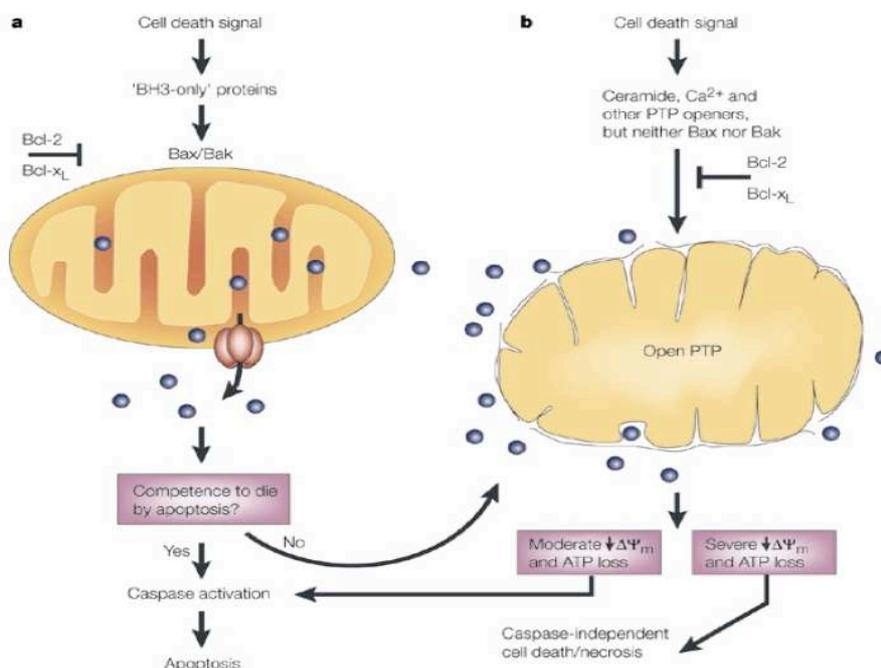
dissipation immédiate du potentiel mitochondrial transmembranaire ( $\Delta\Psi_m$ ) dépendant de protons et de l'équilibre chimique entre le cytoplasme et la matrice mitochondriale (Crompton, 1999). Cela entraîne progressivement un gonflement osmotique de la matrice à cause de sa forte concentration en solutés et peut mener au final à la rupture de la membrane externe et la libération du cytochrome c et des différentes protéines apoptogènes (**figure 13**).

Cependant, l'implication du PTP au cours de la mort cellulaire programmée est controversée car de nombreuses études indiquent que la sortie du cytochrome c peut avoir lieu sans l'ouverture du PTP et qu'en fait elle précède même cette ouverture dans la plupart des cas.

#### 2.2.2.2. L'hypothèse des canaux autonomes.

Selon ce modèle, le processus de perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP) est dû à la formation par Bax/Bak de canaux assez larges pour permettre le passage de protéines solubles de l'espace intermembranaire (**figure13**).

Un des indices pour comprendre comment les protéines de la famille Bcl-2 exercent leur activité mitochondriale est venue de la structure en trois dimensions de Bcl-xL qui ressemble à celle des domaines formant des pores de certaines toxines bactériennes (Muchmore et al., 1996). Il a ainsi été mis en évidence que les membres pro- et anti-apoptotiques peuvent former des canaux ioniques ou protéiques dans des membranes phospholipidiques synthétiques. En effet, les hélices qui les constituent sont susceptibles de former après oligomérisation, des pores analogues à ceux induits par ces toxines. Ainsi, Bcl-2, Bcl-xL, Bax (Schendel et al., 1998) ont été décrits comme pouvant former des canaux ioniques dans les liposomes ainsi que dans les bicouches lipidiques planes. De plus Bcl-2 est capable d'empêcher la formation des canaux Bax dans les liposomes (Antonsson et al., 1997). Les propriétés intrinsèques des canaux formés par les protéines pro- et anti-apoptotiques sont différentes de façon significative, ce qui permettrait d'expliquer leurs rôles opposés dans la libération du cytochrome c (Schlesinger et al., 1997). Bax peut s'associer en oligomères pour former des canaux protéiques (Dewson and Kluck, 2009), des pores protéolipidiques (Garcia-Saez et al., 2010) ou encore participer à la création de canaux de types MAC (Mitochondrial Apoptosis-induced Channel) (Kinnally and Antonsson, 2007), constitués en partie par Bax, pour libérer les facteurs apoptogènes. Un changement conformationnel est nécessaire à cette oligomérisation. Ce changement rend inactif le sillon hydrophobe formé par les domaines BH1-3 empêchant ainsi toute interaction avec des membres anti-apoptotiques (Borner, 2003). Il a été rapporté que la formation de canaux composés de multimères Bax/Bak seraient nécessaires dans la mesure où un tétramère de Bax permet le passage du cytochrome c, mais pas celui des protéines plus volumineuses, comme par exemple Smac/Diablo (Martinou and Green, 2001).



**Figure 13: Modèles de sortie du cytochrome c et des autres facteurs apoptogènes de l'espace intermembranaire mitochondrial.**

a) Modèle des canaux autonomes. b) Modèle de la rupture de la membrane externe mitochondriale.

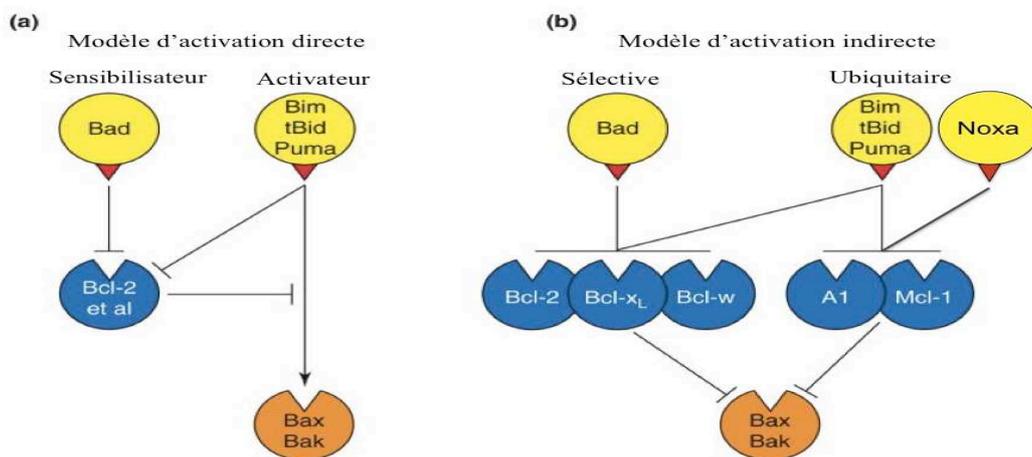
D'après J.C Martinou et D.R. Green, Nat Rev Mol Cell Biol, 2006.

### 2.2.3. Le rôle des protéines à domaine BH3 seul.

Les protéines à domaine BH3 seul sont des membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Un premier modèle propose qu'un sous-ensemble de protéines à domaine BH3 seul dites « activatrices » à savoir Bim, Bid (Certo et al., 2006; Kuwana et al., 2005; Letai et al., 2002) et de manière plus controversée Puma (Cartron et al., 2004a) ont la capacité d'activer Bax ou Bak par interaction directe (Desagher et al., 1999; Kuwana et al., 2005; Kuwana et al., 2002). Les autres protéines dites « sensibilisatrices », par exemple Bad et Noxa, quant à elles, activent indirectement Bax et Bak via l'inhibition des complexes formés entre les membres anti-apoptotiques et les protéines activatrices (Kuwana et al. 2005 ; Letai et al., 2002).

Un second modèle avance l'hypothèse alternative selon laquelle les protéines à domaine BH3 seul activeraient Bax ou Bak non pas directement mais indirectement, en s'hétérodimérisant avec les membres anti-apoptotiques pour neutraliser leur activité et libérer ainsi Bax et Bak (Chen et al., 2005; Willis et al., 2005; Willis et al., 2007). Dans ce modèle, les protéines à BH3 seul sont séparées en deux groupes : les ubiquitaires et les sélectives. Les protéines ubiquitaires sont ainsi nommées par leur capacité à se lier à toutes les protéines anti-apoptotiques sans exception, c'est le cas par exemple de Bim, Bid et Puma qui sont de très puissants inducteurs de l'apoptose. Les sélectives ont, quant à elle, un profil d'interaction avec les protéines anti-apoptotiques plus restreint pour Bcl-2, Bcl-xL (Bik, Bad,

Bmf) ou Mcl-1 (Noxa) ; ce qui, de fait, les rend beaucoup moins puissantes (Adams and Cory, 2007; Chen et al., 2005). Ces deux modèles s'appliquent à des situations distinctes et il est très probable que ces deux modèles cohabitent pour réguler l'activation de Bax et/ou Bak et le déclenchement de l'apoptose. En effet, l'équipe qui a décrit le modèle indirect a dernièrement proposé que le déclenchement de l'apoptose nécessite les deux mécanismes (Merino et al., 2009). Ainsi un nouveau modèle d'activation, tenant compte des deux mécanismes indépendants précédemment décrits a été proposé. Les protéines à domaine BH3 seul sont divisées en activateurs et sensibilisateurs sans pour autant oublier les différentes affinités qu'elles peuvent avoir avec les membres anti-apoptotiques (Leber et al., 2010) (**figure 14**).



**Figure 14 : Deux modèles d'activation de Bax et Bak par les protéines à domaine BH3 seul.**

D'après JM Adams et S. Cory. Current Opinion in Immunology 2007.

#### 2.2.4. Régulation de l'activité des membres de la famille Bcl-2.

L'existence de systèmes de régulation très complexes des membres Bcl-2 découle de leur rôle essentiel dans le processus apoptotique. Ainsi, en plus d'une régulation transcriptionnelle, différents mécanismes post-traductionnels permettent un contrôle très fin de l'activité des protéines de cette famille.

##### 2.2.4.1. Régulation des membres anti-apoptotiques.

La surexpression de Bcl-2 bloque la plupart des stimuli apoptotiques et inhibe l'activation de Bax (Murphy et al., 2000). Il n'est donc pas étonnant que la cellule déploie diverses stratégies visant à réduire l'activité de cette protéine mais également des membres anti-apoptotiques de la même famille.

Les protéines de la famille Bcl-2 sont souvent régulées par des modifications post-traductionnelles qui contrôlent leur activité, leurs localisations subcellulaires et leur demi-vie.

#### ❖ **Bcl-2.**

##### • **Phosphorylation :**

Bcl-2 est phosphorylée au niveau de la région reliant les domaines BH3 et BH4. Cette région est riche en proline et contient plusieurs résidus sérines et thréonine pouvant être phosphorylés (Blagosklonny, 2001). Les premières expériences avaient montré que la phosphorylation de la Ser 70 de Bcl-2 par PKC était requise pour sa fonction anti-apoptotique, généralisant alors l'idée que la phosphorylation de Bcl-2 augmentait la survie cellulaire des cellules privées en IL-3 (Ito et al., 1997; May, 1997). De plus, la phosphorylation de Bcl-2 par PKC $\alpha$  augmente non seulement sa fonction anti-apoptotique mais également la résistance aux agents chimiothérapeutiques dans des cellules de leucémies humaines (Ruvolo et al., 1998). La phosphorylation de Bcl-2 est néanmoins très controversée. En effet, plusieurs travaux rapportent, d'une manière générale, que la phosphorylation de Bcl-2 inhibe sa fonction anti-apoptotique tandis que d'autres travaux tendent à prouver le contraire. Par exemple, dans les cellules du cancer de la prostate traitées à l'IL-3, la phosphorylation de Bcl-2 diminue son interaction avec Bax libérant ainsi Bax du complexe Bcl-2/Bax, induisant ainsi l'apoptose (Haldar et al., 1996). De même, l'induction de l'apoptose par le monoxyde d'azote dans des cellules neuronales entraîne l'activation de p38MAPK et ERK, et la phosphorylation de la sérine 70 de Bcl-2. Cette phosphorylation transloque Bax à la mitochondrie, déclenchant ainsi le processus apoptotique (Ishikawa et al., 2003). D'autres phosphorylations entraînent, quant à elles, la dégradation de Bcl-2 par le protéasome, c'est notamment le cas de la phosphorylation sur la sérine 70 et la sérine 87 (Breitschopf et al., 2000; Lin et al., 2006). A l'inverse, certaines phosphorylations de Bcl-2 augmentent la stabilité de son activité anti-apoptotique, c'est le cas de la phosphorylation par la voie MAPK/Erk1/2 (Breitschopf et al., 2000).

##### • **Clivage:**

Différentes études ont montré que la protéine Bcl-2 pouvait être clivée par les caspases, notamment la caspase-3 et -9, et les calpaïnes (Cheng et al., 1997). Le clivage de Bcl-2 induit la perte du domaine BH4. Ce domaine BH4 est nécessaire à l'interaction de Bcl-2 avec la protéine chaperonne FKBP38 (FK506-binding protein 38) pour son adressage mitochondrial (Portier and Taglialatela, 2006). Cette élimination inactive l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 et libère un fragment pro-apoptotique (Cheng et al., 1997). En effet, ce clivage entraîne l'exposition du domaine BH3 et convertit Bcl-2 en une protéine pro-apoptotique de type Bax.

- **Modification conformationnelle:**

Outre la phosphorylation et le clivage, la protéine Bcl-2 peut subir des modifications conformationnelles afin de varier son activité. Il a été rapporté que l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 est convertie en activité pro-apoptotique suite à un changement de conformation via Nur77 (TR3), un récepteur nucléaire orphelin (Lin et al., 2004). Nur77 est principalement cytoplasmique en conditions normales et peut transloquer aussi bien au noyau qu'à la mitochondrie en fonction des signaux reçus. En effet, Nur77 est impliqué dans la survie cellulaire lorsqu'il est localisé dans le noyau mais induit la mort cellulaire des cellules cancéreuses induite par des agents antinéoplastiques par apoptose lorsqu'il est adressé aux mitochondries. En effet, via son domaine LBD (Ligand-binding domain), Nur77 interagit avec la partie N-terminale de Bcl-2 (Zhan et al., 2007) et le complexe Nur77/Bcl-2 ainsi formé transloque la mitochondrie où il induit l'apoptose en déplaçant le domaine BH4 de Bcl-2 exposant ainsi le domaine BH3 (Lin et al., 2004).

- ❖ **Bcl-xL.**

- **Phosphorylation :**

Suite à un dommage de l'ADN ou à une stimulation par TNF $\alpha$  ou Fas, les kinases JNKs sont activées et transloquées vers les mitochondries où elles s'associent avec Bcl-xL. Elles phosphorylent Bcl-xL sur les Thr47 et 115 et induisent l'apoptose (Kharbanda et al., 2000). Cependant, le rôle de cette phosphorylation dans le déclenchement de l'apoptose n'est pas connu. Il a été montré qu'elle n'intervient pas dans la libération de Bax du complexe Bcl-xL-Bax (Kharbanda et al., 2000).

Bcl-xL a été identifiée comme pouvant interagir avec cdk1 (kinases à Sérine/Thréonine) et l'inhiber suite à un dommage de l'ADN (Schmitt et al., 2007). Dans des événements mitotiques normaux, Bcl-xL serait sous forme phosphorylée, au niveau des Thr47 et Ser62, pour exercer sa fonction anti-apoptotique. Suite à un dommage de l'ADN, Bcl-xL est déphosphorylée et inhibe cdk1, ce qui stoppe le cycle cellulaire et conduit à l'apoptose de la cellule (Du et al., 2005; Schmitt et al., 2007)

La régulation de Bcl-xL, tout comme les autres membres apoptotiques est extrêmement complexe. Sa phosphorylation doit dépendre d'autres éléments régulateurs permettant, entre autre, de contrôler sa localisation cellulaire.

- **Clivage :**

Bcl-xL peut être clivée par les caspases devenant ainsi pro-apoptotique par perte de son domaine BH4 et exposition de son domaine BH3 (Clem et al., 1998).

## ❖ Mcl-1.

### • Phosphorylation et dégradation par le protéasome :

Mcl-1 joue un rôle critique dans la régulation de la mort cellulaire programmée en empêchant une activation inappropriée de Bax et Bak (Willis et al., 2005) et est soumis à une dégradation rapide par de multiples voies (la demi-vie de Mcl-1 est d'environ 40 minutes). Mcl-1 possède trois domaines BH : BH1, 2 et 3 et un domaine TM mais possède un domaine PEST (un domaine contenant des séquences enrichies en proline, acide glutamique, sérine et thréonine) et non pas un domaine BH4 en N-terminale, contrairement à la plupart des protéines anti-apoptotiques de cette famille. L'analyse des séquences et l'analyse mutationnelle de Mcl-1 ont révélé plusieurs sites de phosphorylation potentiels dans les domaines PEST (Thomas et al., 2010). Ces phosphorylations entraînent, soit la stabilisation de Mcl-1 ou sa dégradation.

- La sérine 64 (Ser64): la phosphorylation de Mcl-1 sur la Ser64 est médiée par les kinases cycline-dépendantes 1 (CDK1), CDK2 et par JNK. Cette phosphorylation semble être requise pour la dimérisation de Mcl-1 avec d'autres membres de la famille de Bcl-2 sans affecter la stabilité de la protéine (Kobayashi et al., 2007).

- La thréonine 92 (Thr92) et la thréonine 163 (Thr163): la phosphorylation de Thr92 et/ou la Thr163 par la voie MAPK/ERK-1 stabilise Mcl-1 et est probablement nécessaire pour sa fonction anti-apoptotique (Ding et al., 2008; Domina et al., 2004).

- la sérine 121 (Ser121) et la Thr163: cette double phosphorylation de Mcl-1 sur la Ser121 et la Thr163 par JNK peut entraîner la stabilisation de Mcl-1.

- Les sérines 155 et 159: Le glycogène syntase kinase-3 (GSK3) phosphoryle la Ser155 et la Ser159 entraînant la déstabilisation et l'altération de la fonction anti-apoptotique de Mcl-1 (Ding et al., 2007; Maurer et al., 2006; Morel et al., 2009).

Il a été rapporté que la phosphorylation de la Ser155 diminue l'expression de Mcl-1 tandis que celle de la Ser159, en association avec la Thr163, provoque la rupture des interactions de Mcl-1 avec ses partenaires ainsi que la dégradation de Mcl-1 par le protéasome (Maurer et al., 2006). Enfin, la phosphorylation de la Thr163, en association avec celle des Ser155 et Ser159, induit le recrutement d'une E3 ligase et la dégradation de Mcl-1 par le protéasome (Ding et al., 2007).

### • Clivage :

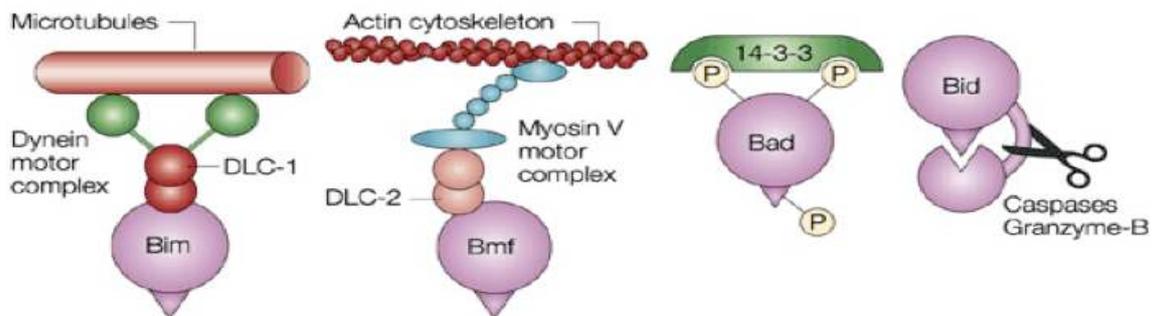
Les caspases-3 et -7 sont responsables du clivage de Mcl-1, avec une efficacité plus importante pour la caspase-3. Ce clivage peut être inhibé en présence de ZVAD-fmk, un inhibiteur spécifique des caspases (Snowden et al., 2003). Mcl-1 peut être clivée au niveau de deux résidus aspartique qui se trouvent dans les régions PEST: Asp 127 et Asp 157 (Snowden et al., 2003). Ce clivage en Asp127 génère des fragments de 25 et 17 kDa et celui en Asp 157 forme des fragments de 23 et 19 kDa. Le fragment 25 kDa représente la forme C1 de Mcl-1. C1 interagit directement avec Bax pour induire

l'apoptose (Menoret et al., 2010). Cette interaction, via le domaine BH3 de C1, provoque la translocation de Bax à la mitochondrie puis induit une apoptose dépendante des caspases. De plus, il a été montré que la forme C1 ressemble aux protéines pro-apoptotiques de type Bax et interagit davantage avec Bim et perd donc son activité anti-apoptotique (Herrant et al., 2004). Le clivage en Asp157, quant à lui, forme des fragments de 23 et 19 kDa. Le fragment de 23 kDa est nommé C2 qui semble jouer un rôle pro-apoptotique (Herrant et al., 2004).

L'ensemble de ces modifications post-traductionnelles conditionne l'interaction de Mcl-1 avec les protéines à BH3-seul, régulant ainsi le processus apoptotique.

#### 2.2.4.2. Régulation des membres pro-apoptotiques.

Contrairement aux membres anti-apoptotiques, qui sont essentiellement localisés au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, les membres pro-apoptotiques, à l'exception de Bak, sont présents dans le cytosol. Après la survenue d'un signal de mort cellulaire, certaines de ces molécules subissent un changement de conformation puis se relocalisent essentiellement au niveau de la mitochondrie, où elles exercent leur activité. Ainsi, la régulation des protéines pro-apoptotiques est souvent celle de leur localisation. De nombreuses modifications post-traductionnelles contrôlent leur relocalisation et leur maintien dans un état inerte afin de prévenir une mort inappropriée des cellules (**figure 15**).



**Figure 15: Modes de régulation des membres pro-apoptotiques à domaine BH3 seul.**

Dans les cellules normales, les protéines BH3 seul sont contrôlées par différentes stratégies. Bim et Bmf sont séquestrées aux microtubules ou au cytosquelette d'actine, respectivement, par l'intermédiaire d'une interaction avec une chaîne légère de la dynéine (DLC). Bad Phosphorylée est liée à la protéine chaperonne 14-3-3. Bid est synthétisé comme un précurseur, qui nécessite un clivage protéolytique pour être pleinement active.

D'après Cory et al., Nat Rev Cancer, 2002.

Cette relocalisation peut être régulée par :

- Phosphorylation. C'est le cas de Bad et de Bim. Ainsi, Bad peut être phosphorylée au niveau de plusieurs résidus sérine ce qui entraîne sa séquestration dans le cytoplasme par liaison aux protéines

14-3-3 (Zha et al., 1996). Cette phosphorylation peut dépendre soit de la sérine-thréonine kinase PKB (Protein Kinase B)/AKT (Datta et al., 1997) ou de la cascade des sérine-thréonine kinases MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Wang et al., 1999). En absence de facteurs de croissance par exemple, Bad est déphosphorylée ce qui le dissocie des protéines 14-3-3 et permet alors sa translocation à la mitochondrie.

Concernant la protéine Bim, son expression peut être régulée au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. Ainsi une privation en facteurs de croissance induit l'expression de Bim par l'intermédiaire du facteur de transcription FOXO3 qui peut lui-même être inactivé par la voie PI3K/Akt (Dijkers et al., 2000; Putcha et al., 2001). Au niveau post-traductionnel, la phosphorylation de Bim sur la sérine 69 par Erk1/2 augmente son ubiquitination et induit sa dégradation par le protéasome, réduisant ainsi son pouvoir pro-apoptotique (Ley et al., 2003).

- Séquestration. Certaines protéines à domaine BH3 seul, telles que Bim et Bmf, sont maintenues inactives au niveau du cytosquelette. Les 2 isoformes longues de Bim, Bim<sub>L</sub> et Bim<sub>EL</sub>, sont associées aux microtubules par l'intermédiaire de DLC1 (la chaîne légère de la dynéine LC8, élément du complexe des protéines motrices dynéines). Lors d'un stress apoptotique, Bim<sub>S</sub> transloque directement à la mitochondrie tandis que Bim<sub>L</sub> et Bim<sub>EL</sub> devront d'abord être libérées de DLC1 par phosphorylation par JNK (Lei and Davis, 2003). En revanche, Bmf interagit avec le cytosquelette d'actine via DLC2 (la chaîne légère de la dynéine, composant du complexe moteur myosine V). Sa dissociation de ce complexe est déclenchée par l'absence de matrice extracellulaire ou par le traitement des cellules avec les drogues qui dépolymérisent l'actine (Puthalakath et al., 2001).

- Oligomérisation. C'est le cas de Bax, qui se trouve sous forme monomérique inactive dans le cytosol et c'est un changement de conformation qui expose son domaine N-terminal qui permet son adressage à la mitochondrie. L'oligomérisation de Bax et de Bak à la mitochondrie est nécessaire à leur activité pro-apoptotique.

- Clivage. Le clivage de Bid par la caspase-8 peut être inhibé par sa phosphorylation sur les sérines 61 et 64 par les caséines kinases I et II (Desagher et al., 2001).

Bax (p21) peut quant à lui être clivé par la calpaïne ou la cathepsine D, conduisant à la forme p18 délétée de l'hélice  $\alpha 1$  qui contient le signal d'adressage à la mitochondrie. Cette forme n'induit pas à elle seule la sortie du cytochrome c mais potentialise l'action de Bax. Il semble en fait que Bax p18 entre en compétition avec Bax p21 pour interagir avec les membres anti-apoptotiques, favorisant ainsi l'activité apoptotique de Bax à la mitochondrie. La forme p18 jouerait le rôle d'une protéine à domaine BH3 seul (Cartron et al., 2004b).

Enfin, l'activité de ces protéines peut aussi être régulée de façon transcriptionnelle. Bax (Miyashita and Reed, 1995) et les protéines à domaines BH3 seul Bid, Puma (Nakano and Vousden, 2001) et Noxa (Oda et al., 2000) sont régulées par le facteur de transcription p53.

### 2.2.5. Thérapie ciblées par les inhibiteurs de Bcl-2.

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par un défaut d'apoptose induit principalement par la surexpression de membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1. Dans de nombreux cancers, la surexpression des protéines anti-apoptotiques corrèle d'une part avec un mauvais pronostic de survie pour le patient et la progression de la maladie, et d'autre part confère une résistance à la chimiothérapie ou à la radiothérapie. Ainsi, l'inhibition de la fonction des membres anti-apoptotiques représente une stratégie prometteuse pour l'élaboration d'une nouvelle classe d'agents anticancéreux.

#### 2.2.5.1. L'inhibition des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Plusieurs approches permettant de cibler et d'inhiber Bcl-2 ont été testées. Ainsi, les premières permettaient de diminuer le niveau d'expression de Bcl-2 par l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens ou d'inhiber son activité par le développement d'anticorps bloquants de Bcl-2. C'est le succès de petits peptides, mimétiques du domaine BH3 de Bax, à induire l'apoptose des cellules *in vitro* et à réduire la croissance tumorales de cellules myéloïdes humaines dans un modèle de souris immunodéprimés qui a poussé les recherches vers le développement de petites molécules inhibitrices des protéines de la famille Bcl-2 (Wang et al., 2000).

Ces petites molécules (non peptidiques) doivent interagir avec la poche hydrophobe des membres anti-apoptotiques et ainsi bloquer l'hétérodimérisation de Bcl-2 avec les membres pro-apoptotiques. Ce sont donc des molécules mimétiques des domaines BH3 des membres pro-apoptotiques. Leur petite taille (<750Da) ainsi que leur capacité à traverser les membranes plasmiques rend leur utilisation *in vivo* plus pratique et plus rentable comparée aux oligonucléotides et autres peptides.

#### 2.2.5.2. Petites molécules antagonistes de Bcl-2.

Ces dernières années, différents criblages ont été effectués pour identifier de telles molécules et différents candidats ont été identifiés (Lessene et al., 2008):

- **GX15-070 (obatoclax)**. L'obatoclax (Gemin X Pharmaceuticals maintenant Cephalon), un dérivé synthétique des prodiginines, se lie à Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w et Mcl-1 mais avec une faible affinité (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ). Il a une activité en tant qu'agent simple contre de nombreuses lignées tumorales et a montré une petite activité clinique dans des essais thérapeutiques précoces. Il doit être administré en intra-veineux. Des effets neurotoxiques tels que la somnolence, l'euphorie ont été observés. Ils sont réduits si la perfusion est faite en 3 heures au lieu d'une heure. Dans un essai de phase I, l'obatoclax a montré un effet significatif dans le cancer du poumon à petites cellules. Cependant, certains travaux précliniques ont jeté le doute sur le mécanisme d'action de l'obatoclax. En effet, il est capable de tuer

des cellules qui n'expriment ni Bax ni Bak. Dans ce contexte, il a été montré que l'obatoclax induisait une mort cellulaire de type autophagie ou nécroptose (McCoy et al., 2010)(Urtishak et al., 2013). Un essai de phase III pour un co-traitement obatoclax, carboplatine, étoposide comparé à la chimiothérapie seule est en cours dans le cancer du poumon à petites cellules (**tableau 2**).

Molécule (Compagnie)	Affinité	Molécules associées	Tumeur	Phase
<b>GX15-070 (GeminX)<sup>MS-405</sup></b> 	<b>IC<sub>50</sub> :</b> Bcl-2 1,1 µM Bcl-xL 4,7 µM Bcl-w 7 µM Mcl-1 2,9 µM	Étoposide Bortezomid Docetaxel Rituximab Carboplatine et étoposide	Poumon Lymphome Poumon Lymphome Poumon	I/II II II II III (en cours)
<b>AT-101 (-)gossypol (Ascenta)<sup>71, 76,79</sup></b> 	<b>IC<sub>50</sub> :</b> Bcl-2 320 nM Bcl-xL 480 nM Mcl-1 180 nM	Temozolomide Lenalidomide Rituximab Docetaxel Erlotinib	Cerveau ALL, CLL CLL, lymphome Prostate, poumon Poumon	I I/II II II II
<b>ABT-737 (Abbott)<sup>13, 100, 101, 104</sup></b> 	<b>K<sub>i</sub> :</b> Bcl-2 < 1nM Bcl-xL < 0,5 nM Bcl-w < 1nM Mcl-1 > 1 µM		Modèles animaux	Pré-clinique
<b>ABT-263 (Abbott)<sup>101, 104</sup></b> 	<b>K<sub>i</sub> :</b> Bcl-2 < 1nM Bcl-xL < 0,5nM Bcl-w < 1 nM Mcl-1 550 nM	Rituximab Gemcitabine Paclitaxel Docetaxel	CLL Tumeurs solides Tumeurs solides Tumeurs solides Poumon poumon	I I I I I II

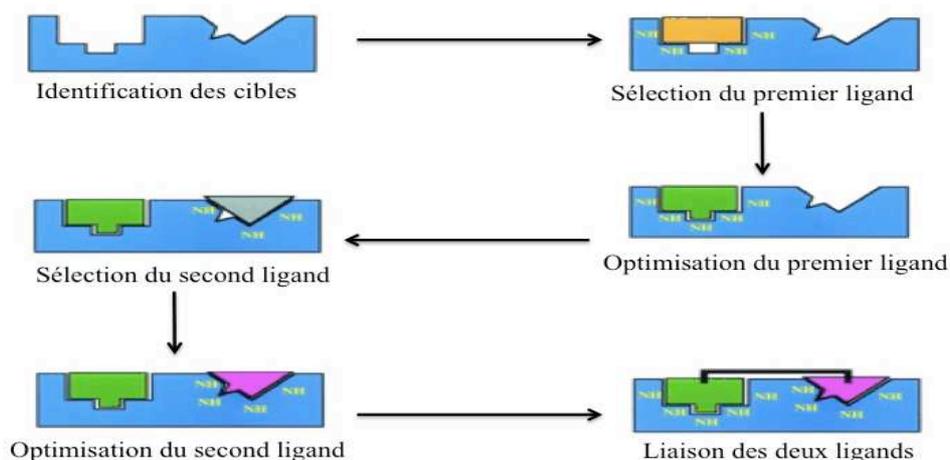
**Tableau 2 : Essais cliniques finalisés ou en cours.**

- **AT-101 ((-)gossypol)**. Le produit naturel gossypol, un polyphénol naturel dérivé de graines de coton, a été utilisé depuis longtemps pour de nombreuses applications thérapeutiques. Le (-) énantiomère (AT-101) se lie à Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 avec des affinités de l'ordre de 200-400nM et est développé par Ascenta. Il a montré une activité mineure dans des essais phase I/II dans le cancer de la prostate et aucune efficacité dans le cancer du poumon mais avec, dans tous les cas, une toxicité gastro-intestinale.

D'autres molécules sont également en cours d'évaluation telles que des dérivés du gossypol (apogossypolone), des dérivés de l'isoxazolidine (Novartis). Cependant, le composé le plus prometteur à l'heure actuelle est l'ABT-737 et ses dérivés et il est décrit dans le paragraphe suivant.

### 2.2.5.3. L'ABT-737 : un inhibiteur spécifique.

L'ABT-737 a été produite au travers d'une collaboration entre les laboratoires IDUN et les laboratoires AbbVie (anciennement Abbott) (Oltersdorf et al., 2005). L'ABT-737 a été développée par une stratégie nommée « SAR by RMN » qui utilise des techniques de conception basées sur la structure protéique, la synthèse chimique et la sélection par la RMN (Nuclear Magnetic Resonance) (**figure 16**).



**Figure 16 : Les grandes lignes de la stratégie « SAR by RMN ».**

D'après Shuker et al., 1996.

Afin de cibler spécifiquement la poche hydrophobe des membres anti-apoptotiques, deux molécules de faible affinité ont été produites et optimisées puis ont été reliées l'une à l'autre pour former une molécule de haute affinité (Shuker et al., 1996). Ce BH3 mimétique (en mimant le domaine BH3 de Bad) interagit avec la poche hydrophobe de Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w avec une haute affinité (moins de 1nM) tandis qu'il interagit faiblement avec Mcl-1 (plus de 1 $\mu$ M) ou encore A1/Bfl-1.

Ainsi, comme les membres pro-apoptotiques à domaine BH3 seul sensibilisateurs, l'ABT-737 ne peut interagir avec et activer Bax et Bak directement (Oltersdorf et al., 2005). Cependant, l'efficacité de l'ABT-737 nécessite la présence de Bax ou Bak. Comme le domaine BH3 de Bad, l'ABT-737 a une activité limitée sur des fibroblastes d'embryons de souris (MEF) sauvages mais est très actif sur des MEF exprimant Noxa (qui neutralise Mcl-1) (van Delft et al., 2006).

#### *- Efficacité de l'ABT-737 en agent simple.*

L'effet de l'ABT-737 en agent simple a été montré dans de nombreuses pathologies. Ainsi, des cellules primaires de patients atteints de leucémie lymphocytaire chronique (LLC), de leucémie aigue

myéloblastique (LAM), de leucémie aigue lymphoblastique (LAL), de lymphome folliculaire sont très sensibles à l'ABT-737 et entrent en apoptose avec des doses de l'ordre du nanomolaire (Ni Chonghaile and Letai, 2008). Cependant, l'ABT-737 reste peu efficace contre la plupart des tumeurs épithéliales en agent seul.

Les raisons pour lesquelles certaines cellules sont sensibles à l'ABT-737 et d'autres non commencent à être comprises. D'une part, Bcl-2 (ou Bcl-xL) doit être complexé avec des molécules pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 pour que l'ABT-737 soit efficace. Celles-ci peuvent être des protéines à BH-3 seul activatrices tel que Bim ou encore les membres pro-apoptotiques Bax ou Bak. Ces molécules sont déplacées par l'ABT-737 et ce relargage leur permet d'exercer leur activité pro-apoptotique. De telles cellules ont été décrites comme étant « prédisposées pour la mort » (« primed for death ») (Certo et al., 2006; Del Gaizo Moore et al., 2007). Une étude sur le neuroblastome montre que l'ABT-737 ne se montre efficace dans des modèles de xénogreffes que si les cellules présentent des complexes Bcl-2/Bim et sont donc « prédisposées » (Goldsmith et al., 2012). Ainsi, la seule mesure du taux d'expression de Bcl-2, Bcl-xL ou Bcl-W ne donne pas d'indication sur la sensibilité des cellules à l'ABT-737. D'autre part, les quantités de molécules pro-apoptotiques ainsi déplacées doivent être en excès par rapport à la quantité de Mcl-1 vide présente. Dans le cas contraire Mcl-1, en complexant ces protéines, les neutraliserait. L'ABT-737 est efficace à des concentrations de l'ordre du nanomolaire dans un sous-groupe de cellules dérivées de myélome multiple et cet effet a été corrélé avec un rapport Bcl-2/Mcl-1 élevé (Bodet et al., 2011). Une autre stratégie prédictive suggère que l'équilibre Noxa/Mcl-1 peut déterminer la sensibilité à ABT-737 des cellules leucémiques (Tromp et al., 2012). Dans le même ordre d'idées, il a été montré que dans le cas de blastes de LAM exprimant un fort taux de Mcl-1, une neutralisation concomitante de Mcl-1 est nécessaire à leur sensibilisation à l'ABT-737 (Konopleva et al., 2006). Récemment, un inhibiteur spécifique de Mcl-1, le Maritoclax, a été décrit (Doi et al., 2012). Il agit en induisant la dégradation de Mcl-1 et sensibilise les cellules à l'ABT-737.

#### *- Efficacité de l'ABT-737 en co-traitement.*

De nombreux exemples existent dans la littérature montrant une synergie lorsque l'ABT-737 est combiné avec les thérapies conventionnelles sur des modèles de mélanome, de cancer du pancréas, de gliome, de cancer du sein (Ni Chonghaile and Letai, 2008). Donc, il semble que ces chimiothérapies amènent l'événement additionnel d' « amorçage » nécessaire à l'efficacité de l'ABT-737.

Ces agents peuvent agir via une augmentation de l'expression de protéine pro-apoptotiques telles que Noxa, Puma ou Bim. C'est le cas, par exemple, de l'étoposide dans le carcinome rénal (Zall et al., 2010), de la vincristine dans la LAL (High et al., 2010), de la dacarbazine dans le mélanome (Anvekar et al., 2012) ou encore des inhibiteurs des HDAC (Histone Déacétylases) dans des cellules de myélome et de lymphome (Chen et al., 2009). L'inhibition de l'EGF-R avec de l'erlotinib ou du

gefitinib conduit à une expression de Bim accrue et un co-traitement avec l'ABT-737 montre une synergie importante. Un traitement combiné ABT-737 et inhibiteur de l'EGF-R semble contourner la résistance à l'inhibiteur seul dans des cellules de cancer du poumon (Fan et al., 2011). Le sorafenib (qui inhibe plusieurs kinases dont RAF) induit Bim et agit en synergie avec l'ABT-737 dans des cellules de LAM (Zhang et al., 2008a).

Conscients de la faible affinité de l'ABT-737 pour Mcl-1 et Bfl-1, plusieurs travaux ont mis en évidence qu'un fort niveau d'expression basale de Mcl-1 et de Bfl-1 est associé avec une résistance à l'ABT-737 (Del Gaizo Moore et al., 2007; Konopleva et al., 2006; van Delft et al., 2006; Yecies et al., 2010). Dans différents modèles cancéreux, la combinaison de l'ABT-737 avec du sorafenib (Hikita et al., 2010), de l'étoposide, de vinblastine ou encore du paclitaxel (Zall et al., 2010) a montré une synergie via l'inactivation de Mcl-1. D'autres, quant à eux, ont montré une synergie via la diminution de l'expression de Mcl-1, comme par exemple l'actinomycine D (Olberding et al., 2010), la gemcitabine (Zhang et al., 2011), le GDC-0941 (Zheng et al., 2011). Dans des cellules humaines de LAM et des modèles de xénogreffes, l'ABT-737 agit en synergie avec les inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR car ceux-ci diminuent l'expression de Mcl-1 (Rahmani et al., 2013).

#### 2.2.5.4. L'ABT-263 (navitoclax).

En dépit de son activité anti-tumorale, une limitation de l'utilisation de l'ABT-737 est due au fait de sa faible biodisponibilité. La chimie médicale a été utilisée afin de modifier la structure de l'ABT-737 et a conduit au développement d'une nouvelle molécule dérivée, l'ABT-263. L'ABT-263 ou Navitoclax, est une forme orale de l'ABT-737 qui possède les mêmes propriétés biologiques. Il se lie à des protéines sériques ce qui augmente sa demi-vie. Contrairement à l'ABT-737, cette molécule inhibe efficacement Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w mais aussi Mcl-1 avec une plus grande affinité que l'Obatoclax (Vogler et al., 2009). L'action tumoricide de l'ABT-263 a été montrée dans des modèles de xénogreffes de cancer du poumon à petites cellules et de LAL (Shoemaker et al., 2008; Tse et al., 2008). Dans le cancer du poumon à petites cellules, les xénogreffes qui développent une résistance à l'ABT-737 montrent une réduction des complexes Bim/Bcl-2 quand on les compare aux cellules sensibles (Hann et al., 2008).

L'ABT-263 augmente l'efficacité de nombreux agents chimiothérapeutiques *in vitro* et *in vivo* (Chen et al., 2011; Lessene et al., 2008). La combinaison entre l'ABT-263 et des inhibiteurs de MEK induit très efficacement la mort de lignées cellulaires portant une mutation activatrice de KRAS et conduit à la régression des tumeurs dans cinq modèles murins différents de cancers mutés sur KRAS. Cet effet est dû au fait que les inhibiteurs de MEK augmentent la quantité de Bim (Easwaran and Baylin, 2013).

De manière intéressante, des observations récentes ont montré une bonne réponse à l'ABT-263, chez des patients atteints de LLC en rechute ou réfractaire, corrélée à une faible expression de Mcl-1,

un ratio élevé de Bim/Mcl-1 ou de Bim/Bcl-2 (Roberts et al., 2012). Dans cette étude, où l'ABT-263 était donné en agent seul, 9/26 patients ont eu une réponse partielle et 7/26 ont vu leur maladie stabilisée pour plus de six mois. En revanche, un essai de phase II récemment publié indique un manque d'efficacité de l'ABT-263 chez des patients atteints de cancer du poumon à petites cellules en rechute (Rudin et al., 2012). Actuellement, de multiples essais cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité de l'ABT-263 seul ou en combinaison (ClinicalTrials.gov. NIH).

Parmi les composés en essai clinique, seul l'ABT-263 montre une grande affinité et spécificité pour les membres de la famille Bcl-2 soutenant ainsi son utilité potentielle (Davids and Letai, 2012). En revanche, le fait que l'ABT-263 interagisse non seulement avec Bcl-2, mais aussi avec Bcl-xL, provoque de façon prévisible, des thrombopénies dose-dépendantes. Cette toxicité est due au fait que les plaquettes dépendent de Bcl-xL pour leur survie. Cependant, ceci fournit une preuve pharmacodynamique du mécanisme d'action du médicament. En effet, les médicaments qui ont pour but d'inhiber Bcl-xL et qui ne causent pas de thrombopénies significatives *in vivo* doivent être considérés avec prudence. En raison de cette thrombopénie dose-limitante, il est impossible d'optimiser les doses d'ABT-263. Souers et al. ont récemment rapporté la modification de structure de l'ABT-263 pour générer l'ABT-199 (Souers et al., 2013).

#### 2.2.5.5. L'ABT-199.

L'ABT-199 maintient une affinité sous-nanomolaire pour Bcl-2 mais son avidité pour Bcl-xL est inférieure d'un log. Dans un modèle cellulaire *in vitro*, Souers et al. montrent de façon très convaincante que l'ABT-199 tue sélectivement les cellules dépendantes de Bcl-2 mais pas celles dépendantes de Bcl-xL, via la voie intrinsèque de l'apoptose (Souers et al., 2013). Ils montrent également que l'ABT-199 tue de manière très efficace des lignées cellulaires de lymphome non hodgkinien et de LAM. *In vivo*, l'ABT-199 diminue la pousse de xénogreffes de plusieurs tumeurs hématopoïétiques humaines et montre une synergie avec la chimiothérapie. Enfin, ces mêmes auteurs ont effectué un essai clinique préliminaire sur trois patients atteints de LLC. En juste 8h, il y a eu une réduction du nombre absolu de lymphocytes et une réduction concomitante des lymphadénopathies palpables chez les trois patients sans thrombopénie.

Il faut noter que, dans cette même étude, une forte augmentation de la lactate déshydrogénase et du niveau de phosphate a été observée, ce qui indique une lyse tumorale significative et ce qui peut conduire à un syndrome clinique sévère (Davids and Letai, 2013). De fait, les essais cliniques de phase I menés par AbbVie ont du ensuite être temporairement suspendus suite à la mort d'un patient du syndrome de lyse tumorale (Blog de Derek Lowe). Un communiqué de AbbVie indique que seul l'enrôlement des patients était arrêté mais que l'essai continuait sur les patients déjà inclus avec des

doses modifiées. Les résultats préliminaires de cet essai de phase I ont été présentés à l'ASCO 2013 (Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology). L'essai a concerné l'ABT-199 donné en agent seul à des patients atteints de LLC en rechute ou réfractaire et de LNH en rechute ou réfractaire. Dans les bras LLC (55 patients), une réponse a été observée dans 84% des cas avec 18% des patients en rémission totale et 65% en rémission partielle. Une fois le dosage modifié, trois patients ont eu un syndrome de lyse tumorale non fatal. Dans le bras LNH (32 patients), une réponse a été observée dans 53% des cas avec 9% des patients en rémission totale et 44% en rémission partielle. La FDA (U.S. Food and Drug Administration) a récemment accepté le nouveau protocole d'essais clinique de l'ABT-199 par AbbVie et l'enrôlement pour la LLC, le LNH et le myélome multiple a repris.

#### 2.2.5.6. Le BH3-M6.

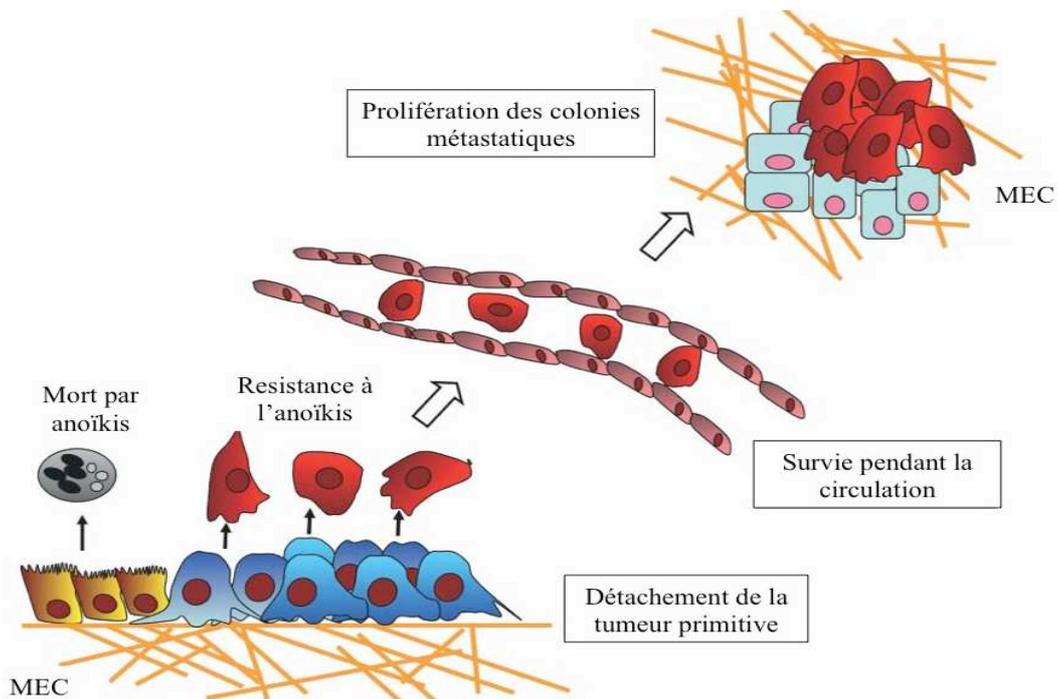
Le BH3-M6, un mimétique de l'hélice- $\alpha$  du domaine BH3 basé sur un terphenyl modifié, est le plus récent des BH3 mimétiques. Il inhibe les liaisons de Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 avec Bax Bak, Bad ou Bim suggérant qu'il est un pan-Bcl-2 antagoniste (Kazi et al., 2011). A des concentrations plus fortes (25-50 $\mu$ M), le BH3-M6 induit l'apoptose dans la lignée d'adénocarcinome du poumon A549 d'une manière dépendante de la perturbation de l'interaction de Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 avec Bim et sensibilise ces cellules à l'apoptose induite par l'inhibiteur du protéasome CEP-1612.

L'apoptose est un processus physiologique complexe et hautement régulé. La dérégulation de l'apoptose peut conduire à un cancer. Elle fait intervenir de nombreux acteurs qui sont autant de cibles anticancéreuses possibles. A ce jour, seulement un petit nombre de thérapies ciblant directement les voies de signalisation apoptotiques ont avancé au stade clinique et aucune n'a encore atteint le stade de mise sur marché. Il se peut que cette étape soit un jour franchie par les inhibiteurs de la famille Bcl-2.



## II. La perte d'adhérence : Anoïkis.

Comme un obstacle au développement de métastases, les cellules entrent en apoptose normalement après la perte de leur interaction avec la matrice extracellulaire (MEC). Ce processus de mort cellulaire a été appelé « anoïkis » (Frisch and Francis, 1994), terme dérivé du grec ancien qui signifie « sans domicile » (**figure 17**) et a été décrit pour les cellules épithéliales et endothéliales (Frisch and Francis, 1994; Meredith et al., 1993). L'anoïkis est un processus physiologique nécessaire pour le développement et l'homéostasie tissulaire. En effet, elle constitue un moyen pour l'organisme d'éviter que les cellules qui seraient détachées accidentellement de la MEC puissent migrer vers un site tissulaire ectopique (Gilmore, 2005). Ainsi, la résistance à l'anoïkis ou des altérations perturbant son contrôle contribuent grandement au développement et à la dissémination dans l'organisme de cellules tumorales métastatiques, comme cela a bien été décrit pour les tumeurs mammaires et coliques (Douma et al., 2004; Shanmugathan and Jothy, 2000). En revanche, les cellules épithéliales sont protégées de l'anoïkis dans plusieurs situations, comme par exemple lors de la mobilité ou de la division cellulaire. Les cellules mésenchymateuses, en raison de leur grande mobilité, sont en permanence résistantes à l'anoïkis (Thompson et al., 2005; Zanotti et al., 2011).



**Figure 17 : Acquisition de la résistance à l'anoïkis.**

Les cellules métastatiques acquièrent une résistance à l'anoïkis à différents niveaux de la progression tumorale : tout d'abord lors de son détachement de la MEC pour quitter la tumeur primitive, puis pendant la circulation dans la vasculature et enfin pendant la colonisation d'autres organes en interagissant avec des MEC différentes de celle de la tumeur primitive.

D'après Taddei et al., Journal of Pathology, 2012.

## 1. Les voies de signalisation de l'anoïkis.

L'anoïkis, comme tout processus d'apoptose, peut être initiée par la voie extrinsèque ou la voie intrinsèque, cette dernière étant cependant plus fréquemment impliquée. La perte d'ancrage à la MEC conduit à une expression accrue de Fas et Fas-L et à une expression diminuée de FLIP (Aoudjit and Vuori, 2001). De plus, l'arrondissement de la cellule après le détachement peut induire l'apoptose extrinsèque (Chen et al., 1997), principalement par la relocalisation et l'activation de Fas (Muzio et al., 1998). Par ailleurs, d'autres études ont mis en évidence un rôle du récepteur de mort TRAIL-R2 (DR5) dans l'induction de l'anoïkis dans différents lignées cellulaires de carcinome colorectal (Laguinge et al., 2008).

Dans la voie intrinsèque de l'anoïkis, la translocation de Bax du cytosol vers la mitochondrie est un événement critique pour la mort cellulaire. Il a été rapporté que le détachement des cellules épithéliales mammaires de la MEC entraîne une translocation rapide (environ quinze minutes) en même temps que le changement de conformation, ce qui conduit à l'exposition de son domaine BH3 (Gilmore et al., 2000; Valentijn et al., 2003). En accord avec de nombreux autres modèles d'apoptose, l'anoïkis est bloquée par une surexpression de Bcl-2. L'anoïkis due à la voie intrinsèque est surtout initialisée par Bim bien qu'un rôle ait été également proposé pour Bmf (Puthalakath et al., 2001) et Bid (Valentijn and Gilmore, 2004). Dans les conditions d'adhérence, Erk actif conduit directement à la phosphorylation de Bim<sub>EL</sub> sur la sérine 69, ce qui inhibe sa fonction pro-apoptotique et aboutit alors à sa dégradation par le protéasome (Collins et al., 2005; Fukazawa et al., 2004). La diminution d'activation de Erk lors du détachement conduit à une augmentation de l'expression de Bim et à l'anoïkis (Reginato et al., 2003). En outre, Woods et al, ont souligné l'importance de Mcl-1 dans le maintien de la sensibilité à l'anoïkis. L'anoïkis peut être initiée par la dégradation de la protéine Mcl-1 conjointement à l'induction d'expression de Bim (Woods et al., 2007). Bmf est un médiateur central de l'anoïkis des cellules mammaires. En effet, des travaux menés par Schmelzl et al, montrent que pendant l'anoïkis de ces cellules, le taux d'ARN messager de Bmf augmente et la suppression d'expression de ce dernier par ARN interférence est suffisante pour empêcher l'anoïkis. De manière intéressante, l'activation constitutive des voies de signalisation MEK/Erk ou PI3K/Akt supprime la régulation transcriptionnelle positive de Bmf qui a lieu pendant l'anoïkis (Schmelzle et al., 2007). En ce qui concerne la protéine pro-apoptotique Bid, elle est évidemment associée à l'anoïkis dans les systèmes impliquant les récepteurs de mort dans l'initiation de l'anoïkis évoqués auparavant. De manière différente, au cours de l'anoïkis de cellules épithéliales mammaires, Bid a été trouvée comme pouvant transloquer à la mitochondrie sous sa forme non clivée. Dans ce contexte, le clivage de Bid n'est pas nécessaire à l'initiation de l'anoïkis et sa relocalisation à la mitochondrie est indépendante de l'activation de la caspase-8. L'expression de dominants négatifs des kinases FAK et PI3K induit la translocation de Bid à la mitochondrie (Valentijn and Gilmore, 2004).

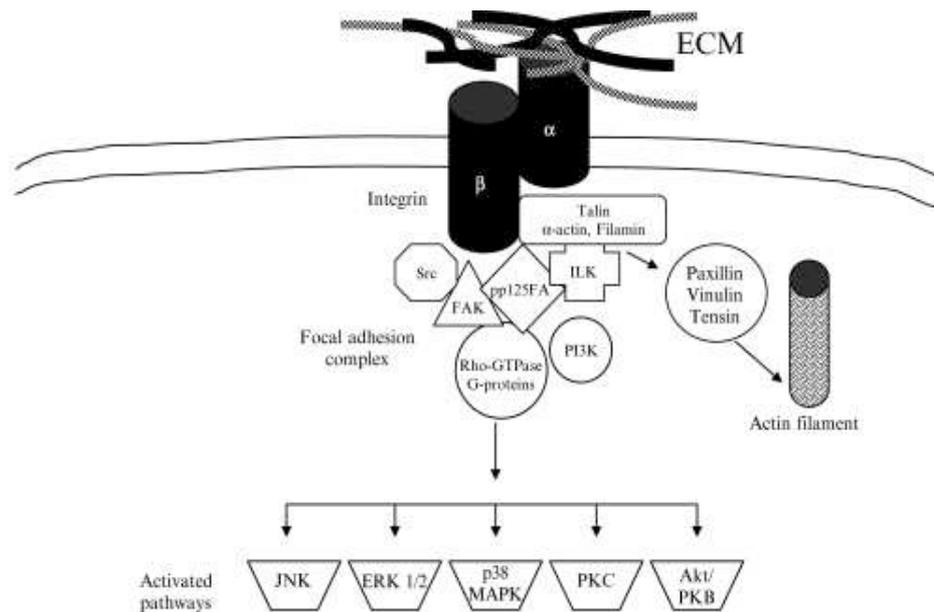
Que ce soit par la voie extrinsèque ou la voie intrinsèque, l'initiation de l'anoïkis conduit à l'activation de la caspase-3. Celle-ci est alors capable de cliver, entre autres des substrats, des molécules de signalisation telles que FAK et Cas (Crouch et al., 1996; Shim et al., 2001). Le clivage de FAK finit de détruire l'architecture des adhérences focales. Celui de Cas libère un fragment carboxy-terminal de 31kD qui réprime la transcription de E2A, ce qui contribue à l'anoïkis en bloquant le cycle cellulaire (Kim et al., 2004).

## **2. Protection physiologique contre l'anoïkis.**

Le rôle de la MEC en tant que suppresseur d'anoïkis est bien établi (Frisch and Francis, 1994) (Meredith et al., 1993). Les cellules expriment différentes molécules d'adhérence à la surface cellulaire (les récepteurs) permettant les interactions cellule-MEC mais également les interactions cellule-cellule.

### **2.1. Les interactions cellules-MEC.**

L'ancrage des cellules à la MEC se fait principalement par l'intermédiaire des intégrines. Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimériques composées d'une sous-unité alpha ( $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4 \dots$ ) et une sous-unité bêta ( $\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4 \dots$ ). A ce jour, 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  ont été identifiées. Par combinaison des différentes sous-unités d'intégrines, 24 hétérodimères ont été rapportés, qui sont autant de récepteurs différents pour les composants de la MEC. La perte d'interaction entre les intégrines et la MEC est un événement important à l'origine de l'anoïkis. Cette perte d'interaction est assimilable à une perte de signaux de survie. En effet, ces récepteurs d'adhérence fournissent aux cellules non seulement un attachement physique à la MEC mais ils créent aussi une plateforme de signalisation contenant de nombreuses protéines adaptatrices et des kinases (Arnaout et al., 2007). Des partenaires-clé dans la transduction du signal médiée par les intégrines sont FAK (focal adhesion kinase), ILK (integrin-linked kinase), la tyrosine kinase Src, PI3K, Erk, et JNK (Jun-kinase). Suite à la liaison des intégrines aux protéines appropriées de la MEC, FAK et ILK sont recrutées et activent alors les voies de signalisation Erk, JNK, Src et la voie PI3K/Akt (Hanks et al., 2003; Ilic et al., 1998) (**figure 18**).

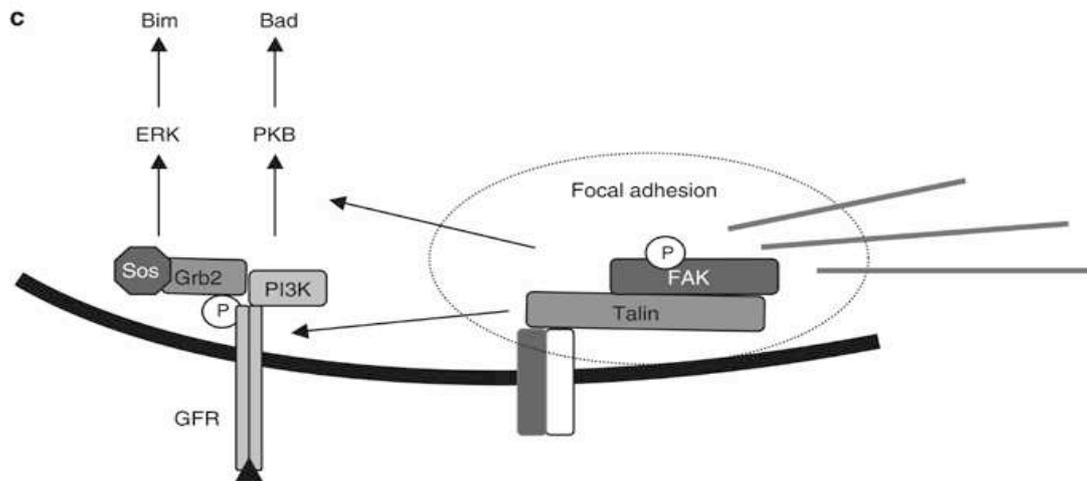


**Figure 18 : Schéma simplifié des voies de signalisation dépendantes des intégrines activées par des forces mécaniques dans les fibroblastes.** La liaison à la matrice extracellulaire (MEC) est médiée par la sous-unité  $\alpha$  de l'intégrine. Lors de l'activation, les sous-unités  $\beta$  s'associent avec de nombreuses protéines notamment Src, FAK, pp125, ILK, et Rho-GTPases pour former un complexe d'adhérence focale. L'activation de la voie MAPK, PKC et PI3K/Akt est médiée par l'activation des protéines G. Les intégrines font également un lien entre la MEC et le cytosquelette d'actine via leurs interactions avec taline,  $\alpha$ -actine, filamine, paxilline, vinulin et tensine.

La sérine thréonine kinase PKB / Akt est un élément essentiel dans la signalisation de survie cellulaire médiée aussi bien par les intégrines que les facteurs de croissance ou encore par l'ancrage cellule-cellule, qui convergent vers l'activation de cette kinase. L'activation de la PKB / Akt inhibe à de multiples niveaux le programme d'anoïkis, tels que l'inactivation de la caspase-9 (Cardone et al., 1998), la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad et donc son inactivation (Datta et al., 2000), l'activation du facteur nucléaire- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Romashkova and Makarov, 1999), ainsi que l'inhibition des facteurs de transcription Fork-head comme FOXO, impliqués dans l'induction de l'expression de molécules pro-apoptotiques (Kops and Burgering, 2000).

ILK transmet des signaux de survie médiés par les intégrines, indépendamment de la kinase FAK, comme montré par l'échec de la co-transfection de l'ILK et du dominant négatif de FAK pour reverser la capacité d'ILK à inhiber l'anoïkis dans des cellules humaines du cancer du sein et du cancer de la prostate (Attwell et al., 2000; Persad et al., 2000).

Le rôle protecteur de Erk sur l'anoïkis est au moins en partie dû à sa capacité de phosphoryler la protéine à BH-3 seul Bim, induisant ainsi sa dégradation par le protéasome (Fukazawa et al., 2004) (figure 19).



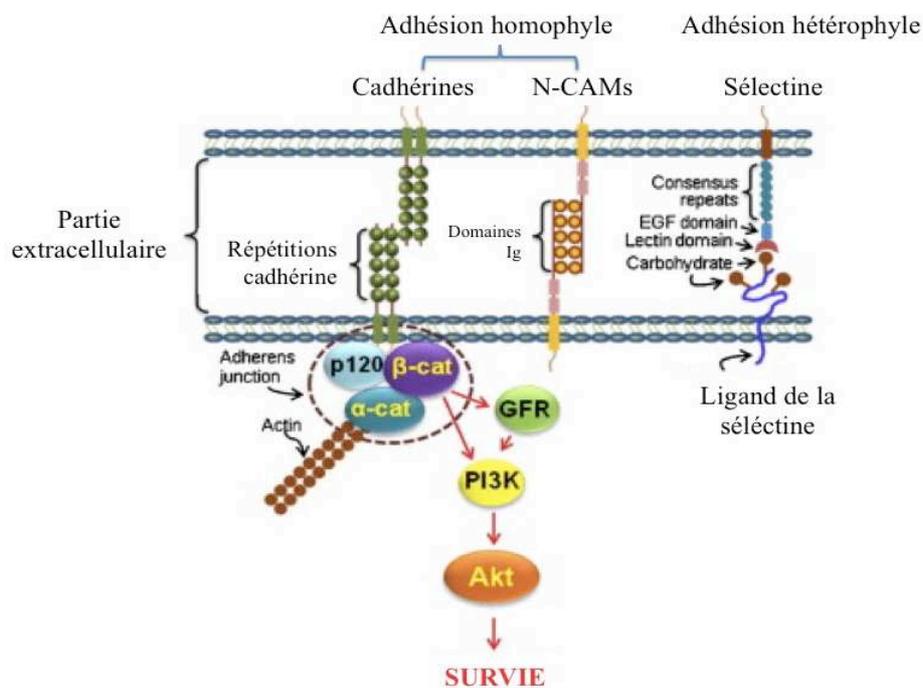
**Figure 19 : illustration schématique de quelques connexions moléculaires des complexes d'adhérence (adhésions focales) impliquées dans les voies de signalisation de survie.** Les voies de signalisation des récepteurs aux facteurs de croissance (GFR) et de l'adhérence sont intimement liées et la régulation peut survenir à plusieurs niveaux. L'adhérence à la MEC peut contrôler le niveau d'expression des GFR, ainsi que leur activation. D'après Gilmore A.P.CDD 2005

La signalisation des intégrines peut agir sur celle des récepteurs aux facteurs de croissance qui sont activés indépendamment de leurs ligands par ces interactions. En fonction du type cellulaire et des voies de signalisations activées, les récepteurs aux facteurs de croissance EGF-R (Epidermal growth factor receptor), HGF-R (hepatocyte growth factor receptor), VEGF-R (vascular endothelial growth factor receptor) et PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor) sont les principaux récepteurs recrutés au niveau de la plateforme des intégrines (Taddei et al., 2012). Dans un modèle de cellules épithéliales squameuses, l'activation de l'EGF-R, médiée par son ligand ou par les intégrines, stimule les voies de signalisation de Erk et de la PI3K, supprimant ainsi l'activité des facteurs de l'apoptose (Taddei et al., 2012). Il n'est donc pas surprenant que les connexions de signalisation entre les intégrines et les récepteurs aux facteurs de croissance puissent influencer l'anoïkis. Par ailleurs, les cellules épithéliales mammaires humaines, les MCF10A, sont dépendantes du signal de transduction initié par l'EGF-R et dans ce cas il semblerait que ce soit la voie classique Erk qui soit impliquée (Reginato et al., 2003). En absence d'adhérence, les cellules MCF10A perdent rapidement l'expression de l'EGF-R à leur surface puis entrent en apoptose. Une surexpression de l'EGF-R dans ces cellules inhibe l'anoïkis. De manière intéressante, différentes lignées de cellules épithéliales mammaires montrent des différences dans la manière dont les intégrines s'associent avec les récepteurs aux

facteurs de croissance pour contrôler l'anoïkis (Wang et al., 2004). Cette interdépendance entre les intégrines et certains récepteurs aux facteurs de croissance rend plausible la possibilité que, dans au moins certains systèmes, l'anoïkis soit due à l'inhibition de la signalisation des facteurs de croissance.

## 2.2. Les interactions cellule-cellule.

Les interactions cellule-cellule fait intervenir diverses molécules membranaires telles que les cadhérines, les sélectines, la NCAM ou d'autres molécules d'adhérence cellulaire. En plus des interactions cellule-MEC, les interactions cellule-cellule jouent un rôle important dans l'anoïkis. Ceci a notamment été décrit dans une étude menée sur des cellules épithéliales des cryptes coliques (CEC) (Hofmann et al., 2007). Ainsi, en centrifugeant ces cellules fraîchement isolées, permettant ainsi de préserver les interactions cellule-cellule, les auteurs ont montré que l'activation des caspases a été bloquée et l'anoïkis empêchée, malgré la perte totale d'adhérence avec la MEC. Cette étude montre donc que les contacts cellule-cellule fournissent de puissant signaux de survie aux CEC, et ceci par le maintien de l'activité de la  $\beta$ -caténine et de la signalisation de Src et de la voie PI3K/Akt (**Figure 20**).



**Figure 20 : Les signaux de transduction médiés par le contact cellule-cellule et conduisant à la survie.** La plupart des molécules d'adhérence cellule-cellule appartiennent à trois familles de protéines: les cadhérines, les IgCAMs (la molécule d'adhérence des cellules neuronales ou NCAM est un représentant de la famille) et les sélectines. Les adhérences cellule-cellule ont des structures spécialisées appelées jonctions adhérentes, où les cadhérines classiques, à travers sa queue cytoplasmique très conservée, interagissent directement ou indirectement avec un groupe de protéines cytoplasmiques appelé les caténines (incluant les  $\alpha$ -,  $\beta$ -, et p120 caténine). Ces complexes cadhérine-caténine sont liés au cytosquelette d'actine par interaction directe

de l' $\alpha$ -caténine avec l'actine. La signalisation de survie stimulée par les adhérences cellule-cellule peut impliquer la PI3K, Akt, et d'autres kinases (comme les MAPK) ou des récepteurs de facteurs de croissance (GFR).

D'après Zhong X et al., Cellular Signaling 2012.

Les points d'attache entre les cellules se font principalement par l'intermédiaire des cadhérines, une superfamille de glycoprotéines transmembranaires. Les cadhérines classiques permettent l'ancrage calcium dépendant entre des cellules adjacentes par l'intermédiaire de leurs domaines extracellulaires contenant une série de cinq répétitions cadhérine conservées. Au moins 15 membres de cette sous-famille sont actuellement connus, y compris la E-cadhérine (qui interviennent dans la liaison homotypique des cellules épithéliales), la N-cadhérine (intervenant dans la liaison hétérotypiques des cellules de mélanome à des fibroblastes), la P-cadhérine (intervenant au niveau des liaisons placentaires), et la VE-cadhérine (au niveau du système vasculaire endothélial) (Green et al., 2010; Takeichi, 1995). Différentes études ont montré que les cadhérines n'avaient pas pour seule fonction l'attachement des cellules entre elles, mais elles étaient aussi des éléments importants pour le réseau complexe de la signalisation de survie. En effet, il a été montré que, dans différents modèles de cellules épithéliales, les contacts cellule-cellule inhibent l'anoïkis et ce malgré une perte d'adhérence à la MEC (Kantak and Kramer, 1998; Pullan et al., 1996). La signalisation des cadhérines favorise principalement la survie PI3K/Akt dépendante (Bergin et al., 2000). En plus de la régulation de survie médiée directement par la signalisation Akt, les cadhérines peuvent également affecter la survie cellulaire grâce à l'association indirecte avec les intégrines et leur signalisation. En effet, certaines intégrines peuvent être localisées au niveau des contacts cellule-cellule. C'est le cas des intégrines  $\alpha 2\beta 1$  et  $\alpha 3\beta 1$  qui peuvent ainsi médier des signalisations de survie en dépit de la perte d'ancrage à la MEC. D'une manière intéressante, ces intégrines sont fonctionnellement associés à l'EGF-R (Yu et al., 2000), bien que les preuves d'un rôle fonctionnel de trans-activation de l'EGF-R comme un signal de pro-survie n'ont pas encore été montrées (Chiarugi and Giannoni, 2008).

### **2.3. Les modifications du cytosquelette.**

Les différences facilement apparentes entre les structures du cytosquelette de cellules adhérentes par rapport à celles en suspension suggèrent que les voies de signalisation dans le déclenchement de l'anoïkis sont susceptibles d'être régulées par le cytosquelette (Frisch and Screaton, 2001). En effet, la morphologie d'une cellule et l'architecture tissulaire sont contrôlées par le cytosquelette et ses connexions avec les intégrines et les cadhérines au niveau des jonctions cellule-MEC et cellule-cellule. Des changements de ces forces mécaniques peuvent altérer les voies de signalisation associées à l'adhérence cellulaire et donc influencer la survie cellulaire (Katsumi et al., 2004).

Le complexe intégrine-taline-paxilline-actine au niveau des hémidesmosomes est un nœud de signalisations essentielles, qui détecte la MEC et transduit des signaux par le biais de diverses protéines comme la kinase FAK et paxilline vers l'aval de la cascade de signalisation (Dedhar, 2000). Les anomalies de morphologie des cellules épithéliales tumorales sont à mettre en relation avec la résistance à l'anoïkis des cellules métastatiques, ce qui suggère que la dynamique du cytosquelette peut jouer un rôle critique dans la régulation de l'anoïkis (Frisch and Screaton, 2001; Pawlak and Helfman, 2001). En effet, plusieurs protéines pro-apoptotiques peuvent être associées au cytosquelette et pourraient réguler l'anoïkis en servant de capteurs de l'intégrité du cytosquelette (Puthalakath et al., 1999; Puthalakath et al., 2001). La protéine pro-apoptotique Bim est associée à la chaîne légère de la dynéine (DLC-1). La perturbation du réseau microtubulaire par le taxol dissocie Bim de la DLC-1, ce qui lui permet de transloquer à la mitochondrie. De même, lors du détachement cellulaire, Bim est libéré de son interaction avec la myosine V (Puthalakath et al., 2001) et s'accumule à la membrane mitochondriale (Hausmann et al., 2011).

#### **2.4. Protection pathologique contre l'anoïkis.**

Les cellules tumorales qui acquièrent un potentiel de malignité développent des mécanismes pour résister à l'anoïkis et ainsi survivre après leur détachement de leur site principal et au cours de leur passage à travers le système lymphatique et circulatoire. Plusieurs études indiquent que le développement de la survie ancrage-indépendant des cellules cancéreuses métastatiques peut résulter de divers processus comme par exemple la mutation des composants ou des régulateurs des voies de survie et / ou de l'apoptose, l'altération de leurs niveaux d'expression ou de leurs niveaux d'activation.

##### **2.4.1. La permutation des intégrines.**

Le changement du répertoire des intégrines peut permettre d'inhiber l'anoïkis durant les phases précoces de la transformation oncogénique ou la colonisation métastatique d'autres tissus. Les intégrines liées activent des signaux de survie tandis que les intégrines non liées peuvent induire l'apoptose. Cette voie, appelée IMD (integrin-mediated death) implique le recrutement et l'activation de la caspase-8 sur l'intégrine en l'absence du ligand (Stupack et al., 2001). Par exemple, l'analyse de l'expression des intégrines montre que les cellules squameuses normales expriment surtout les intégrines  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$  ainsi que, à un taux moins fort, l'intégrine  $\alpha v\beta 5$  qui est capable d'activer l'apoptose intrinsèque lorsqu'elle est non liée. La transition de cellules normales en cellules cancéreuses s'accompagne d'une perte de l'intégrine  $\alpha v\beta 5$  et d'une acquisition de l'intégrine  $\alpha v\beta 6$  contribuant à l'acquisition d'un phénotype résistant à l'anoïkis via la voie Akt (Janes and Watt, 2004). De même, l'intégrine  $\alpha v\beta 3$  se distingue par le fait que, non liée, elle favorise la survie indépendante de l'ancrage *in vitro* et la formation de métastases *in vivo*. Cet effet passe par l'activation de Src et

pourrait expliquer l'association entre intégrine  $\alpha\beta3$  et la progression tumorale retrouvée dans de nombreuses études (Desgrosellier et al., 2009).

#### **2.4.2. Hyperactivation des voies de signalisation de survie.**

L'une des stratégies qui permet aux cellules tumorales de contourner l'anoïkis est d'acquérir une activation constitutive des voies responsables de la survie telles que PI3K, Ras-Erk ou NF- $\kappa$ B. Dans certains cas, ceci peut être accompli par la sécrétion autocrine de facteurs de croissance tels que le bFGF (basic fibroblast growth factor), le HGF, l'IL-8 et le PDGF-AA (Platelet derived growth factor AA) par les cellules de mélanome (Li et al., 2003; Nesbit et al., 1999). TrkB est un récepteur tyrosine kinase neurotrophique qui a récemment été identifié comme un suppresseur puissant et spécifique de l'anoïkis caspase-dépendante via l'activation de la voie PI3K-Akt (Yu et al., 2008; Zhang et al., 2008b). La surexpression de TrkB a été observée dans plusieurs types de cancer comme le neuroblastome (Brodeur et al., 1997), le cancer du pancréas (Sclabas et al., 2005), et le cancer de l'ovaire (Douma et al., 2004; Yu et al., 2008; Zhang et al., 2008b).

Parmi les SFK (Src family kinase), Src est l'une des kinases les plus étudiée et joue un rôle important dans la progression tumorale (Fizazi, 2007). L'activation de Src a été liée à la résistance à l'anoïkis dans de nombreux cancer comme par exemple l'ostéosarcome, le cancer de la prostate ou encore le carcinome pancréatique (Diaz-Montero et al., 2006; Duxbury et al., 2004; Giannoni et al., 2008; Giannoni et al., 2009). Dans des cellules humaines de cancer de côlon ou d'ostéosarcome, la régulation par Src met en jeu la phosphorylation de Akt et donc la voie PI3K/Akt (Diaz-Montero et al., 2006; Windham et al., 2002). Cette voie est régulée par la déphosphorylation induite par la phosphatase PTEN. La délétion du suppresseur de tumeur PTEN est souvent observée dans les cancers de prostate résistants aux traitements et faiblement différenciés, dans lesquels l'activation constitutive de la voie PI3K/Akt entraîne une résistance à l'anoïkis (Davies et al., 1999; Sakamoto and Kyprianou, 2010).

Le proto-oncogene Ras, qui est souvent muté dans différents types de cancer, peut également conférer une résistance à l'anoïkis (Khwaja et al., 1997). Dans des cellules épithéliales intestinales non cancéreuses, l'anoïkis est induite par la diminution d'expression de Bcl-xL causée par l'absence d'adhérence et l'oncogène Ras s'oppose à cette diminution (Rosen et al., 2000).

#### **2.4.3. Génération modérée de ROS (reactive oxygen species).**

L'exploitation du stress oxydatif est une autre stratégie utilisée par les tumeurs pour éviter l'anoïkis. Il est maintenant généralement admis que les cellules cancéreuses produisent plus de ROS que les cellules non transformées. La production modérée de ROS protège les cellules de l'anoïkis via

l'oxydation/activation de Src ce qui entraîne une phosphorylation de l'EGF-R indépendante du ligand activant ainsi des voies de survie (Giannoni et al., 2008). Récemment, l'oxydation de PTEN conduisant à son inactivation avec en conséquence une activation de Akt a été montré comme étant impliquée dans la protection contre l'anoïkis (Mackey et al., 2008). De plus, une augmentation des ROS conduit à l'activation de NF- $\kappa$ B induisant ainsi l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL, XIAP, TRAF1 et c-FLIP (Karin and Lin, 2002).

#### ***2.4.4. L'autophagie induite par le détachement.***

Les cellules tumorales se divisant rapidement, ont besoin d'une production instantanée d'ATP et reprogramment leurs voies métaboliques pour satisfaire cette exigence. L'une des voies les mieux caractérisées concerne l'effet Warburg qui est un passage d'une génération d'ATP via la phosphorylation oxydative à celle d'une génération d'ATP à travers la glycolyse, et ce même à des concentrations normales d'oxygène (Warburg, 1956). La voie Akt est importante pour le transport du glucose et son métabolisme (Elstrom et al., 2004). Par conséquent, une fois détachées, les cellules épithéliales qui n'activent plus Akt, subissent une forte réduction du niveau d'ATP, résultat de la perte de transport du glucose. De plus, cette déficience en glucose réduit la quantité de glucose-6-phosphate et limite le flux à travers la voie du pentose phosphate (PPP, pentose phosphate pathway). Ce flux réduit cause une augmentation très importante des ROS aggravant l'inhibition de la production d'ATP et contribuant à l'induction de la mort cellulaire (Buchheit et al., 2012). Dans ce contexte, l'autophagie, un processus d'auto-digestion hautement régulé, fournit un mécanisme de survie temporaire qui retarde le processus apoptotique donnant éventuellement ainsi aux cellules le temps de se ré-attacher à la MEC et de survivre (Fung et al., 2008). En effet, cette réduction en ATP est détectée par l'AMPK (AMP Activated protein kinase) qui est activée suite à un rapport AMP/ATP augmenté via la kinase LKB1 et active alors la voie classique de l'autophagie, maintenant ainsi le niveau d'ATP au travers du recyclage des produits de dégradation (Kim et al., 2011a). Il a également été montré que l'autophagie pouvait être déclenchée suite au stress oxydatif induit par le détachement. L'autophagie est dans ce cas contrôlée par l'activité de PERK (Endoplasmic Reticulum Kinase). PERK phosphoryle et active le facteur d'initiation de la traduction 2 $\alpha$  induisant ainsi les protéines ATG requises pour l'autophagie (Avivar-Valderas et al., 2011).

#### ***2.4.5. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).***

Pendant la progression tumorale, la TEM est un événement clé pour conférer aux cellules épithéliales des propriétés de motilité et d'invasion (Thiery, 2002). Elles deviennent alors résistantes à l'anoïkis (Frisch et al., 2013). Des événements précoces dans la TEM sont la perte d'expression de la E-cadhérine et l'acquisition d'une expression de N-cadhérine (caractéristique des cellules

mésenchymateuses), le « cadherin switch ». Paradoxalement, alors qu'un rôle protecteur contre l'anoïkis a été attribué à la E-cadhérine dans certaines circonstances, la perte de la E-cadhérine peut promouvoir la survie de cellules mammaires après leur détachement (Derksen et al., 2006; Onder et al., 2008). La N-cadhérine, quant à elle, peut recruter PI3K ce qui active Akt et induit une résistance à l'anoïkis (Cavallaro and Christofori, 2004). Pendant la TEM, il y a induction de plusieurs gènes, tels que Snail, Twist, ZEB1, C-Met et NF-κB. Snail, un facteur de transcription à doigts de Zinc, inhibe la transcription de la E-cadhérine et active la cascade PI3K/Akt (Vega et al., 2004). Twist est un autre facteur de transcription dont l'induction est un facteur de mauvais pronostic. Twist induit des marqueurs mésenchymateux tels que la fibronectine et la N-Cadhérine et régule l'anoïkis en augmentant le ratio Bcl2/Bax (Sosic et al., 2003). ZEB1 cause une augmentation de l'expression de vimentine et une diminution de celle de E-cadhérine (Takeyama et al., 2010). HGF/Met induit une résistance à l'anoïkis au travers de la voie PI3K/Akt qui conduit à une augmentation de la cyclooxygénase-2 dans le cancer de l'endomètre (Kanayama et al., 2008) et au travers de Erk et PI3K dans les cancers de la tête et du cou (Zeng et al., 2002). NF-κB est important pour la TEM dans le cancer du sein (Huber et al., 2004) et ses gènes-cible incluent la survivine, XIAP, Bcl-xL, Bcl-2.

D'autres facteurs de transcription contribuant à la résistance des cellules cancéreuses à l'anoïkis sont les facteurs induits par l'hypoxie (HIFs). Les cellules cancéreuses prolifèrent rapidement, générant ainsi des masses tumorales pauvrement vascularisées caractérisées par des régions hypoxiques. L'activation de HIF-1/2 est déterminante pour activer la TEM permettant aux cellules d'échapper à ce milieu hostile (Keith et al., 2012). Ainsi HIF-1 promeut l'activation de Twist et de NF-κB et maintient l'expression de Snail (Sun et al., 2009).

Récemment, plusieurs microRNA (miR) ont été montrés comme induisant la régulation négative de la TEM. La famille des miR-200 est celle qui a été le plus clairement impliquée dans le maintien du phénotype épithélial. La plupart d'entre eux répriment ZEB1/2 augmentant ainsi l'expression de E-cadhérine et induisant la transition mésenchymo-épithéliale (TME) (Sreekumar et al., 2011). Ainsi, cette famille est sous-exprimée dans les cellules tumorales colorectales situées sur le front invasif (Paterson et al., 2013).

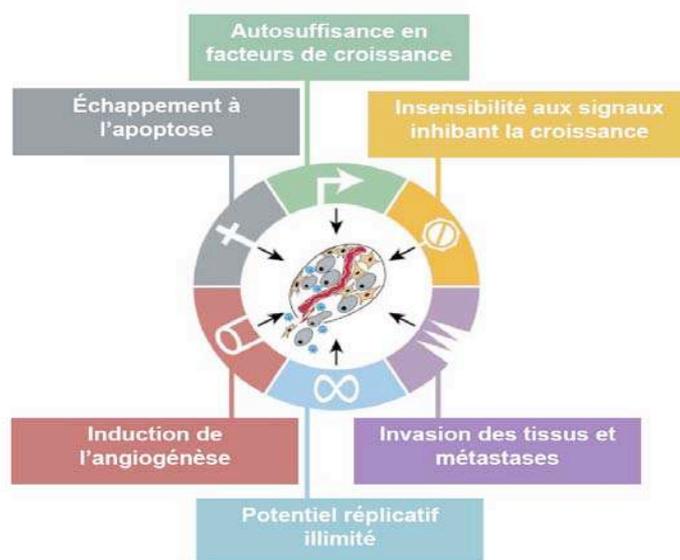
En conclusion, la compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels les cellules cancéreuses échappent aux signaux de mort suite au détachement de la MEC est importante pour comprendre le processus par lequel le cancer peut se propager à des sites distants de la tumeur primaire, ainsi que potentiellement permettre la conception de produits thérapeutiques pour inhiber la propagation de la maladie. La résistance à l'anoïkis joue un rôle dans plusieurs étapes qui conduisent à la formation de métastases. L'augmentation en taille de la masse tumorale contribue à éliminer les interactions entre les cellules et leur matrice et l'apoptose dans cette masse cancéreuse est massive. L'instabilité génomique peut maintenir la survie de certaines cellules et de ce fait augmente la

malignité. Ces cellules peuvent également activer l'autophagie pour échapper à l'anoïkis durant les phases précoces de la progression tumorale. En parallèle, elles reprogramment leur métabolisme conduisant à un phénotype de type Warburg. Il y a également perte des contacts cellule-cellule au niveau du site primaire avec élimination des jonctions adhérentes. Ce processus est surtout dû à l'activation de la TEM en partie en réponse à l'hypoxie intra-tumorale. Les facteurs de transcription qui induisent la TEM confèrent un échappement à l'anoïkis en activant des gènes de survie tels que la voie PI3K-Akt. De plus, des exécutants du programme de TEM tels que Met ou la kinase TrkB augmentent la résistance à l'anoïkis confirmant ainsi l'association entre cette résistance et l'acquisition d'une mobilité. La résistance à l'anoïkis est également nécessaire pour l'étape suivante à savoir la survie dans le flux sanguin et lymphatique. De fait, les cellules malignes circulantes qui sont détectables dans de nombreuses tumeurs sont résistantes à l'anoïkis (Berezovskaya et al., 2005; Howard et al., 2008). La résistance à l'anoïkis peut aussi jouer un rôle lors de l'établissement d'une métastase dans un tissu possédant une MEC différente de l'organe d'origine. Une contradiction apparente entre TEM et métastase est le fait que les cellules de métastases distantes ont souvent un phénotype épithélial. Ceci peut être expliqué par le fait que ces cellules ont subi la transition inverse (TME) soit par une pression locale soit par manque de signaux maintenant la TEM au site de dissémination. Une identification plus claire des partenaires conduisant à la résistance à l'anoïkis ainsi que leur hiérarchie semble nécessaire pour identifier des approches cliniques efficaces pour annuler cette résistance.

### III. Généralités sur les cancers.

Actuellement, dans le monde, environ six millions de personnes décèdent des suites d'un cancer tous les ans (WHO). La lutte contre le cancer est devenue lors de ces dernières décennies un enjeu majeur en termes de santé publique. La recherche s'organise autour de trois questions qui sont étroitement liées: Quelles sont les causes du cancer? Quels mécanismes moléculaires interviennent dans la tumorigénèse ? Quelles thérapies utiliser chez les personnes atteintes de cancers ? Du point de vue cellulaire, le cancer se définit comme une pathologie ayant pour origine des altérations génétiques de cellules somatiques qui entraînent des modifications physiologiques de celles-ci. Ces modifications conduisent à la formation de cellules cancéreuses dont l'une des caractéristiques est de proliférer de façon incontrôlée.

La tumorigénèse, mécanisme permettant la formation de cellules cancéreuses à partir de cellules somatiques, est un processus à étapes. Dans certains types de cancers comme les cancers du côlon, les étapes sont visibles d'un point de vue anatomo-pathologique. De la même façon, les altérations génétiques qui ciblent 2 catégories de gènes : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs, vont avoir pour conséquence de modifier la physiologie des cellules par étapes et non en une seule fois. En adéquation avec cette idée, Hanahan et Weinberg ont proposé que la formation d'une tumeur nécessite l'acquisition de 6 propriétés cellulaires (**figure 21**) (Hanahan and Weinberg, 2000).



**Figure 21 : Modifications acquises au cours de la tumorigénèse.**

Selon cette théorie les cellules doivent accumuler 6 modifications, quel que soit le moyen, pour former un cancer. Ceci serait valable pour la plupart, voire tous les cancers.

D'après Hanahan et Weinberg. Cell, 2000.

## 1. Les cancers du côlon.

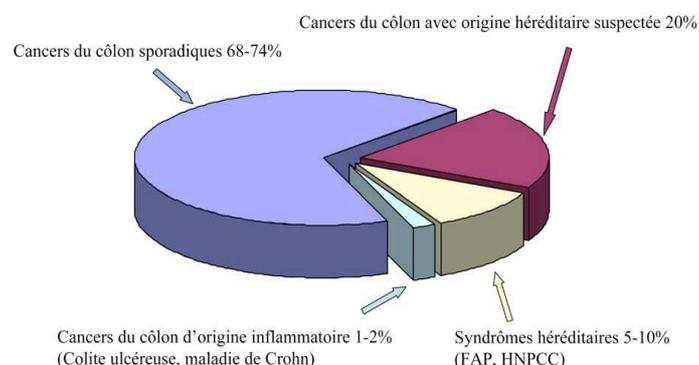
Le cancer du côlon est le 3ème type de cancer le plus répandu dans le monde avec 945.000 cas et 492.000 décès par an (WHO Abbrev, Organisation mondiale de la santé). L'incidence de ces cancers est largement plus élevée dans les pays développés que dans les pays en voie de développement (Weitz et al., 2005). Parmi les facteurs de risque, l'alimentation et la prédisposition génétique sont les plus importants (Fabre et al., 2000).

### 1.1. Les différents types de cancers du côlon.

Dans 5-10% des cas, les cancers du côlon sont d'origine héréditaire (**figure 22**). Les principaux syndromes de prédisposition aux cancers du côlon sont la polypose adénomateuse familiale (FAP), le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC) et le syndrome de polypose juvénile (JPS) (Weitz et al., 2005). Le premier est dû à des mutations du gène suppresseur de tumeur *adenomatous polyposis coli* (APC) conduisant à une inactivation du produit du gène. Dans le deuxième cas, ce sont les mutations de gènes de réparation de l'ADN (MSH2, *MLH1*) qui sont impliquées (Lynch and Lynch, 1998). Pour les JPS, des mutations de *SMAD4* ont été mises en évidence dans un tiers des cas (Howe et al., 1998).

Certains cancers du côlon se développent suite à des maladies inflammatoires telles que la colite ulcéreuse ou la maladie de Crohn. Toutefois, ces cas ne concernent qu'1 à 2% des cancers du côlon (Weitz et al., 2005).

Les cancers du côlon sont donc sporadiques dans 88-94% des cas. Cependant, il est important de souligner que dans certains cas, le fait d'avoir un membre de sa famille déjà atteint augmente le risque de développer la maladie. Cela semble indiquer qu'une origine génétique puisse exister. Ces cas sont évalués à 20% au minimum des cas de cancers sporadiques (Weitz et al., 2005).



**Figure 22 : Répartition des différents types de cancers du côlon.**

## **1.2. Instabilité génomique et méthylation de l'ADN dans les cancers du côlon.**

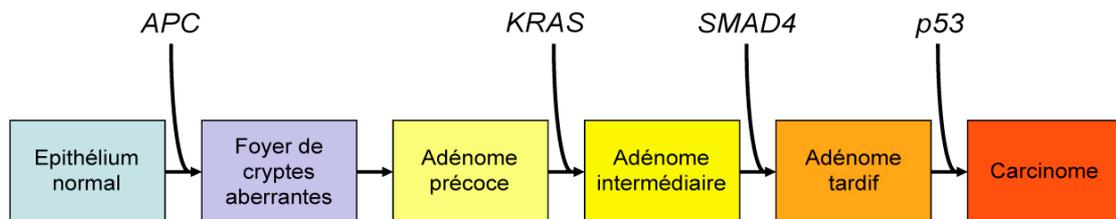
L'accumulation de mutations n'est possible que dans les cellules ayant un phénotype « mutateur », c'est à dire un phénotype qui définit donc un état cellulaire favorable à l'accumulation de mutations, ce qui entraîne le développement de tumeurs dans une proportion supérieure à celle qui pourrait être attendue avec une fréquence de mutation normale (Loeb, 1991). Dans les cancers du côlon, il existe principalement 2 types d'instabilité génomique associés à ce phénotype : l'instabilité chromosomique (CIN) et l'instabilité des microsatellites (MSI) (Worthley et al., 2007). Les CIN représentent la majorité des cas de cancers du côlon avec 70-85% des cas tandis que les MSI se retrouvent dans 20% des cas. De nouveau, les formes héréditaires de cancers du côlon ont été instructives puisque les HNPCC se caractérisent par des mutations des gènes de réparation de l'ADN, *MSH2* et *MLH1* (Li, 2008). Les conséquences sont l'accumulation d'erreurs et donc de mutations dans les séquences génomiques, notamment dans les séquences microsatellites d'où le nom de MSI.

À cette instabilité génomique vont s'ajouter des anomalies de méthylation de l'ADN. Cette modification épigénétique est fréquente dans les cancers du côlon. Certaines tumeurs du côlon présentent des hyperméthylations des cytosines des dinucléotides CpG, notamment dans les îlots riches en CpG situés dans les régions régulatrices des gènes. Ces tumeurs sont appelées CIMP (CpG Island methylator phenotype) (Toyota et al., 1999). Selon les études, 24 à 50% des cancers sporadiques du côlon sont CIMP+ (Worthley et al., 2007). Ces méthylations, en modifiant l'expression de gènes, sont également impliquées dans la tumorigénèse colorectale. Il a notamment été montré que la majorité des cancers sporadiques du côlon MSI+ était associée à des méthylations du promoteur du gène *MLH1* (Weisenberger et al., 2006). La méthylation aberrante est donc également favorable à la mise en place du phénotype « mutateur » dans les cancers du côlon.

## **1.3. La séquence adénome-carcinome dans les cancers du côlon.**

L'étude des formes héréditaires de cancers du côlon a permis de mieux comprendre les mécanismes responsables du développement des cancers colorectaux sporadiques. En effet, il a été mis en évidence que les FAP sont dues à des mutations du gène *APC*. Celui-ci a été cloné et séquencé en 1991 (Grodin et al., 1991; Kinzler et al., 1991). Depuis, il a été montré qu'*APC* était muté dans une majorité des cancers sporadiques (Nagase and Nakamura, 1993). Le produit du gène *APC* est impliqué dans la voie de signalisation WNT. Il est intéressant de constater que dans les tumeurs où *APC* n'est pas muté, d'autres gènes codant pour des membres de la voie WNT présentent des mutations. C'est le cas des gènes codant pour la  $\beta$ -caténine ou l'*AXIN2* (Liu et al., 2000; Morin et al., 1997). L'altération de la voie de signalisation WNT est indispensable à la tumorigénèse colorectale mais cette altération génétique n'est pas la seule à être impliquée. L'équipe de Vogelstein a identifié au moins 3 autres gènes qui sont la cible de mutations dans les cancers du côlon : *KRAS*, *SMAD4* et *p53* (Vogelstein et al., 1988).

La bonne connaissance de l'évolution phénotypique des cancers du côlon a conduit l'équipe de Vogelstein à proposer un modèle de développement des cancers du côlon qui allie modifications génétiques et phénotype (**figure 23**). Ce modèle, bien que très simplifié, a été le premier à illustrer la nécessité d'accumuler un certain nombre d'altérations génétiques lors de la progression tumorale (Fearon and Vogelstein, 1990, Cell 61:759-767).



**Figure 23 : Modèle de tumorigénèse colorectale appelé aussi séquence adénome-carcinome.**

A partir de l'épithélium vont se former des foyers de cryptes aberrantes. Certaines d'entre elles évolueront vers des adénomes et enfin des carcinomes. Le passage vers chaque stade est associé à des modifications génétiques, les mutations d'APC étant impliquées dans l'initiation de la tumorigénèse.

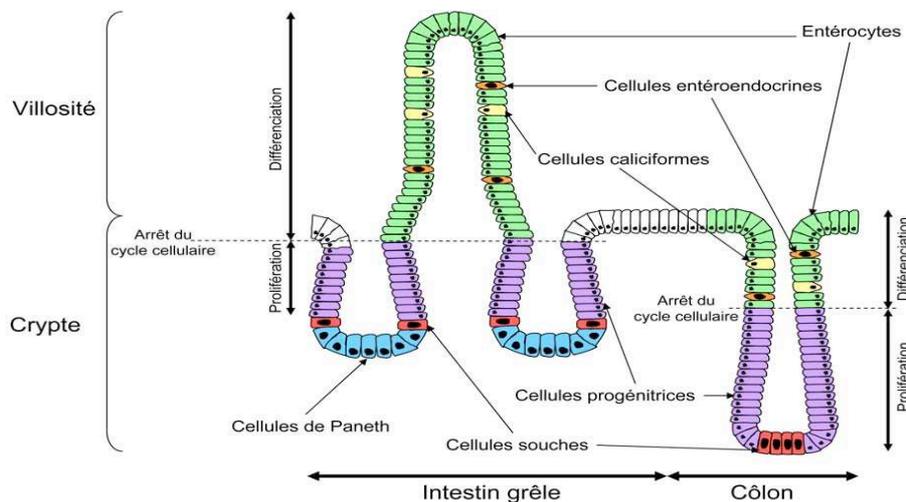
D'après Fearon et Vogelstein. Cell, 1990.

Les cancers du côlon se développent à partir de l'épithélium, dans un premier temps par formation de foyers de cryptes aberrantes. A partir de ces foyers, il peut y avoir développement d'un adénome puis enfin d'un carcinome. Durant ces différentes étapes, il y a accumulation de mutations au niveau des gènes *APC*, *KRAS*, *SMAD4* et *p53* (**figure 23**). L'ordre d'apparition des mutations est fonction de la fréquence des mutations lors des différents stades de la tumorigénèse. Si l'on prend l'exemple de *p53*, celui-ci est muté dans 11-13% des adénomes précoces, 47% des adénomes tardifs et 74% des carcinomes (Vogelstein et al., 1988), ce qui place la mutation de *p53* au niveau des adénomes tardifs dans la séquence adénome-carcinome (**figure 23**). Cependant, dans certaines tumeurs, cette mutation peut survenir avant ou après ce stade. L'ordre dans lequel ces mutations apparaissent n'est donc pas le même pour toutes les tumeurs. De plus, toutes ces mutations ne sont pas forcément retrouvées dans une même tumeur (Smith et al., 2002). Le modèle proposé par Vogelstein n'illustre pas cette complexité d'autant qu'il apparaît de plus en plus évident que d'autres voies de signalisation interviennent dans la tumorigénèse du côlon.

## 2. Structure de l'épithélium intestinal.

Dans tout organe, la fonction d'une cellule, la communication entre cellules ou encore l'agencement des cellules sont contrôlés par des voies de signalisation bien précises. Ce sont ces mêmes voies qui sont également altérées dans les cancers. Avant de présenter les voies de signalisation importantes dans l'homéostasie du côlon, il est important d'introduire la structure du côlon sain chez l'adulte et notamment de l'épithélium à partir duquel se développent les tumeurs.

Le côlon, comme tous les organes du tractus gastro-intestinal, est formé de 4 couches concentriques. En partant de l'extérieur vers l'intérieur, se trouvent une couche externe (sérouse), une couche constituée de muscles lisses innervés (muscleuse), une couche intermédiaire (sous-muqueuse) où se trouve le tissu stromal et enfin la couche interne (muqueuse) qui est composée de l'épithélium et de muqueuse. La surface du côlon est plate, formée uniquement de cryptes et non de villosités comme dans l'intestin grêle (**figure 24**).



**Figure 24 : Structure de l'épithélium intestinal.**

L'intestin grêle et le côlon présentent un épithélium polarisé avec des cellules prolifératives localisées à la base des cryptes. Au fur et à mesure que les cellules migrent vers la partie apicale, elles se différencient pour former les entérocytes et les cellules sécrétrices (cellules caliciformes, cellules entéroendocrines). L'intestin grêle se caractérise par sa structure en villosités et la présence de cellules de Paneth. Le côlon présente une surface plane et les cellules de Paneth sont absentes.

D'après Sancho *et al.*, 2004.

L'épithélium, garant de la fonction intestinale, est constitué de 2 types de cellules : les cellules sécrétrices et les entérocytes. Parmi les cellules sécrétrices se retrouvent les cellules de Goblet, les cellules de Paneth (uniquement dans l'intestin grêle) ainsi que les cellules entéroendocrines. Ces cellules sécrètent respectivement du mucus, des substances bactéricides et des hormones. Les entérocytes sont, quant à eux, impliqués dans l'absorption des nutriments. Que ce soit dans l'intestin

grêle ou le côlon, le renouvellement des cellules en surface est rapide, de l'ordre de 5 jours. Les systèmes de production et de différenciation des cellules sont les mêmes dans les 2 organes. Des cellules souches situées à la base des cryptes fournissent par divisions les cellules progénitrices pouvant donner naissance aux différents types cellulaires de l'épithélium. La prolifération et la différenciation des cellules se font le long de la crypte, les cellules prolifératives se trouvant à la base et les cellules différenciées au sommet des cryptes.

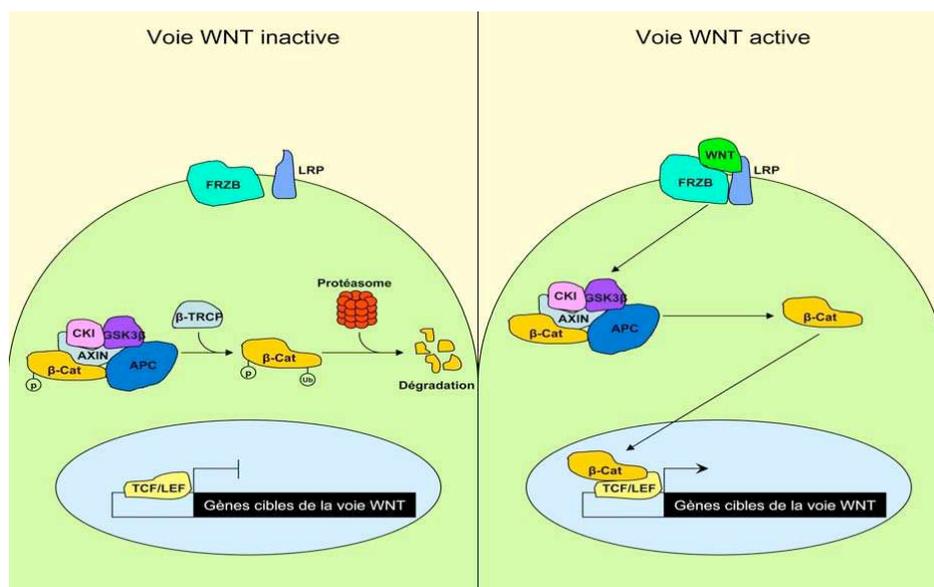
### 3. Les voies de signalisation cellulaire dans le cancer du côlon.

Lors de la tumorigénèse colorectale, la dérégulation d'au moins trois voies de signalisations semble être critique : la voie Wnt/Wingless, la voie Ras/MAPK et la voie du TGF- $\beta$ .

#### 3.1. La voie Wnt/Wingless.

La voie WNT est, dans l'état actuel des connaissances, la voie de signalisation la plus importante dans le côlon. Elle est impliquée dans le développement de cet organe, son homéostasie mais aussi et surtout dans le développement de la majorité, voire de tous les cancers du côlon.

L'activité physiologique de la voie de signalisation Wnt/Wingless régule la prolifération de l'épithélium intestinal au niveau des cryptes (Pinto et al., 2003; van de Wetering et al., 2002). En absence d'une protéine APC fonctionnelle, la  $\beta$ -caténine n'est pas dégradée. Elle s'accumule dans le cytoplasme avant de transloquer dans le noyau. La  $\beta$ -caténine active alors l'expression des gènes cibles de la voies Wnt en absence de ligand (Korinek et al., 1997) (**figure 25**).



**Figure 25 : Représentation schématique de la voie de signalisation WNT.**

Lorsque la voie WNT est inactive, le facteur de transcription  $\beta$ -caténine ( $\beta$ -cat) est associé à un complexe

cytoplasmique comprenant l'AXIN, APC et 3 kinases, GSK3 $\beta$ , PKA et CKI. La phosphorylation par les kinases entraîne l'ubiquitination de la  $\beta$ -caténine par  $\beta$ -TRCP et sa dégradation par le protéasome. Lorsque le ligand Wnt se fixe aux récepteurs membranaires de la famille Frizzled, la  $\beta$ -caténine est libérée du complexe cytoplasmique et va activer l'expression des gènes cibles tels que c-myc et cycline D1, en s'associant aux facteurs de transcription TCF/LEF.

L'activation constitutive de la voie Wnt dans un contexte tumoral donne un avantage aux cellules cancéreuses quant à la prolifération cellulaire. Les cellules cancéreuses maintiendraient aussi un phénotype « cellule souche » leur permettant de proliférer sans limite (Pommier and Kohn, 2003). Ainsi, chez des souris adultes dont le gène *Apc* a été invalidé, on observe l'apparition de polypes hyperplasiques accompagnés de perturbations de la différenciation et de la migration des cellules épithéliales le long des cryptes intestinales (Andreu et al., 2005; Harada et al., 1999). A cause de la fréquence des mutations inactivatrices de la protéine APC dans les cancers colorectaux, ce phénomène a est longtemps été désigné comme l'unique évènement initiateur de la cancérogenèse colorectale.

### **3.2. Les voies Ras-MAPK.**

Des mutations activatrices des proto-oncogènes *K-Ras* et *B-Raf* sont communément observées dans les cancers colorectaux. L'activation constitutive de la voie ERK-MAPK qui en résulte favorise la prolifération et la survie des cellules tumorales (Haigis et al., 2008; Oikonomou and Pintzas, 2006). En utilisant un modèle de souris transgéniques exprimant un gène *K-Ras* muté dans l'ensemble des cellules de la muqueuse intestinale, l'équipe du Dr Louvard a pu montrer qu'au bout de quelques mois, 80% des animaux développent des cancers intestinaux, en absence d'altération de la protéine APC (Janssen et al., 2006). Dans le modèle de cancérogenèse colorectale proposé par les auteurs, la mutation de l'oncogène *K-Ras* entraînerait une activation constitutive des voies MAPK et aboutirait à une prolifération cellulaire anormale. Des travaux complémentaires indiquent qu'il existerait un lien entre la mutation du gène *K-Ras* et l'activation de la voie Wnt. Chez les souris transgéniques *K-Ras(V12G)/Apc(+/1638N)* on observe une progression tumorale accélérée et une mortalité accrue en comparaison avec les animaux présentant des mutations simples *K-Ras(V12G)* ou *Apc(+/1638N)* (Janssen et al., 2006). L'hypothèse avancée suggère une phosphorylation de la  $\beta$ -caténine par la protéine K-Ras. Le complexe E-cadherine/ $\beta$ -caténine serait par conséquent déstabilisé et le pool de  $\beta$ -caténine cytoplasmique grossi. En absence d'une protéine APC fonctionnelle, cette augmentation de la quantité de  $\beta$ -caténine cytoplasmique se traduirait par une augmentation de l'expression des gènes cibles de la voie Wnt (Janssen et al., 2006).

### **3.3. La voie du TGF- $\beta$ .**

Le TGF- $\beta$  est un facteur de croissance impliqué dans le contrôle de la division cellulaire, la différenciation et le contrôle de l'apoptose, etc... (Attisano and Wrana, 2002). Les protéines de la

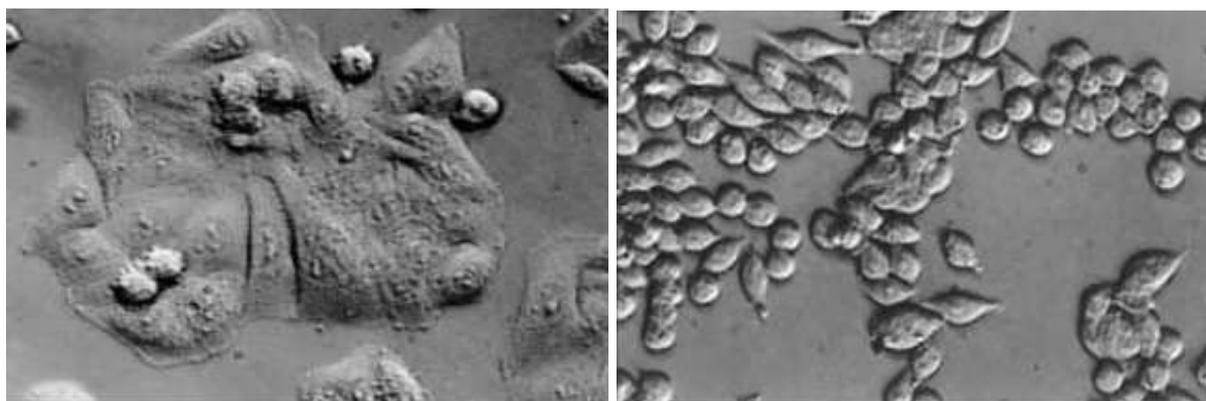
famille Smad sont les intermédiaires de signalisation recrutés en réponse à une stimulation par TGF- $\beta$  (Nawshad et al., 2005). Mais les facteurs Smad peuvent aussi être recrutés lors de l'activation des voies MAPK, PI3K ou Akt (Ahmed and Nawshad, 2007). Sur les cellules épithéliales normales, le TGF- $\beta$  exerce un effet antiprolifératif en régulant positivement l'expression des CKI (cycline kinase Inhibitors) (Ten Dijke et al., 2002). Cependant, des mutations inactivatrices des gènes codant pour les récepteurs au TGF- $\beta$  et les facteurs Smad permettent souvent aux cellules cancéreuses de devenir résistantes à ces signaux (de Caestecker et al., 2000). Une autre fonction du TGF- $\beta$  est de réguler l'expression des protéines de la MEC (Matrice Extracellulaire) notamment de la fibronectine et des collagènes fibrillaires (Elliott and Blobel, 2005). Dans les stades tardifs du cancer (formation de métastases), en participant à la modulation de la composition de la MEC, le TGF- $\beta$  peut être un facteur pro-oncogénique (Xu and Pasche, 2007).

L'altération de la voie du TGF- $\beta$  serait ainsi impliquée dans la progression des adénomes puis dans l'invasion tumorale.

#### **4. Modèle cellulaire de la progression du cancer colorectal.**

Les lignées cellulaires isogéniques du cancer du côlon, SW480 et SW620, peuvent constituer un modèle unique pour étudier les derniers stades de la progression du cancer colorectal. Les cellules SW480 sont dérivées d'un carcinome colique de stade B de Dukes qui a surgi chez un patient de sexe masculin de 50 ans. Lorsque le même patient a subi une laparotomie 6 mois plus tard, une récurrence du cancer a été découverte, avec des métastases au niveau du foie et des ganglions lymphatiques mésentériques. La lignée cellulaire SW620 a été dérivée de l'une de ces métastases ganglionnaires (Leibovitz et al., 1976). Une origine clonale commune a été confirmée pour ces deux lignées car l'analyse cytogénétique a confirmé la présence de marqueurs chromosomiques partagés (Gagos et al., 1995). Elles ont été validées comme un modèle *in vitro* de progression tumorale (Hewitt et al., 2000). Un autre avantage de l'utilisation de ces lignées cellulaires comme modèle de cancer du côlon est qu'il n'y a aucune possibilité de différences induites par les médicaments, puisque la chimiothérapie n'a été démarrée qu'après la laparotomie pour le cancer récurrent.

Les cellules SW480 cultivées *in vitro* ont une morphologie épithélioïde tandis que les cellules SW620 ont une apparence plus fibroblastique avec des contacts cellule-cellule plus lâches (**figure 26**).



**SW480**

**SW620**

**Figure 26: Comparaison de la morphologie des cellules SW480 et SW620.**

En microscopie optique, les cellules SW480 peuvent être considérées comme ayant un étalement, une morphologie de type épithéliale et la capacité de former des groupes plus homogènes, tandis que les cellules SW620 ont une morphologie arrondie ou en forme de fuseau (fibroblastique) et sont moins cohésives.

D'après Hewitt et al. J Pathol 2000.

Des différences ont été également retrouvées au niveau de l'histologie des xénogreffes (Hewitt et al., 2000). Les xénogreffes de SW480 ont un degré plus important de différenciation glandulaire que les xénogreffes de SW620. Cela corrèle avec le fait que la lignée SW620 est dérivée d'une métastase qui était totalement indifférenciée. D'autre part, les tumeurs de cellules SW620 sont plus invasives et infiltrent les tissus normaux adjacents de manière plus marquée que les tumeurs de cellules SW480. Enfin, l'incidence des tumeurs est plus importante pour les cellules SW620 que pour les cellules SW480 et ce quelque soit le site d'injection.

Comme plus de 80% des cancers colorectaux sporadiques, les lignées SW480 et SW620 expriment un produit du gène APC tronqué dans sa partie C-terminale (CAG-TAG(stop)(codon 1338) et donc non fonctionnel (El-Bahrawy et al., 2004). Elles possèdent également une mutation activatrice dans le codon 12 de K-ras tandis que Ha-ras et N-ras sont normaux (Fujita et al., 1988) et partagent la même mutation de SMAD4 ce qui conduit à une perte d'expression de la protéine correspondante (Woodford-Richens et al., 2001). Enfin, elles possèdent la même mutation inactivatrice de p53 (Rodrigues PNAS 1990 ; 87 :7555-7559). Aucune de ces lignées ne présente d'instabilité des microsatellites (MSI).

Nous avons utilisé ce couple de cellules isogéniques, aussi bien dans la première partie de l'étude sur la sensibilité des cellules à l'ABT-737, que dans la deuxième partie du travail, c'est à dire le rôle de la protéine CDCP1 dans la résistance des cellules coliques métastatiques à l'anoïkis.

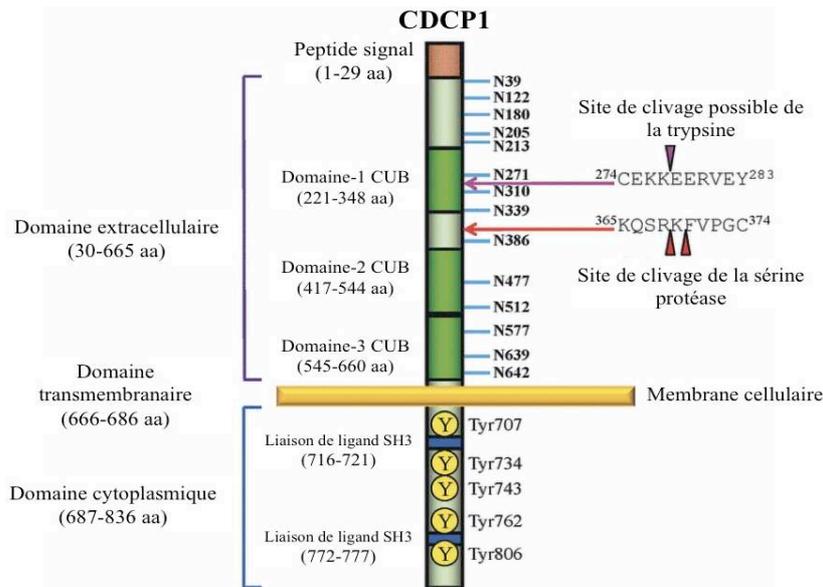


#### **IV. CDCP1 et son rôle dans l'invasion et les métastases des cellules cancéreuses.**

Au cours de ces dernières années, une expression dérégulée de la glycoprotéine de surface de CDCP1 (CUB domain containing protein 1) a été associée avec plusieurs cancers et cette molécule a été reconnue à la fois comme un marqueur tumoral et comme une cible potentielle pour empêcher la progression du cancer. De plus, dans un modèle *in vitro* de cancer du poumon non à petites cellules, il a été montré que CDCP1 était un régulateur clé de la survie cellulaire en suspension (Uekita et al., 2007). Comme il sera décrit dans la section résultats, différentes observations nous ont conduits à penser que CDCP1 pourrait être impliquée dans la résistance à l'anoïkis des cellules SW620. Le paragraphe suivant fait donc le point sur les connaissances actuelles en ce qui concerne cette protéine transmembranaire.

##### **1. Identification et structure de CDCP1.**

CDCP1 (CUB Domain Containing Protein 1) est une glycoprotéine transmembranaire de type I dont le gène a été cloné pour la première fois en 2001 à partir de cellules du cancer du côlon, du fait de son expression préférentielle dans ces lignées cellulaires par rapport à un tissu normal (Scherl-Mostageer et al., 2001). CDCP1 est également connue sous le nom de SIMA135 (subtractive immunisation associated 135kD), (Hooper et al., 2003), gp140 (Brown et al., 2004) et Trask (transmembrane and associated with Src kinases) (Bhatt et al., 2005). Cette protéine transmembranaire est composée de 836 acides aminés contenant un peptide signal terminal de 29 résidus, un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique de 636, 21 et 150 acides aminés respectivement. Le domaine extracellulaire de CDCP1 contient 3 domaines CUB (Complement protein subcomponents C1r/C1s, Urchin embryonic growth factor, and Bone morphogenetic protein 1), 14 sites consensus de N-glycosylation ainsi que 20 cystéines probablement impliquées dans la formation de liaisons disulfures (Bhatt et al., 2005; Brown et al., 2004; Hooper et al., 2003; Scherl-Mostageer et al., 2001). Les domaines CUB se caractérisent par des repliements de type immunoglobuline et pourraient être impliqués dans des interactions protéine-protéine. A proximité de son domaine transmembranaire, CDCP1 contient un motif consensus de palmitoylation (Hooper et al., 2003) et il est possible que l'ajout d'un résidu palmitate régule la localisation membranaire de CDCP1 ainsi que son interaction avec les autres protéines. Dans son domaine cytoplasmique, on note la présence de 5 tyrosines qui peuvent être phosphorylées et d'une région riche en prolines qui pourrait lier des domaines SH3 (Src homology 3 containing proteins) (Brown et al., 2004).



**Figure 27 : Représentation schématique de la structure de la protéine humaine CUB domain-containing protein 1 (CDCP1), y compris le peptide signal.**

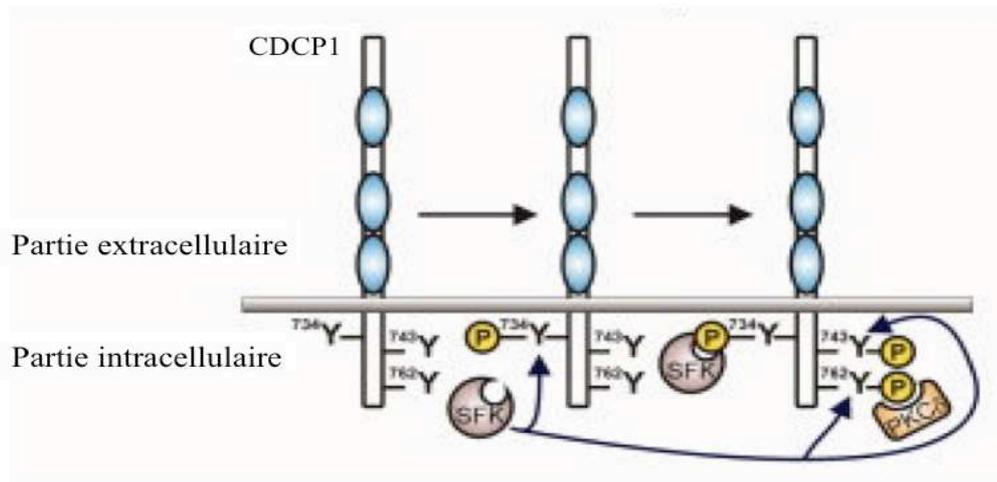
D'après Uekita et al., Cancer Science 2011.

Des travaux antérieurs avaient identifié une partie de la protéine CDCP1 comme une protéine inconnue de 80 kDa, tyrosine phosphorylée en réponse à la perte d'interaction entre l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  et la laminine5 dans des kératinocytes humains (Xia et al., 1996). La séquence complète de la protéine CDCP1 a été établie en 2003 par des approches immunologiques entreprises pour découvrir des protéines impliquées dans la formation de métastases (Hooper et al., 2003). Par la suite, deux différents groupes ont identifié CDCP1 comme une protéine interagissant avec une kinase de la famille Src (SFK) dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-468 (Bhatt et al., 2005) et dans les cellules de l'adénocarcinome du poumon A549 (Uekita et al., 2007). Dans deux autres études, CDCP1 a été identifiée comme interagissant avec la protéine kinase C  $\delta$  (PKC $\delta$ ) (Benes et al., 2005) et avec la tétraspanine CD9 (Andre et al., 2006).

## 2. Les interacteurs de CDCP1.

Un certain nombre de protéines ont été décrites comme pouvant interagir avec CDCP1 : la tétraspanine CD9 (Andre et al., 2006), les protéines d'adhésion cellule-cellule N et P-cadhérine, les protéines d'adhésion cellule-MEC syndécane-1 et syndécane 4 (Bhatt et al., 2005). D'autres protéines ont également été trouvées interagissant avec CDCP1 : la cortactine 1 (Miyazawa et al., 2010), la protéase de surface cellulaire matriptase (MT-SP1) (He et al., 2010), l'intégrine  $\beta 1$  (Casar et al., 2012b) et des protéines de signalisation comprenant les SFKs (Alvares et al., 2008; Bhatt et al., 2005; Hooper et al., 2003; Uekita et al., 2007) et la PKC $\delta$  (Benes et al., 2005; Uekita et al., 2007). Plusieurs

groupes ont montré, en corrélation avec la présence des cinq résidus tyrosine intracellulaires conservés, que CDCP1 est phosphorylée par les SFKs (Benes et al., 2005; Bhatt et al., 2005; Brown et al., 2004; Hooper et al., 2003; Uekita et al., 2007) (**figure 28**).



**Figure 28 : CDCP1 interagit avec les SFKs et la PKC  $\delta$ .**

L'identification des protéines qui activent CDCP1 par association avec son domaine extracellulaire pourrait s'avérer cruciale pour comprendre d'avantage les rôles biologiques de cette protéine.

### 3. Clivage de CDCP1.

CDCP1 est une protéine de 140kDa. Elle peut être clivée dans sa partie N-terminale par des protéases, comme cela a été montré notamment dans diverses cellules cancéreuses (Bhatt et al., 2005; Miyazawa et al., 2010; Uekita et al., 2007; Uekita et al., 2008) et dans des kératinocytes (Xia et al., 1996). Ce clivage du domaine extracellulaire au niveau des résidus R368, K369 et se traduit par la génération d'une plus petite protéine membranaire C-terminale, décrite comme le fragment 70-85 kDa de CDCP1.

Les mécanismes cellulaires régulant la production de la forme courte de CDCP1 restent à déterminer. Un certain nombre de travaux soutiennent la participation d'une sérine protéase. Par exemple, une étude menée sur la lignée MDA-MB exprimant stablement les deux formes de CDCP1, montre que le traitement par l'écotine, un inhibiteur de la trypsine, réduit de façon significative le niveau de CDCP1 clivée, ce qui suggère que ce processus est médié par une sérine protéase (Bhatt et al., 2005). Des observations similaires ont été faites par He et al., sur les cellules cancéreuses de prostate, les PC3 qui expriment de façon endogène les deux formes de CDCP1. Le traitement de ces

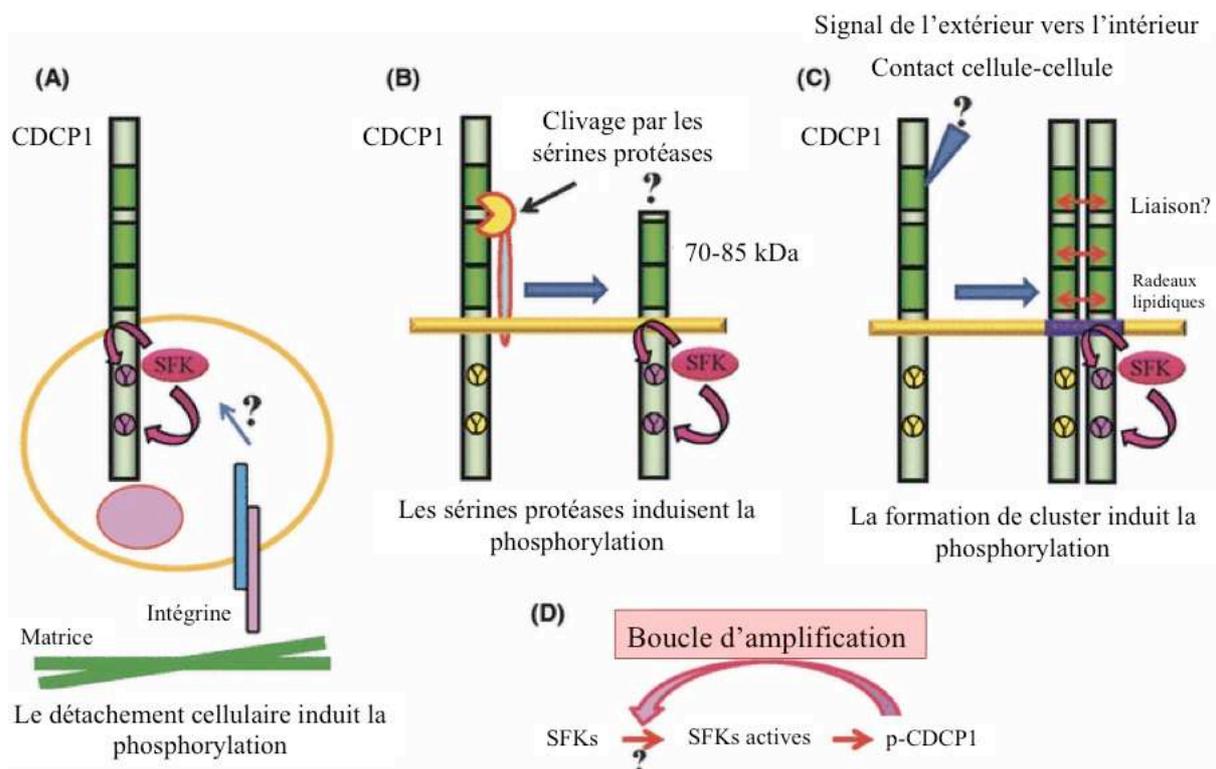
cellules avec de inhibiteurs des sérines protéases, le PMSF et l'aprotinine, entraîne une perte de la forme clivée de CDCP1. De plus un facteur non identifié endogène, présent dans le milieu des PC3, peut médier le clivage de CDCP1 après les résidus R368 et K369 (He et al., 2010).

En outre, des protéases comme la plasmine et la matriptase (MT-SP1) peuvent aussi cliver CDCP1 *in vitro* (Bhatt et al., 2005; Brown et al., 2004). Enfin, Casar et al. ont montré qu'*in vivo*, la plasmine est la sérine protéase endogène responsable du clivage de CDCP1 durant les premiers stades de la colonisation du poumon par des cellules cancéreuses (Casar et al., 2012b).

#### **4. Induction de la phosphorylation de CDCP1 dans les cellules cancéreuses.**

Une caractéristique importante des voies de signalisation de CDCP1 a été élucidée par l'analyse structurale de Benes et al., qui a démontré que la phosphorylation sur tyrosine de CDCP1 par les SFKs est nécessaire pour sa liaison au domaine C2 de la PKC $\delta$  et donc pour la formation du complexe multiprotéique CDCP1-SFK-PKC $\delta$  (Benes et al., 2005). Plus précisément, la phosphorylation de CDCP1 par les SFKs est initiée au niveau de la tyrosine (Y) 734, ce qui entraîne le recrutement des SFKs sur cette tyrosine, la phosphorylation des autres tyrosines Y743 et Y762 et l'engagement de la PKC $\delta$  sur la phospho-Y762 (p-Y762) via le domaine C2. Le domaine C2 a été démontré comme étant un nouveau type de motif de liaison aux tyrosines phosphorylées (Benes et al., 2005). La liaison de la PKC $\delta$  à CDCP1 conduit à sa phosphorylation par les SFK et donc à son activation. Cette observation est importante car elle indique que la liaison entre CDCP1, SFKs et la PKC $\delta$  est susceptible de jouer un rôle important dans les processus normaux et pathologiques. En effet Uekita et al. ont rapporté que la phosphorylation de CDCP1 et de PKC $\delta$  par les SFKs, confère une résistance à l'anoïkis *in vitro* des cellules d'adénocarcinome du poumon (Uekita et al., 2007). Afin de confirmer le rôle de la phosphorylation de CDCP1 dans la progression tumorale, Uekita et al. ont récemment rapporté que la p-Y734 est augmentée dans les nodules tumoraux de cellules de cancer gastrique 44As3 lors de l'invasion péritonéale chez la souris et dans les cellules humaines du cancer gastrique qui envahissent la muqueuse de la paroi gastrique chez la souris par rapport aux cellules cultivées *in vitro* (Uekita et al., 2008).

Les modifications de la phosphorylation de CDCP1 sont influencées par un certain nombre d'événements cellulaires, y compris la protéolyse et l'adhérence/détachement cellulaire.



**Figure 29 : La phosphorylation de la protéine CDCP1 est médiée par un certain nombre d'évènements cellulaire.** (A) La phosphorylation de CDCP1 induite par le détachement cellulaire. La connexion des cellules à la laminine 5 par l'intermédiaire des intégrines entraîne la déphosphorylation de CDCP1, (8) suggérant que les intégrines affectent la phosphorylation de CDCP1 induite par un détachement. (B) les sérine protéases (Packman jaune) clivent la forme longue de CDCP1 (135-140 kDa) pour générer un fragment C-terminal (70-85 kDa), ce qui pourrait induire la phosphorylation de CDCP1. (C) le signal de l'extérieur vers l'intérieur, y compris le contact cellule-cellule à travers le domaine CUB, assemble les clusters de CDCP1 qui sont recrutés au niveau des radeaux lipidiques (ligne violette) et pourrait activer les kinases de la famille Src (SFK) (Alvares et al., 2008) (D) Les moyens d'activation initiaux des SFKs sont inconnus. En revanche, la phosphorylation de CDCP1 par les SFKs active les SFKs. Cette boucle d'amplification (ruban rose) pourrait être importante pour la progression tumorale.

#### 4.1. Détachement cellulaire et phosphorylation.

Dans une ancienne étude, Xia et al. montraient que dans les kératinocytes, la rupture de la liaison intégrine  $\alpha\beta4$ -laminine 5, en utilisant un anticorps monoclonal bloquant anti-laminine 5, augmente la phosphorylation d'une protéine de 70-80 kDa inconnue qui fut par la suite identifiée comme CDCP1 (Xia et al., 1996) (**figure 29A**).

La contribution de la perte d'adhérence cellulaire dans l'augmentation de la phosphorylation de CDCP1 a aussi été montrée dans des expériences dans lesquelles les deux formes phosphorylées de CDCP1 étaient purifiées par affinité en utilisant le domaine SH2 de Fyn comme motif de liaison aux tyrosines de façon plus efficace à partir de cellules A549 cultivées en suspension que dans des cellules adhérentes, (Uekita et al., 2007).

#### **4.2. Clivage et Phosphorylation.**

Le traitement des kératinocytes avec la trypsine entraîne la perte de la forme phosphorylée native à 140 kDa de CDCP1 et l'apparition d'une forme phosphorylée clivée de 75 kDa et il a été proposé que la conversion protéolytique de la forme longue en forme courte de CDCP1 conduit à une phosphorylation accrue de la forme courte (Brown et al., 2004), comme le montre la **figure 29B**. Différents travaux soutiennent le rôle du clivage de CDCP1 dans sa phosphorylation sur tyrosine et donc à l'induction de la signalisation cellulaire. De manière intéressante, deux études ont démontré que le clivage de CDCP1 par les protéases conduit à sa phosphorylation et par conséquent au recrutement de SFKs et PKC $\delta$  à la partie conservée de CDCP1 à la surface des cellules cancéreuses (Casar et al., 2012b; He et al., 2010). Le blocage du clivage de CDCP1 en utilisant soit des anticorps bloquants, soit des inhibiteurs de sérine protéases ou encore en modifiant génétiquement le site de clivage de CDCP1, supprime complètement la signalisation de survie entraînant finalement une inhibition importante de la colonisation des tissus par les cellules tumorales du cancer de la prostate dans des modèles murins ou de la colonisation de la membrane chorioallantoïde d'embryon de poulet (CAM). Toutefois, les partenaires moléculaires capables de transduire les signaux de la forme 75 kDa phosphorylée de CDCP1 à la molécule Akt n'ont pas encore été identifiés ; ce qui laisse un écart critique dans la signalisation CDCP1—Akt (Casar et al., 2012a). De plus, d'autres travaux menés par le groupe de Casar et al. montrent que l'interaction de l'intégrine  $\beta$ 1 active à la forme courte et phosphorylée de CDCP1 induit la voie de signalisation de l'intégrine  $\beta$ 1 impliquant la phosphorylation de la kinase FAK et l'activation PI3-kinase (PI3K)-dépendante de Akt. Ce nouvel axe de signalisation médié par la protéine CDCP1 clivée-intégrine  $\beta$ 1-phospho-Akt met en évidence, de façon mécanistique, le rôle fonctionnel du clivage de CDCP1 dans la motilité accrue des cellules cancéreuses nécessaire au détachement de la tumeur primaire, à l'invasion du stroma adjacent et au franchissement des barrières endothéliales. Ces résultats indiquent que le blocage du clivage de CDCP1 en amont de la signalisation anti-apoptotique par CDCP1 fournirait un mécanisme potentiel d'intervention thérapeutique dans les cancers métastatiques dans lesquels CDCP1 est exprimée (Casar et al., 2012b).

Cependant, ce type de phosphorylation dépendante du clivage n'est pas évident dans la plupart des cellules cancéreuses. En effet, dans de nombreux modèles, la forme longue est elle aussi phosphorylée (Wortmann et al., 2011).

### **4.3. Phosphorylation par assemblage des protéines CDCP1 en grappes.**

Structurellement, CDCP1 semble être un récepteur membranaire qui pourrait être activé par des ligands spécifiques non identifiés. Il est intéressant de constater, d'après les travaux d'Alvares et al., que le regroupement des protéines CDCP1, en utilisant des billes revêtues d'un anticorps anti-CDCP1, conduit non seulement à une augmentation de la p-Y734 de CDCP1, mais aussi à une augmentation de la p-Y416 des SFK et à une accumulation des deux protéines en grappes au niveau de microdomaines résistants au détergent connus sous le nom de radeaux lipidiques (**figure 29C**) (Alvares et al., 2008). Ces données suggèrent que le recrutement des SFKs sur la protéine CDCP1 conduit à l'auto-activation de SFKs qui peuvent entraîner des effets encore non identifiés en aval des SFKs activées et peuvent être la cause ou le facteur contribuant aux phénotypes cellulaires médiés par CDCP1.

### **4.4. CDCP1 et SFK.**

De manière intéressante, la surexpression de CDCP1, ou même les mutants Y743F et Y806F de CDCP1, dans les cellules A375, augmente l'activité des SFKs et induit la formation de métastases dans le mélanome (**figure 29D**) (Liu et al., 2011). L'association entre SFKs et CDCP1 est généralement connue pour être dépendante de la phosphorylation sur la tyrosine 734 de CDCP1 (Uekita et al., 2007). Bien que le mécanisme d'activation initial des SFKs ne soit pas entièrement clair, leur activation par CDCP1 pourrait être importante pour le maintien d'une activité constitutivement élevée de SFKs dans la progression tumorale. Par conséquent comprendre le mécanisme d'activation de SFK est nécessaire pour l'étude de la progression tumorale induite par CDCP1.

## **5. Dérégulation de l'expression de CDCP1 dans les cancers humains.**

L'expression dérégulée de CDCP1 a été associée à un certain nombre de cancers et des données récentes suggèrent un rôle fonctionnel dans les cellules tumorales qui pourrait être ciblé pour perturber la progression du cancer.

L'analyse des examens histologiques de l'expression de CDCP1 a été réalisé par trois groupes sur différents types d'échantillons tumoraux humains : 230 carcinomes de cellules rénales (RCC) (Awakura et al., 2008), 200 échantillons de patients atteints d'adénocarcinome de poumon (Ikeda et al., 2009) et 145 cas de cancer de pancréas (Miyazawa et al., 2010). Ces analyses ont révélé la présence de sous-ensembles de tumeurs avec une expression de CDCP1 relativement élevée. Ces sous-ensembles représentent 77 de 230 cas de RCC, 60 de 200 cas de cancers du poumon et 53 de 145 cas de cancer du pancréas. Ils sont significativement associés à un mauvais pronostic en ce qui concerne la survie sans récurrence et la survie globale. Toutefois, un récent rapport a montré que dans 23 de 110 cas d'adénocarcinome de l'endomètre, les faibles niveaux d'expression de CDCP1 (et non pas les forts

niveaux) sont corrélés à un mauvais pronostic (Mamat et al., 2010). En outre, récemment il a été montré que les tissus du cancer du rein exprimant CDCP1 au niveau de la membrane ont un plus mauvais pronostic que ceux qui l'expriment au niveau du cytoplasme (Razorenova et al., 2011).

Il est donc probable que l'expression totale de CDCP1 dans les cancers est généralement associée à un mauvais pronostic, mais des informations plus développées ainsi que des analyses plus précises seront nécessaires pour déterminer les implications de la localisation subcellulaire et de la phosphorylation sur tyrosine de cette protéine.

Deux études rapportent qu'il existe des événements épigénétiques conduisant à la dérégulation de l'expression du gène de CDCP1 dans un petit nombre d'échantillons de cancer. De ces études, il apparaît que l'expression de CDCP1 est inversement corrélée à la méthylation de CpG. Par exemple, des études utilisant 25 échantillons de patients atteints de cancer du sein ont démontré que l'expression de l'ARNm de CDCP1 est régulée par des méthylations de CpG dans la région du promoteur (Ikeda et al., 2006). Par ailleurs, l'expression de l'ARNm de CDCP1 dans les cellules K562 et cellules hématopoïétiques Jurkat est également inversement corrélée à la méthylation CpG (Kimura et al., 2006). Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les événements épigénétiques menant à une dérégulation de l'expression de CDCP1 et ceci dans de plus grandes cohortes d'échantillons de patients avec des témoins appropriés.

## **6. CDCP1 et les tumeurs hypoxiques.**

L'hypoxie est un facteur environnemental connu pour sa capacité à induire la formation de métastases du cancer. Elle permet de stabiliser le facteur HIF (hypoxie-inductible factor)-1 $\alpha$  et une régulation positive de l'expression du VEGF (vascular endothelial growth factor), qui, à son tour, provoque la formation de vaisseaux qui alimentent les tumeurs (Cassavaugh and Lounsbury, 2011). Par ailleurs, il est connu que la kinase Src affecte non seulement la prolifération cellulaire et la migration, mais peut aussi contrôler l'angiogenèse via une régulation positive de l'expression de VEGF (Mukhopadhyay et al., 1995). Cependant, peu d'études ont porté sur le rôle de l'activité de KAI1 (un gène suppresseur de métastases de la superfamille des tétraspanines) sur l'expression du VEGF et la formation de vaisseaux sanguins dans les tumeurs. Park et al. suggèrent que dans des cellules du cancer de la prostate, les PC3, KAI1 exerce une profonde activité de suppression de métastases sur les tumeurs malignes via l'inhibition de l'activation de CDCP1 induite par Src, suivie par l'induction de la dégradation par le protéasome de HIF-1 $\alpha$  par la protéine VHL (von Hippel-Lindau) et finalement la diminution de l'expression du VEGF (Park et al., 2012). Dans un autre rapport, Emerling et al., ont montré que l'hypoxie induit l'expression et la phosphorylation sur tyrosine de CDCP1 dans un contexte dépendant de HIF-2 $\alpha$  et non pas HIF-1 $\alpha$  pour la régulation de métastases cancéreuses des CCR-CC (Emerling et al., 2013).

Les cellules tumorales hypoxiques sont particulièrement connues pour être agressives, métastatiques et résistantes aux traitements (Le et al., 2004). Ainsi, l'expression de CDCP1 pourrait réguler la malignité des cellules tumorales hypoxiques et la protéine pourrait être une bonne cible thérapeutique pour les tumeurs hypoxiques.

## **7. CDCP1 et son rôle dans la progression tumorale.**

Le rôle de CDCP1 dans la progression du cancer a été mis en évidence par des expériences *in vitro* et dans des modèles animaux. Dans le premier de ces rapports, Uekita et al., ont identifié p-Y-CDCP1 comme une protéine interagissant avec les SFKs dans les cellules humaines du cancer du poumon (Uekita et al., 2007). En effet, dans ces cellules, la phosphorylation de CDCP1 était nécessaire pour échapper à l'anoïkis et permettre une prolifération cellulaire *in vitro* indépendante de l'ancrage. De manière importante, même si la réduction de l'expression de CDCP1 dans les cellules A549 du cancer du poumon par ARN interférence n'a aucun effet sur la prolifération de la tumeur primaire chez la souris, les métastases de ces cellules aux poumons après une injection intraveineuse de la queue ont été significativement réduites (Uekita et al., 2007). En soutien de l'hypothèse que CDCP1 joue un rôle dans la progression tumorale, une étude plus récente de ce groupe a démontré que CDCP1 favorise l'invasion et la diffusion péritonéale d'une lignée cellulaire de cancer gastrique, les 44As3, chez les souris nude (Uekita et al., 2008). Les mêmes observations ont été faites dans des cellules HeLa dans un modèle métastatique d'embryon de poulet (Deryugina et al., 2009). Par ailleurs, Razorenova et al. ont montré que la diminution de l'expression de CDCP1 dans les cellules CCR-CC inhibe la migration cellulaire et que cela pourrait être ré-augmentée par la surexpression d'un mutant constitutivement actif de la PKC $\delta$  (Razorenova et al., 2011). L'ensemble de ces résultats indiquent que la PKC $\delta$  activée, induite par phospho-CDCP1, est l'un des principaux médiateurs des propriétés associées aux métastases et à l'invasion des cellules cancéreuses (Uekita and Sakai, 2011). Une étude plus récente suggère que l'activation de PKC $\delta$  par CDCP1 est accompagné d'une diminution de la phosphorylation de la kinase d'adhésion focale (FAK), qui pourrait être responsable de la régulation de l'adhérence et la motilité cellulaire (Benes et al., 2012).

En résumé, ces différents travaux ont montré que CDCP1 peut réguler le potentiel métastatique et que l'inhibition de sa fonction pourrait être une approche thérapeutique alternative aux traitements classiques.

## 8. Opportunités et défis pour le ciblage de CDCP1 dans le cancer.

CDCP1 est une protéine tyrosine-phosphorylée et semble jouer un rôle majeur dans plusieurs types de tumeurs solides. Il existe de nombreuses données à la fois *in vitro* et *in vivo* suggérant que CDCP1 est un régulateur essentiel de la formation de métastases tumorales dans des modèles expérimentaux, en contrôlant plusieurs processus biologiques dont la résistance à l'anoïkis, la migration cellulaire, l'invasion des cellules, la sécrétion de métalloprotéinases de la matrice (MMP) et la formation des invadopodes. Il est probable que l'expression aberrante de CDCP1 facilite la progression du cancer chez l'homme. En conséquence, le ciblage de CDCP1 peut représenter une approche intéressante pour traiter certaines tumeurs. Cependant, il existe un point majeur concernant cette approche à savoir que CDCP1 est aussi largement exprimée dans les tissus normaux. Par exemple, l'ARNm de CDCP1 a été détecté dans une série d'organes, y compris le muscle squelettique, le côlon, le rein, l'intestin grêle, le placenta, les poumons, l'estomac, l'œsophage et le rectum (Hooper et al., 2003; Scherl-Mostageer et al., 2001), tandis que la protéine CDCP1 a été décrite dans les cellules épithéliales du côlon (Hooper et al., 2003), du poumon, du pancréas, des sous-ensembles tubulaires du rein et les hépatocytes du foie (Alvares et al., 2008; Siva et al., 2008), ainsi que des cultures primaires de kératinocytes de prépuces (Brown et al., 2004), certaines lignées hématopoïétiques et les cellules progénitrices mésenchymateuses et neuronales (Buhring et al., 2004; Conze et al., 2003). En revanche, les cellules endothéliales microvasculaires et les fibroblastes n'expriment pas CDCP1 (Hooper et al., 2003). Par conséquent, comme l'a montré précédemment Buhring et al., le ciblage de CDCP1 dans le cancer peut non seulement éliminer les cellules tumorales, mais peut aussi avoir un impact négatif sur la survie des cellules normales (Buhring et al., 2004). Toutefois, ce problème n'est certainement pas insurmontable car il existe des médicaments anticancéreux comme les petites molécules ou des anticorps monoclonaux qui ciblent des protéines à large distribution et qui sont généralement bien tolérés (Widakowich et al., 2007).

Le développement d'un anticorps monoclonal dirigé contre CDCP1 pour contrôler la signalisation médiée par CDCP1 est actuellement en cours. Cet anticorps inhibe la migration et l'invasion des cellules PC3 du cancer de la prostate. Lorsque l'anticorps anti-CDCP1 est couplé à la saporine (une toxine inactivant des ribosomes), directement ou indirectement par l'intermédiaire d'un anticorps secondaire, il induit la mort des PC3. Cet anti-CDCP1 conjugué à la saporine inhibe également de façon significative la croissance de la tumeur primitive et la formation de métastases vers les ganglions lymphatiques des souris des cellules PC3 (Siva et al., 2008). Plus récemment, il a été montré qu'un anticorps monoclonal humain ciblant spécifiquement CDCP1 inhibe la formation de colonies indépendantes de l'ancrage dans la gélose molle ainsi que la formation de métastases expérimentales dans la CAM (Fukuchi et al., 2010).

À ce jour, il existe peu de données quant à la phosphorylation de CDCP1 dans les tissus humains normaux. Wong et al. ont montré que la phosphorylation de CDCP1 est détectée au niveau des cellules épithéliales pulmonaires détachées (Wong et al., 2009) et des sommets des villosités intestinales où les cellules sont souvent exfoliées dans la lumière (Spasov et al., 2009). La phosphorylation de CDCP1 est strictement régulée dans les tissus normaux, mais dérégulée dans les cancers humains. Conformément à cela, la phosphorylation de CDCP1 est détectée dans les cellules humaines envahissant la paroi gastrique (Uekita et al., 2008) et les zones périphériques des réseaux de cellules tumorales du poumon (Ikeda et al., 2009), tandis qu'elle est absente dans les tissus adjacents normaux. Ainsi, la phosphorylation de CDCP1 est une cible prometteuse contre la progression tumorale.

Si la protéine CDCP1 ou les voies de signalisation médiées par CDCP1 peuvent constituer des cibles intéressantes pour le traitement du cancer, un défi important est de comprendre comment les interactions entre CDCP1 et les autres protéines régulent la fonction de CDCP1. La complexité potentielle de cette tâche est indiquée dans les rapports résumés plus tôt que CDCP1 interagit avec un nombre croissant de protéines connues pour être importantes dans les événements anormaux d'adhérence/détachement cellulaire, caractéristiques des différentes les étapes de la progression tumorale.

La cascade métastatique est un processus inefficace en plusieurs étapes qui nécessite que les cellules cancéreuses expriment et utilisent un ensemble défini de protéines cellulaires afin de compléter chaque étape. Ainsi, chaque étape de cette cascade représente un point potentiel d'intervention thérapeutique pour prévenir la propagation métastatique du cancer et, par conséquent, constitue une mesure de contrôle de la maladie du cancer. Par conséquent, une meilleure compréhension des voies et des protéines impliquées dans ce processus, comme CDCP1, pourrait contribuer à l'amélioration des stratégies de traitement du cancer à l'avenir.



---

## **OBJECTIF DE LA THÈSE**

---



L'objectif de la thèse était d'étudier la sensibilité à l'anoïkis de cellules cancéreuses métastatiques comparées aux cellules de la tumeur primaire. Pour ce faire nous avons utilisé une paire de lignées isogéniques : la lignée SW480, dérivée d'une tumeur colorectale , et la lignée SW620, dérivée d'une métastase ganglionnaire de cette même tumeur. Alors que les cellules SW480 sont sensibles à l'anoïkis , les cellules SW620 sont résistantes. Dans une première partie, nous avons voulu déterminer quels étaient les mécanismes moléculaires responsables de cette différence en étudiant particulièrement les protéines de la famille Bcl-2. Au cours de ce travail, nous avons également étudié la sensibilité relative de ces deux lignées à un BH3-mimétique, l'ABT-737. Dans une deuxième partie, nous avons cherché à définir le rôle de la protéine transmembranaire CDCP1, qui est surexprimée dans le cancer du colon, dans la résistance à l'anoïkis des cellules SW620.



---

# RÉSULTATS

---



Résumé en français de l'article publié :

**Les cellules coliques métastatiques SW620 sont prédisposées à la mort lorsqu'elles sont détachées et peuvent être sensibilisées à l'anoïkis par le BH3-mimétique ABT-737**

A Maamer-Azzabi<sup>1</sup>, O Ndozangue-Touriguine<sup>2</sup> et J Bréard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U1004, Hôpital Paul Brousse , 94800 Villejuif.

<sup>2</sup>L'Oréal-River Plaza, 92600 Asnières-sur-Seine.

L'anoïkis, une forme d'apoptose dépendante de Bax initiée lors du détachement de la matrice extra-cellulaire, est souvent inhibée dans les cellules cancéreuses métastatiques. Au cours de l'étude d'une paire de lignées colorectales isogéniques dérivées soit de la tumeur primaire (SW480) soit d'une métastase ganglionnaire (SW620) nous avons trouvé que seules les cellules SW480 étaient sensibles à l'anoïkis. L'augmentation du niveau d'expression de Bim et non la dégradation de Mcl-1 a été déterminée comme étant un facteur critique de l'initiation de l'anoïkis dans les cellules SW480. Sa phosphorylation par ERK cible Bim pour son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Un inhibiteur de MEK (PD0325901) s'est révélé capable d'augmenter l'expression de Bim dans les cellules SW620 et de les sensibiliser à l'anoïkis. Ainsi, dans les deux types cellulaires, l'anoïkis est sous le contrôle de membres de la famille Bcl-2. Le BH3 mimétique ABT-737 non seulement augmente le taux d'apoptose dans les cellules SW480 en suspension mais de plus sensibilise les cellules SW620 à l'anoïkis. De fait, les deux lignées cultivées en suspension sont prédisposées à la mort étant donné qu'elles expriment des complexes Bcl-2:Bim et Bcl-xL:Bim. En revanche, les cellules SW480 et SW620 en adhérence sont résistantes à l'ABT-737. Ces résultats indiquent que, qu'elles soient ou non sensibles à l'anoïkis, les cellules cancéreuses coliques détachées de la matrice extra-cellulaire pourraient passer dans une phase transitoire de sensibilité aux BH3 mimétiques. Ceci conférerait à des composés tels que le Navitoclax ou l'ABT-199 une fenêtre thérapeutique pendant laquelle ils auraient une activité anti-métastatique.

## **Introduction**

L'ABT-737 est une petite molécule qui se lie avec une haute affinité à Bcl-2 et Bcl-xL mais non à Mcl-1 et inhibe leur fonction anti-apoptotique. Il agit en synergie avec de nombreux composés chimiothérapeutiques pour induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses. Le Navitoclax (ABT-263), une forme orale de l'ABT-737, est couramment testé dans des essais cliniques de phase 2. En dépit de résultats préliminaires prometteurs, la thrombocytopénie empêche d'augmenter le dosage. Depuis, l'ABT-199, un inhibiteur sélectif de Bcl-2 sans activité sur Bcl-xL, s'est montré capable d'avoir une activité anti-tumorale dans la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) en tant qu'agent seul tout en épargnant les plaquettes. L'ABT-737 et les composés voisins induisent l'apoptose seulement dans les cellules cancéreuses qui sont dépendantes de Bcl-2 et de Bcl-xL pour leur survie. Cette dépendance semble corrélée avec la formation de complexes entre ces protéines anti-apoptotiques et les protéines à BH3 seul de type activatrices. De telles cellules ont été désignées comme étant prédisposées pour la mort. Les BH3 mimétiques, en déplaçant les protéines à BH3 seul activatrices de Bcl-2 ou de Bcl-xL, permettent leur interaction avec et leur activation de Bax ou Bak. Dans les cellules où ces complexes n'existent pas, l'exposition à des molécules de chimiothérapie a souvent été montrée comme induisant l'expression de protéines à BH3 seul activatrices conduisant à une synergie entre ces agents et les BH3 mimétiques.

Il a été décrit que, cultivées en suspension, certaines cellules sensibles à l'anoïkis induisent l'expression de Bim ou de Bmf. Nous avons donc voulu déterminer si la mise en suspension pouvait sensibiliser ces cellules aux BH3 mimétiques. Dans ce but, nous avons utilisé une paire de lignées cancéreuses coliques isogéniques : la lignée SW480 issue d'une tumeur colique primaire et la lignée SW620 dérivée d'une métastase ganglionnaire chez le même patient.

## **Résultats**

Nous avons trouvé que les cellules SW480 étaient sensibles à l'anoïkis alors que les cellules SW620 étaient résistantes et qu'il s'agissait d'une apoptose intrinsèque débutant à la mitochondrie.

Parmi les protéines de la famille Bcl-2, seul l'expression de Bim varie et augmente dans les cellules SW480 alors qu'elle reste constante dans les cellules SW620. L'extinction de l'expression de Bim à l'aide d'un siRNA spécifique protège les cellules SW480 de l'anoïkis.

La demi-vie de Bim est sous le contrôle de la kinase ERK qui le phosphoryle entraînant alors sa dégradation par le protéasome. L'inhibition de la voie ERK dans les cellules SW620 restaure l'expression de Bim et sensibilise ces cellules à l'anoïkis.

Cultivées en adhérence, les cellules SW480 et SW620 sont résistantes à l'ABT-737. En revanche, ce composé augmente le taux d'apoptose dans les cellules SW480 cultivées en suspension et, de manière plus inattendue, sensibilise les cellules SW620 à l'anoïkis. De fait nous avons trouvé que la culture en suspension prédisposait ces deux types cellulaires à la mort car elle induit la formation de complexes Bcl-2:Bim et Bcl-xL:Bim.

## **Conclusion**

Qu'elles soient ou non sensibles à l'anoïkis, les cellules coliques tumorales en suspension sont prédisposées à la mort et induites en apoptose par l'ABT-737.



## **Mécanismes moléculaires de la résistance à l'anoïkis des cellules coliques métastatiques : rôle de la protéine CDCP1.**

### **Introduction.**

La progression d'une tumeur depuis un stade bénin associé à une croissance limitée vers un stade invasif et métastatique est la cause majeure d'échec des traitements anti-cancéreux chez les patients. En effet, la capacité d'une tumeur à métastaser est le déterminant majeur de la mortalité des patients atteints de cancer. Les métastases restent la cause de 90% des décès de tumeurs solides (Christofori, 2006). La formation de métastases à distance nécessite qu'une cellule tumorale module ses capacités d'adhérence, dégrade la matrice extracellulaire environnante, migre en augmentant sa motilité et son pouvoir invasif, entre et survive dans la circulation puis prolifère à un site secondaire et stimule l'angiogenèse. La mort par anoïkis des cellules épithéliales lors de leur détachement de la MEC, dont les mécanismes de régulation ont été décrits dans l'introduction, est donc un processus anti-métastatique. Il n'est donc pas surprenant que les derniers stades de la progression tumorale soient souvent accompagnés d'une perte de sensibilité à l'anoïkis. Au cours de ces dernières années, un nombre croissant de travaux indiquent que la glycoprotéine membranaire CDCP1 (Scherl-Mostageer et al., 2001) joue un rôle important dans la stimulation des métastases dans des modèles *in vivo* et dans l'altération des phénotypes cellulaires appropriés à la progression du cancer (Deryugina et al., 2009; Miyazawa et al., 2010; Uekita et al., 2007; Uekita et al., 2008). Nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires de la résistance à l'anoïkis de cellules coliques métastatiques, en particulier au rôle de la protéine CDCP1.

Pour notre étude, nous avons utilisé le même modèle cellulaire ayant servi à l'étude de la sensibilité à l'ABT-737 à savoir le couple de lignées isogéniques de carcinome colique SW480 et SW620.

## **Matériels et méthodes.**

### **Lignées cellulaires et condition de culture.**

Le modèle cellulaire que nous avons utilisé pour notre étude est un couple de cellules isogéniques de carcinome colorectal humain : la lignée SW480 issu d'un cancer colique primaire, la lignée SW620 issue d'une métastase ganglionnaire chez le même patient et une autre lignée produite dans notre laboratoire, exprimant de façon stable la protéine CDCP1, la lignée SW480-CDCP1. Les cellules sont cultivées dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) riche en glucose (4,5g/l) et stable en glutamine (PAA Laboratories). Le DMEM est supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (PAA Laboratories), 1% de sodium pyruvate et 2mM d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine, néomycine) (GIBCO). Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>.

Pour la culture en suspension, 2 unités/ml de dispase (GIBCO BRL) ont été ajoutées au milieu de culture afin d'obtenir une suspension unicellulaire. La dispase est une protéase neutre d'origine bactérienne avec une légère action protéolytique qui est principalement utilisé pour l'isolement et les passages de routines des cellules primaires. Elle peut aussi dissoudre les matrices extra- et intercellulaires (Matsuoka et al., 1998), ce qui conduit à l'obtention de suspensions unicellulaires. La dispase n'est pas neutralisée par le sérum, et compte tenu de son absence de toxicité, elle est un moyen très efficace pour garder les cellules adhérentes en suspension unicellulaire.

### **Réactifs et anticorps.**

Les solutions stock du Dasatinib (Selleckchem) a été préparé dans du DMSO à 10mM et utilisé à 250nM. LY294002 (Calbiochem) et le PD0325901 (Sigma Aldrich) ont été préparées dans du DMSO à 10mM. Les dilutions finales sont 10µM (LY et PD).

Les anticorps anti-Bax (N-20), anti-Bcl2 (H-100), anti-Mcl-1 (S-19), anti-Hsc70 (B-6) proviennent de chez Santa Cruz Biotechnology, Inc. L'anti-Bid vient de chez R&D SYSTEMS. L'anti-Bcl-xL est de chez BD Transduction Laboratories. L'anti-Actin est de chez MBL. Les anticorps anti-Bim, anti-caspase-3 clivée, anti-CDCP1, anti-p-Erk et anti-Erk total, anti-ITGB4, anti-Src, anti-p-Src, anti-PKCδ, anti-p-PKCδ proviennent de chez Cell Signaling. L'anti-phosphotyrosine 4G10 vient de chez Upstate Biotechnology. L'anti-Rho (clone 26C4) a été fait au laboratoire, anti-Rac1 (clone 102) provient de chez BD Transduction Laboratories et l'anti-Cdc42 a été donné par Philippe Chavrier.

### **Western blot et immunoprécipitation.**

Les cellules sont lysées en tampon de lyse froid (30 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% Glycérol, 10 mM NaPP et 1% NP40) supplémenté avec 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> et un cocktail d'inhibiteurs de protéases de chez Sigma au 1/100). Le culot nucléaire et les débris sont retirés par centrifugation à 15000 rpm pendant 20 min à 4°C. Les concentrations

protéiques sont évaluées en utilisant la méthode du dosage du Bradford de chez BioRad. 50µg de lysats protéiques de chaque échantillon est incubé dans du tampon de charge (60 nM Tris-HCL pH 6.8, 0,18 M β-mercaptoéthanol, 2% SDS, 10% glycérol et 0,005 % bleu de bromophénol) et porté à ébullition. Les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE et transférées sur une membrane PVDF (Amersham Hybond-LFP). Les membranes sont bloquées pendant 1 heures dans du TBS-T (TBS (Tris-Buffered Saline/Tween 20 0,2%) avec 5 % de BSA avant incubation avec les anticorps primaires et secondaires spécifiques dilués dans du TBS-T. Les membranes sont lavées et la révélation des protéines s'effectue avec l'utilisation des anticorps secondaires de chez Lycor et le système d'imagerie Odyssey.

Pour les immunoprécipitations, les cellules sont lysées en tampon de lyse Brij 97 (30 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% Glycérol, 10 mM NaPP et 1% NP40) supplémenté avec 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> et un cocktail d'inhibiteurs de protéases). Le culot nucléaire et les débris sont retirés par centrifugation à 15000 rpm pendant 20 min à 4°C. Six mg de protéines du lysat cellulaire sont incubés avec 1µg d'anticorps spécifiés pendant 1h à 2h sur roue. Les billes de protéines G sont ajoutées aux complexes immuns pendant 45 min à 4°C sur roue, lavées 5 fois dans du tampon de lyse froid puis bouillies pendant 5 min dans un volume équivalent de tampon Laemmli et analysées par western blot.

#### **Analyse des cellules apoptotiques par cytométrie en flux.**

Les cellules mises en suspension au cours d'une cinétique allant de 24h à 72h sont ensuite lavées dans du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) et fixées à l'éthanol 70% à 4°C. Elles sont alors conservées à -20°C au moins pendant 24h puis marquées à l'iodure de propidium, intercalant de l'ADN utilisé à la concentration de 50µg/ml. L'éthanol permet la fixation des cellules et la perméabilisation de la membrane cytoplasmique. Les fragments nucléaires de type oligonucléosome, capables de traverser les pores nucléaires et donc présents dans le cytoplasme, traversent la membrane perméabilisée et l'on observe alors en cytofluométrie un pic subG1. L'analyse du contenu en ADN des cellules en cytométrie de flux est réalisée avec l'appareil FACSCalibur<sup>®</sup> (Becton-Dickinson) et avec le logiciel CellQuest<sup>®</sup>.

#### **L'interférence ARN (siARN).**

3.10<sup>4</sup> cellules ont été transfectées par un siARN CDCP1, siARN ITGB4 ou un siARN contrôle en utilisant comme agent transfectant l'INTERFERin (Polyplus transfection, Ozyme) selon le protocole de reverse transfection du fabricant. Les différentes expériences ont été réalisées en plaque 6 puits. Le mélange de transfection est composé de 800µl de DMEM sans sérum, 20µl d'INTERFERin et 20µM d'oligonucléotide. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 20 min dans le puit de la plaque pour permettre la formation de complexe de transfection. En parallèle, les cellules ont été détachées, lavées une fois avec du milieu complet puis resuspendues dans 3ml de milieu complet et

ajoutées au mélange. Soixante douze heures après transfection, les cellules sont mises en suspension à l'aide de la dispase pour une cinétique allant jusqu'à 72h, puis le pourcentage des cellules apoptotiques a été quantifié. L'extinction de l'expression de CDCP1 au cours de la cinétique a été analysée par western blot.

Les siARN utilisés sont :

CDCP1 est : D-010732-02 : CAUCAAGUCUGGAGAAAGA (Dharmacon).

ITGB4 est : s7584 : GCGACTACACTATTGGATT (Dharmacon)

### **Test de blessure.**

Les cellules SW480 et SW480-CDCP1 sont mises en culture dans des boîtes de Pétri jusqu'à confluence puis une strie (blessure) est effectuée à l'aide d'un cône des pipettes 200µl sur une diagonale. La migration des cellules, détectée en microscopie inverse (grossissement 10), a été filmée sur 24h (une prise de vue toutes les 10mn) et les vitesses de migration ont été analysées et comparées.

### **Précipitation par affinité de Rho-GTP.**

La technique consiste à « pêcher » sélectivement la forme GTP de Rho grâce au domaine de liaison à Rho (Rho-binding domain, RBD) de l'un de ses effecteurs, en l'occurrence la Rhotékinine. Une protéine de fusion GST-TRBD est préparée dans des bactéries et couplée le jour de l'expérience à des billes de glutathion Sépharose 4B. Les cellules sont lysées dans le tampon de lyse (50mM Tris, pH 7.2, 500mM NaCl, 1% Triton x-100, 0,5% Na deoxycholate, 0,1% SDS, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10µg/ml leupeptine, 10µg/ml aprotinine, 1mM PMSF). Les lysats cellulaires sont clarifiés par centrifugation et 1/10<sup>ème</sup> du volume est prélevé pour utilisation en western blot. Le reste du lysat est incubé avec 20µl de billes GST-TRBD pendant 60 mn à 4°C sous agitation. Les préparations sont centrifugées et le culot de billes est repris dans 5400µl de tampon de lavage (50mM Tris, pH7.2, 1% triton X-100, 150mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10µg/ml leupeptine, 10µg/ml aprotinine, 1mM PMSF) et lavé 3 fois dans ce tampon. Les billes sont resuspendues dans du tampon de charge et portées à ébullition. Les suspensions sont centrifugées et les protéines contenues dans les surnageants sont séparées par électrophorèse en parallèle avec l'aliquot total prélevé avant la précipitation par affinité. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps anti-Rho et les protéines révélées par chimioluminescence.

La précipitation par affinité de Rac-GTP et Cdc42-GTP est faite de la même manière mais le domaine RBD de Rhotékinine est remplacé par le domaine RBD de PAK, un effecteur commun à ces deux petites GTPases. Les membranes sont ensuite mises en présence de l'anticorps anti-Rac ou de l'anticorps anti-Cdc42.

**Immunofluorescence.**

Pour la détection de l'expression de l'intégrine  $\beta 4$ , les cellules ont été décrochées à l'aide de la trypsine, lavées en milieu complet puis incubées avec l'anticorps primaire au 1/100<sup>ème</sup> pendant une heure dans la glace. Après trois lavage dans le milieu de culture, les cellules ont été incubées pendant une heure dans la glace avec l'anticorps secondaire couplé au FITC (Beckman Coulter) puis lavées à nouveau deux fois avec du milieu complet et une fois avec du PBS. L'expression des protéines a été analysée par un cytomètre en flux FACScalibur (Becton-Dickinson).

**Immunohistochimie.**

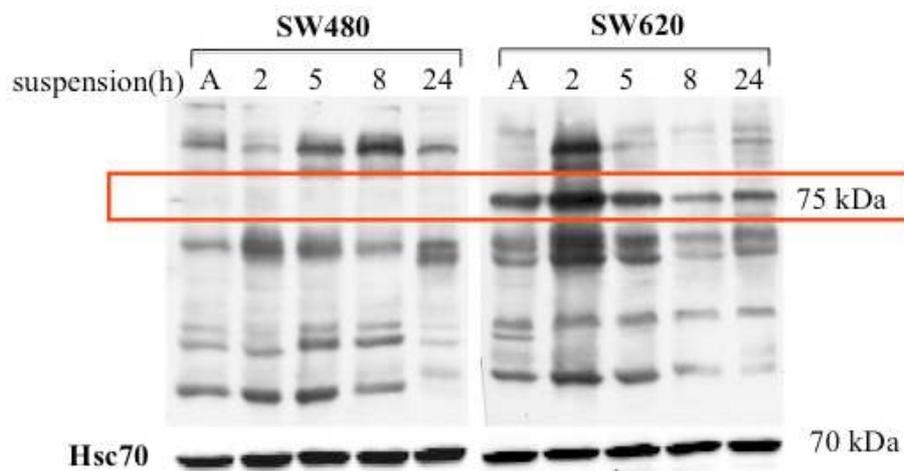
Des blocs de tissus paraffinés, issus de biopsies de patients présentant une tumeur primaire et pour certains d'entre eux des métastases, sont coupés en tranches d'environ 4 $\mu$ m d'épaisseur à l'aide d'un microtome semi-automatique Microm. Les tranches sont déposées sur des lames de microscope et fixées avec une solution aqueuse d'albumine glycinée. Après séchage, les lames sont incubées toute la journée à 60°C puis à 4°C sur la nuit. Les coupes sont ensuite déparaffinées en effectuant trois bains de 15mn dans du xylène, puis trois bains dans de l'alcool absolu de concentration décroissante et enfin une réhydratation à l'eau courante pendant 5mn. Les lames sont ensuite trempées dans une solution de démasquage (tampon de citrate de sodium et d'acide acétique à pH6) pendant 40mn à 97°C. Elles sont laissées à refroidir environ 20mn puis sont lavées avec une solution Buffer Dako Wash (BDW° pendant 10mn. Les coupes sont encadrées avec un feutre imperméable puis imbibées d'une solution d'eau oxygénée (10%) pendant 15mn afin de bloquer les peroxydases endogènes. Deux autres lavages sont ensuite effectués dans la solution BDW. Les coupes sont alors marquées avec la solution d'anticorps primaire anti-CDCP1 ou anti-p-CDCP1 sur la nuit à 4°C. Après rinçage au BDW, les lames sont incubées avec une solution d'anticorps secondaires spécifiques Labelled Polymer pendant 30mn. La coloration nucléaire est alors effectuée dans l'Hémalum de Mayer pendant 1mn. Les lames sont ensuite rincées à l'eau courante pendant 5mn et passées dans des bains d'alcool puis de toluène. Enfin, les lamelles couvre-objet sont montées à l'Eukitt. Cette expérience a été effectuée avec l'aide du Dr. Davide DEGLI au sein du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Centre hépatobiliaire de l'hôpital Paul Brousse, villejuif.



## Résultats

### Identification de CDCP1 dans notre modèle cellulaire.

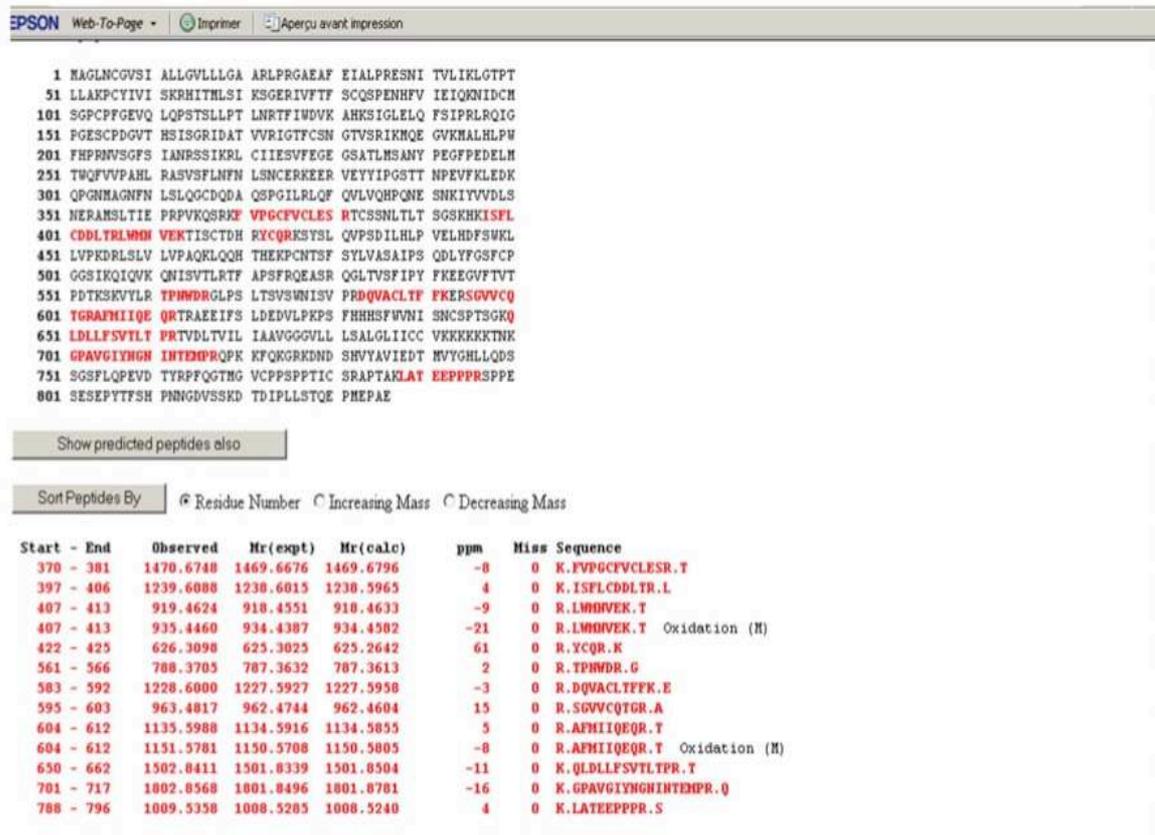
Des travaux antérieurs dans notre laboratoire montrent que l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique spécifique des kinases de la famille Src, le SU6656 pendant leur culture en suspension, sensibilise les cellules SW620 à l'anoïkis. L'étude comparative des protéines tyrosines phosphorylées dans les cellules SW480 et SW620 l'aide d'un anticorps anti-phosphotyrosine (4G10), ont mis en évidence une protéine de poids moléculaire apparent de 75 kDa spécifiquement dans les lysats de la lignée SW620 (**figure 30**).



**Figure 30 : Profil de tyrosines phosphorylations des cellules SW480 et SW620 (western blot anti-p-tyrosine) cultivées en suspension. A : cellules adhérentes ; Hsc70 : contrôle de charge**

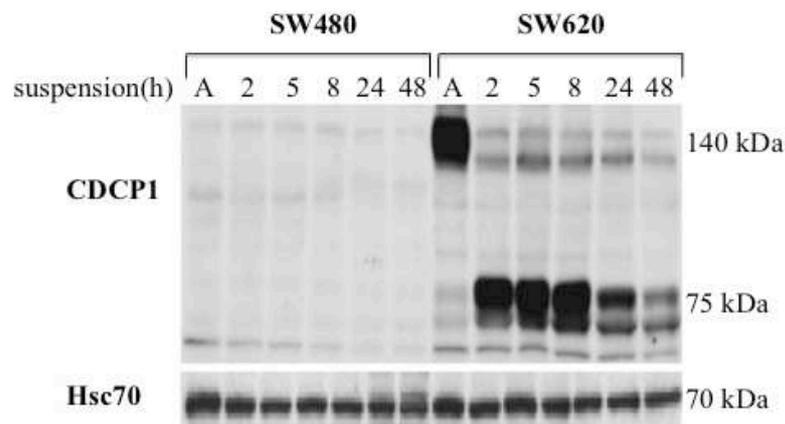
L'identification de cette bande a été réalisée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Il s'agit de la forme tronquée, c'est-à-dire déletée de sa partie N-terminale, de la protéine CDCP1 (**figure 31**). En effet, le premier peptide identifié est situé juste après les résidus R368 et K369 qui correspondent aux sites de clivage de CDCP1.

**Bande 10 : CUB-domain-containing protein 1 precursor**  
 13 peptides theoriques correspondant à 12% de la couverture de séquence



**Figure 31 : Représentation des peptides de CDCP1 identifiés par spectrométrie de masse.**

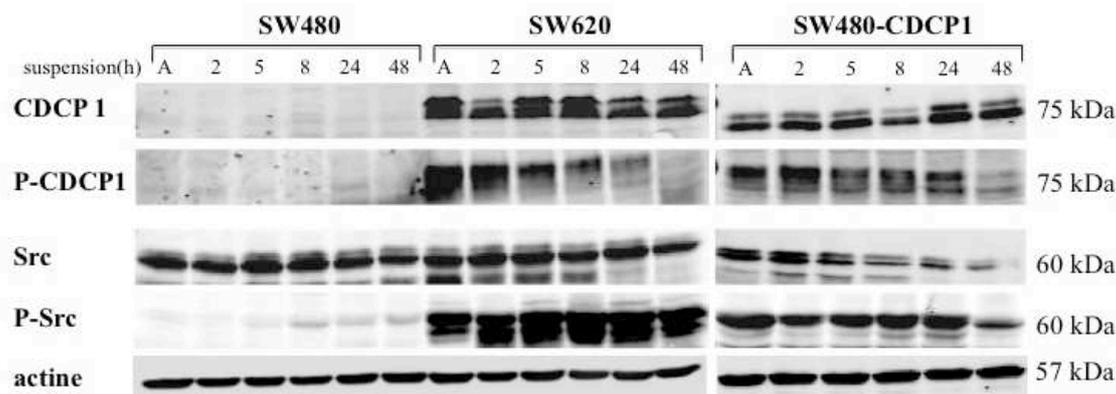
A l'aide d'un anticorps anti-CDCP1, il a été montré que cette protéine n'était exprimée que dans les cellules SW620 (**figure 32**). Les cellules adhérentes, qui ont été grattées, expriment la forme native de CDCP1 à 140kD tandis que celle qui sont cultivées en suspension expriment la forme clivée à 75kD, ce qui montre que la dispase est capable de cliver CDCP1 aux mêmes sites que les autres protéases. Dans la mesure où CDCP1 a été décrite comme protégeant des lignées d'adénocarcinome pulmonaire de l'anoïkis (Uekita et al., 2007), nous avons émis l'hypothèse qu'il pourrait en être de même dans les cellules SW620. Pour cela, une nouvelle lignée, SW480-CDCP1, exprimant de façon stable la protéine CDCP1 a été produite dans notre laboratoire.



**Figure 32 : Analyse de l'expression de CDCP1 par western blot en adhérence et en suspension à l'aide d'un anticorps anti-CDCP1.**

#### **Taux d'expression et phosphorylation de CDCP1 en adhérence et en suspension.**

Nous avons regardé la distribution de CDCP1 dans les trois lignées cellulaires : les cellules SW480, SW480-CDCP1 et SW620, à l'aide d'un anticorps dirigé de manière spécifique contre cette protéine (**Figure 33**). Dans cette expérience, les cellules adhérentes ont été détachées à la trypsine ce qui explique pourquoi elles expriment la forme clivée de CDCP1. Les cellules SW480-CDCP1 expriment CDCP1 à un taux comparable à celui des cellules SW620 et cette expression est maintenue pendant la culture en suspension. Étant donné que l'activation de CDCP1 est supposée nécessiter sa phosphorylation sur la Y-734 par les SFK, nous avons fait fabriquer un anticorps dirigé spécifiquement contre cette tyrosine phosphorylée. Celui-ci nous a permis de montrer que CDCP1 était bien phosphorylée sur Y-734 dans les cellules SW620 mais également dans les cellules SW480-CDCP1 et ce, en adhérence et en suspension. D'une manière très intéressante, à l'aide d'un anticorps dirigé contre la tyrosine activatrice de Src phosphorylée (Y-418) nous avons mis en évidence que la présence de CDCP1 dans les cellules SW480-CDCP1 entraînait une activité Src augmentée comparé aux cellules parentales. Cette observation est en accord avec des résultats publiés dans des cellules de mélanome (Liu et al., 2011) et montre donc qu'il existe une boucle d'amplification entre CDCP1 et les SFK.

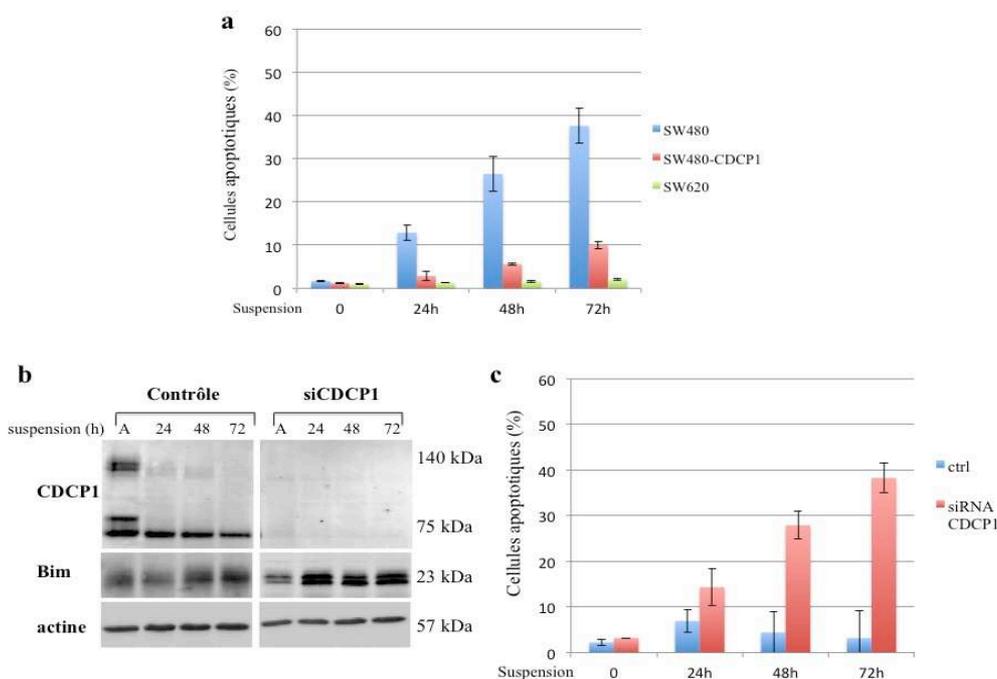


**Figure 33 : CDCP1 est exprimée et phosphorylée dans les lignées SW620 et SW480-CDCP1.**

Analyse par western blot du taux d'expression de CDCP1 et de Src ainsi que de leur taux de phosphorylation (activation) dans les cellules SW480, SW480-CDCP1 et SW620 en adhérence et en suspension. L'actine est utilisée comme un contrôle de charge.

### Les cellules SW480-CDCP1 sont résistantes à l'anoïkis.

Lorsque les trois lignées ont été cultivées en suspension, nous avons trouvé que les cellules SW480-CDCP1 étaient protégées de l'anoïkis (**figure 34a**). Afin de déterminer si cette protection était bien due à la présence de CDCP1, nous avons éteint son expression par ARN interférence. L'efficacité de cette extinction est montrée dans la **figure 34b**. L'absence de CDCP1 dans les cellules SW480-CDCP1 restaure leur sensibilité à l'anoïkis (**figure 34c**).



**Figure 34 : CDCP1 protège les cellules SW480 de l'anoïkis.** (a) Analyse du pourcentage de cellules apoptotiques dans les cellules SW480, SW480-CDCP1 et SW620 par analyse en cytométrie de flux. (b)

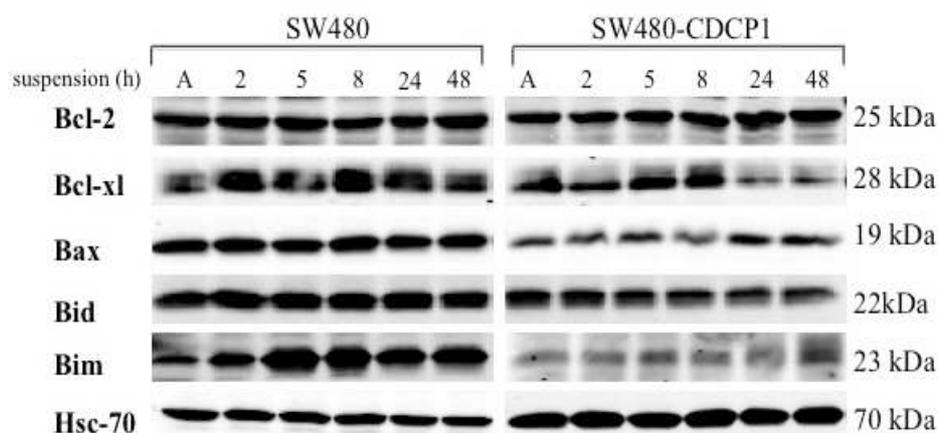
L'expression de CDCP1 et de Bim sont analysés par western blot dans les cellules SW480-CDCP1 contrôle et

transfectées par l'ARN interférence de CDCP1 (siARN CDCP1) en adhérence et au cours d'une cinétique allant jusqu'à 72h. (c) Pourcentage de cellules apoptotiques dans les cellules SW480-CDCP1 contrôle et siARN CDCP1.

L'ensemble de ces résultats semble donc indiquer que CDCP1 est capable de protéger les cellules SW480 contre l'anoïkis.

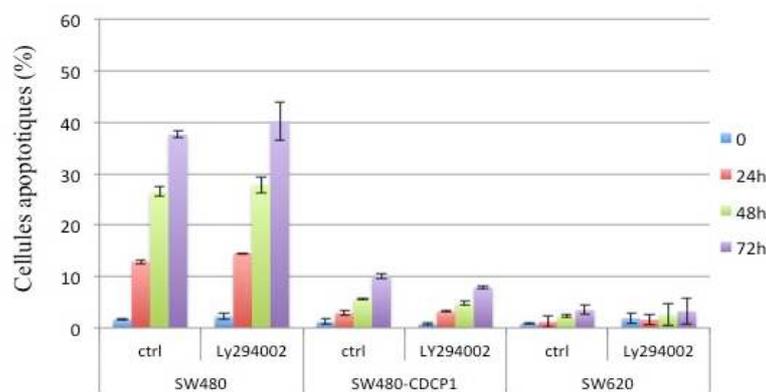
Afin de montrer qu'il en était de même dans les cellules SW620, nous avons voulu éteindre l'expression de CDCP1 dans ces cellules à l'aide du même siCDCP1 mais, pour des raisons qui nous échappent, nous n'y sommes pas parvenus malgré de nombreuses tentatives.

Afin d'essayer de mieux comprendre cette résistance, nous avons étudié le taux d'expression des divers membres de la famille Bcl-2 dans les cellules SW480-CDCP1 comparées aux cellules parentales (**figure 35**). Bcl-2 et Bid sont stables dans les deux lignées tout au long de la culture en suspension. Le taux d'expression de Bcl-xL semble diminuer en fin de cinétique dans les cellules SW480-CDCP1 mais cela ne peut expliquer leur résistance. Le taux d'expression de Bax semble globalement plus faible dans les cellules SW480-CDCP1 et ceci pourrait jouer un rôle dans leur résistance à l'anoïkis. Enfin, le taux d'expression de Bim augmente moins dans les cellules SW480-CDCP1 que dans les cellules SW480 surtout dans les temps précoces (de 2 à 24 h de culture). De manière très intéressante, nous avons trouvé que l'expression augmentée précoce (24h) de Bim était restaurée dans les cellules SW480-CDCP1 où l'expression de CDCP1 avait été éteinte par ARN interférence (**figure 34b**). Dans la mesure où ces cellules redeviennent sensibles à l'anoïkis, il semblerait donc que la présence de CDCP1 s'oppose à l'augmentation précoce de Bim dans les cellules cultivées en suspension ce qui pourrait jouer un rôle dans la résistance à l'anoïkis des cellules SW480-CDCP1.



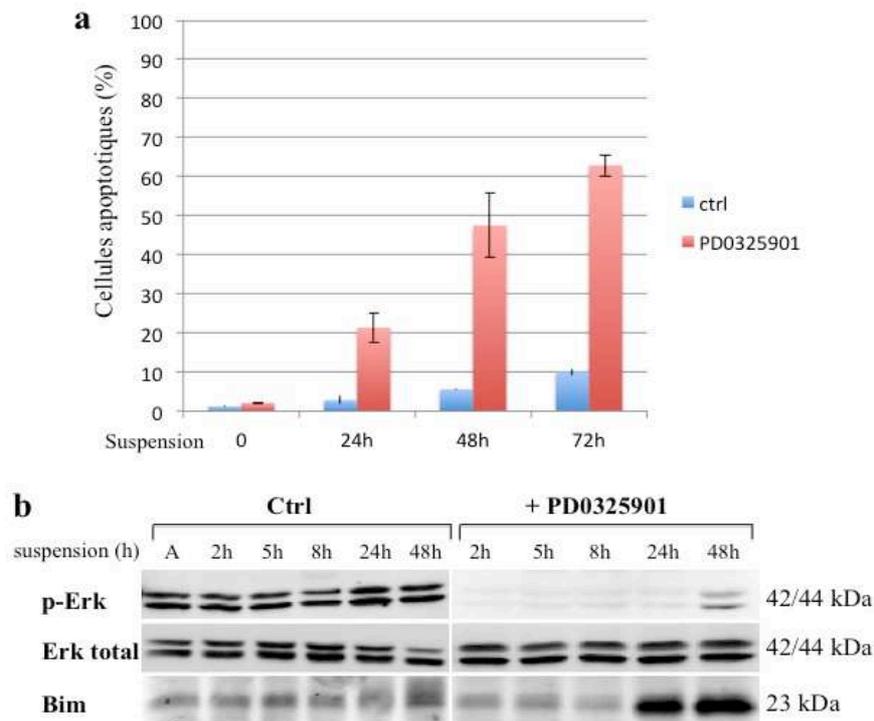
**Figure 35 : Niveau d'expression des protéines Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bid et Bim dans les cellules SW480 et SW480-CDCP1 en suspension comparé à celui en adhérence (A). Hsc-70 est utilisé comme contrôle de charge.**

L'expression de la protéine Bim est contrôlée par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels (Li et al., 2001a). Le facteur de transcription FOXO3a (forkhead box O3a) est un régulateur transcriptionnel clé de Bim et son activité est supprimée par sa phosphorylation par Akt. D'autre part, la phosphorylation médiée par la voie de Erk conduit à l'ubiquitination de Bim et à sa dégradation par le protéasome. Comme le montre la **figure 36**, le blocage de la voie PI3K/Akt ne sensibilise pas les cellules SW480-CDCP1 et SW620 à l'anoïkis. De plus, à l'aide d'un anticorps dirigé contre la tyrosine phosphorylée activatrice de Akt, nous n'avons pas pu mettre en évidence une activation de Akt dans aucune des trois lignées (non montré).



**Figure 36 : L'inhibiteur de la voie PI3K/Akt, le LY294002, ne sensibilise pas les cellules SW480-CDCP1 et SW620 à l'anoïkis.**

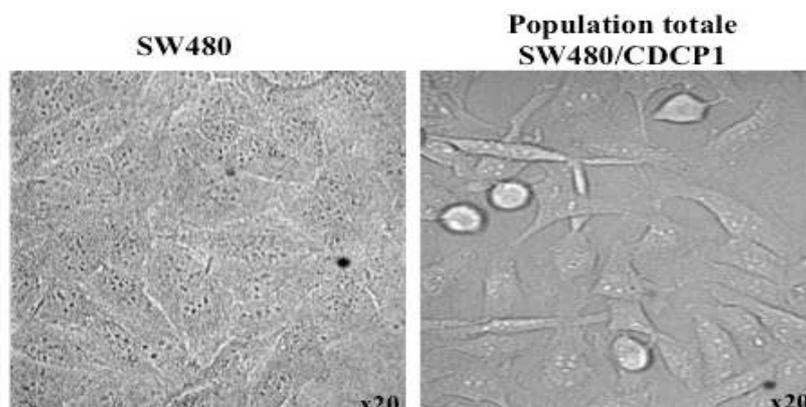
En revanche, un inhibiteur de MEK (PD0325901) a été très efficace dans la sensibilisation des cellules SW480-CDCP1 à l'anoïkis (**figure 37a**). Par western blot, nous avons montré que l'activité Erk, évaluée par la détection de p-Erk, est soutenue tout au long de la culture en suspension dans les cellules SW480-CDCP1 et que l'inhibiteur de MEK a été très efficace pour inhiber l'activité de Erk (**figure 37b**). Cette inhibition est accompagnée d'une augmentation importante de l'expression de Bim à partir de 24h dans les cellules SW480-CDCP1 (**figure 37b**). Cette expression de Bim augmentée sous l'effet de l'inhibiteur de MEK dans les cellules SW480-CDCP1 pourrait expliquer la restauration de leur sensibilité à l'anoïkis.



**Figure 37 : L'inhibition de MEK augmente l'expression de Bim et sensibilise les cellules SW480-CDCP1 à l'anoïkis.** (a) Taux d'activation de la kinase ERK et d'expression de la protéine Bim dans les cellules SW480-CDCP1 en présence ou en absence de PD0325901. (b) Effet de l'inhibiteur de MEK, PD0325901, sur la sensibilité à l'anoïkis des cellules SW480-CDCP1 cultivées en suspension.

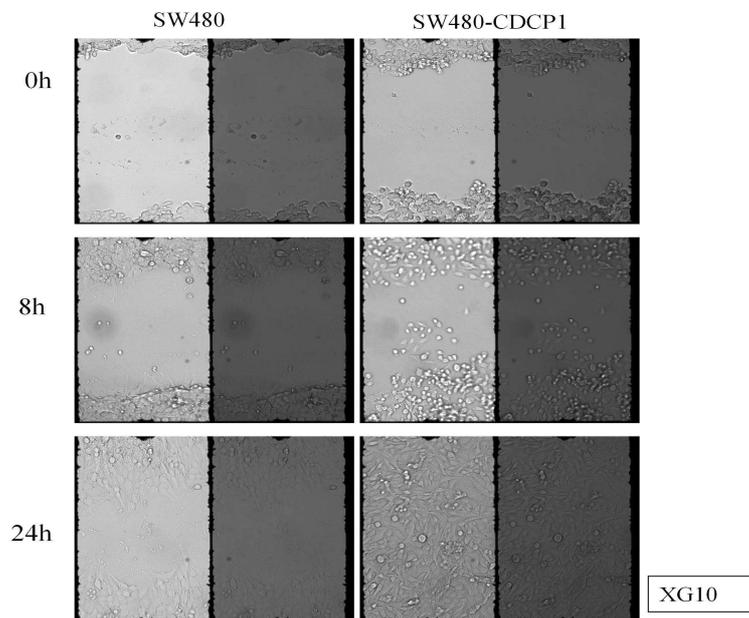
**CDCP1 entraîne des changements de morphologie et de vitesse de migration.**

Nous avons fait d'autres observations dans les cellules SW480-CDCP1. La première observation a été que cette lignée avait une morphologie différente de la lignée parentale, avec un aspect plus fibroblastique (**figure 38**).



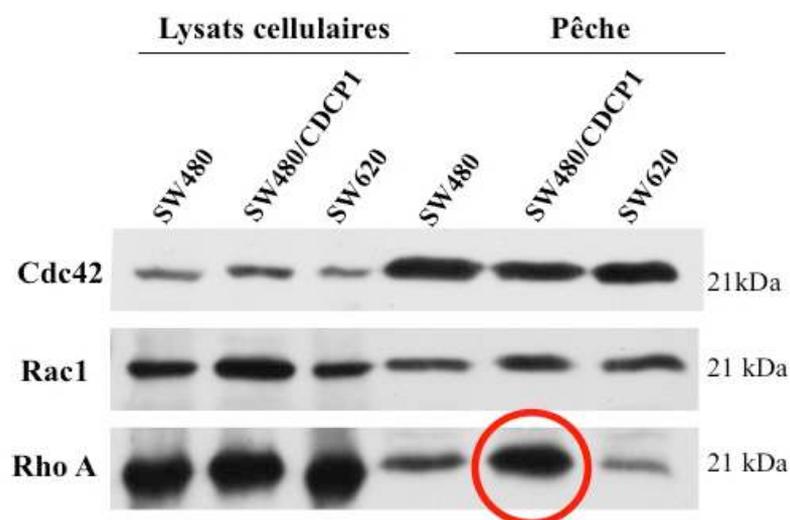
**Figure 38 : L'expression de CDCP1 dans les cellules SW480 entraîne un changement de morphologie.**

Nous avons alors testé leur vitesse de migration dans un test de blessure et trouvé qu'elles migraient deux fois plus vite (**figure 39**).



**Figure 39 : La présence de CDCP1 dans les cellules SW480 accélère leur vitesse de migration.** Test de blessure réalisé sur des cellules SW480 et SW480-CDCP1 adhérentes et à confluence.

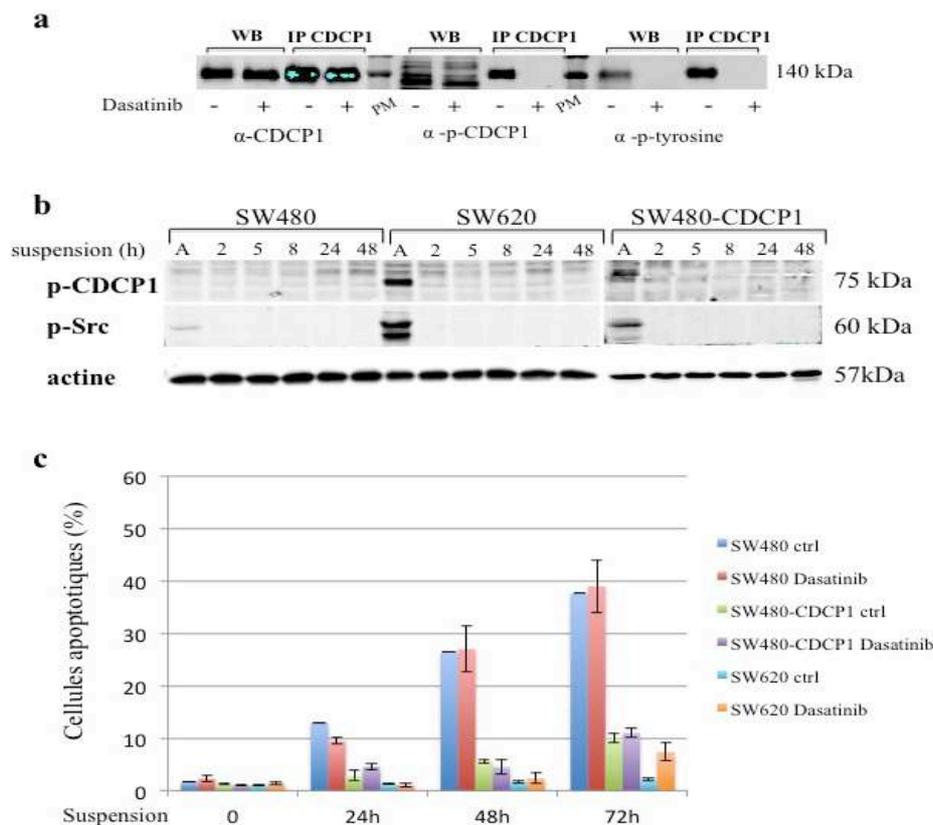
Ceci nous a amenés à tester l'état d'activation des petites protéines G de la famille Rho et comme montré sur la **figure 40** on dénote une activité Rho fortement augmentée dans les cellules SW480-CDCP1 cultivées en adhérence.



**Figure 40 : L'activité Rho est augmentée dans les cellules SW480-CDCP1.**

**Les cellules SW480-CDCP1 sont toujours résistantes à l'anoïkis malgré la déphosphorylation de CDCP1 sur la tyrosine 734.**

Dans la mesure où CDCP1 est un substrat des kinases de la famille Src, nous avons regardé si l'inhibiteur des kinases de cette famille, le dasatinib, avait un effet sur l'anoïkis des cellules SW480-CDCP1 et SW620. Nous avons réalisé une immunoprécipitation de CDCP1 après 24h d'exposition au dasatinib (250nM) dans les cellules SW620. Comme le montre la **figure 41a**, aucune phosphorylation de CDCP1 n'est détectable que ce soit avec l'anticorps anti-phospho-CDCP1 ou avec un anticorps anti-phospho-tyrosine. Ces résultats indiquent que non seulement la phosphorylation de la Y-734 mais également celle des autres tyrosines de CDCP1 est inhibée par le dasatinib. Par western blot et à l'aide des anticorps dirigés spécifiquement contre la forme phosphorylée de la tyrosine activatrice de Src, Y-418 et celle de CDCP1, Y-734, nous avons vérifié qu'en présence du dasatinib nous avons parfaitement inhibé la phosphorylation de Src et de CDCP1 dans nos cellules tout au long de la mise en suspension (**figure 41b**). Nous avons alors quantifié l'anoïkis en cytofluométrie. De manière surprenante et malgré la déphosphorylation de CDCP1 sur la Y-734, les SW480-CDCP1 et SW620 sont toujours résistantes à l'anoïkis (**figure 41c**).



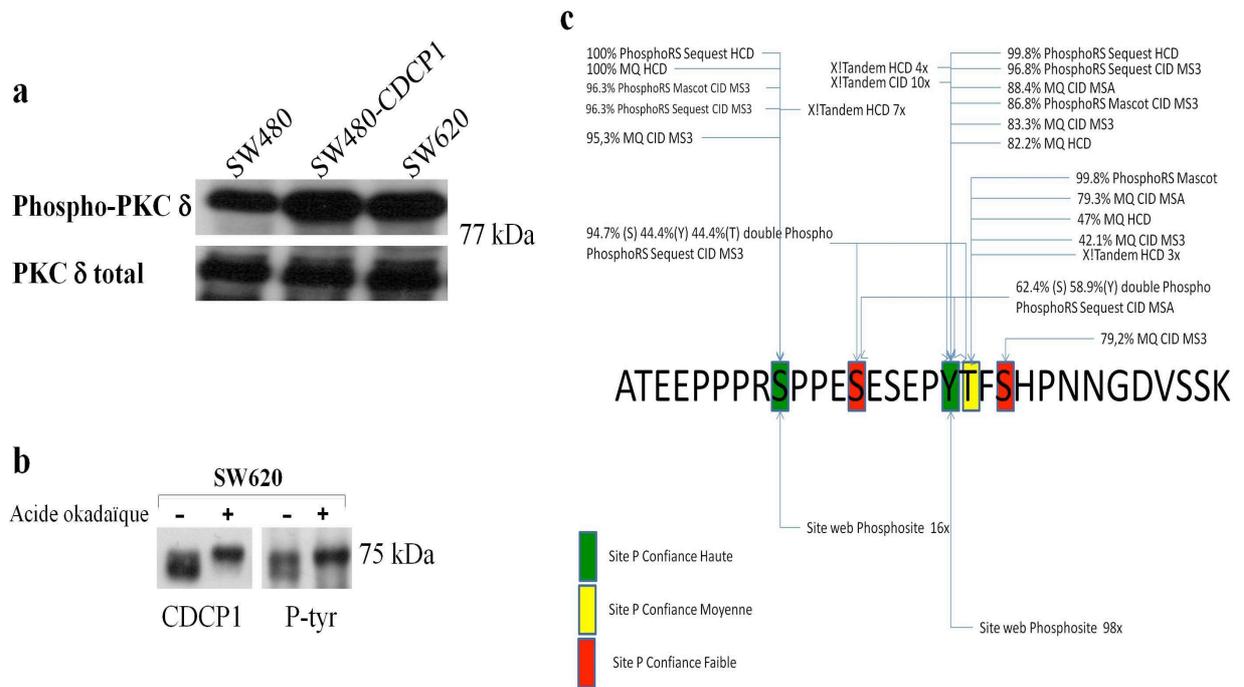
**Figure 41 : Les cellules SW480-CDCP1 et SW620 sont toujours résistantes et ce malgré la déphosphorylation de Src et de CDCP1.** (a) Immunoprécipitation anti-CDCP1 dans les cellules SW620 adhérentes en présence de dasatinib (250nM) et révélation de p-tyrosine, p-CDCP1 et CDCP1. (b) profil d'activation de Src et de CDCP1 en absence (adhérence A) ou en présence de 250 nM de dasatinib dans les

cellules SW480, SW480-CDCP1 et SW620 cultivées en suspension au cours d'une cinétique allant jusqu'à 48h.  
(c) Analyse du pourcentage de cellules apoptotiques en présence ou en absence du dasatinib dans les 3 lignées cellulaires.

Il semble donc que la phosphorylation de CDCP1 sur la Y-734 ne soit pas nécessaire à la suppression de l'anoïkis dans les cellules SW480-CDCP1 et SW620. Ces résultats semblent en contradiction avec ceux obtenus avec le SU6656 en début de l'étude. Cependant, nous avons observé que le SU6656 tuait aussi les cellules en adhérence, ce qui n'est pas le cas du dasatinib. Il pourrait donc, dans le cas du SU6656, s'agir d'une toxicité générale plutôt qu'une simple sensibilisation à l'anoïkis.

D'autre part, dans l'étude de Uekita et al il a été montré que la protection contre l'anoïkis médiée par CDCP1 dans des lignées d'adénocarcinome pulmonaire nécessitait l'activité de la PKC $\delta$  (Uekita et al., 2007). Nous avons donc éteint l'expression de cette protéine dans les cellules SW480-CDCP1 à l'aide d'un siARN spécifique. Cependant, malgré une bonne extinction, nous n'avons pas abrogé la résistance des cellules SW480-CDCP1 à l'anoïkis (non montré). Cette observation corrèle avec nos résultats avec le dasatinib dans la mesure où la phosphorylation de la Y-762 de CDCP1 est nécessaire à l'activation de la PKC $\delta$  par CDCP1. Nous avons par ailleurs vérifié que la quantité de phospho-PKC $\delta$ , c'est-à-dire de PKC $\delta$  active, est plus importante dans les cellules SW480-CDCP1 comparées aux cellules SW480. Elle atteint de fait celle des cellules SW620 (**figure 42a**).

Dans la plupart des blots, CDCP1, que ce soit sous sa forme longue ou sous sa forme courte, apparaît comme une double bande. Ceci suggère qu'une ou des phosphorylations sur sérine/thréonine entraînant un retard sur gel. De fait, en présence d'acide okadaïque, un inhibiteur de sérine phosphatases, nous n'observons plus que la bande de CDCP1 migrant le plus lentement (**figure 42b**). Comme le montre l'anticorps anti-phospho-tyr, les deux bandes sont phosphorylées sur tyrosine. Nous avons réalisé une immunoprécipitation avec l'anticorps anti-CDCP1 à partir de lysats issus des cellules SW620 cultivées en adhérence. Le produit résultant de cette immunoprécipitation a été analysé à Marseille en spectrométrie de masse dans le service de protéomique de l'UMR INSERM 1068 dirigée par le professeur Jean-Paul Borg. La séparation des peptides sur un instrument de type LTQ-Velos Orbitrap ETD (Thermo Scientific, Courtabeuf, France) suivie d'une analyse par différents logiciels (Mascot, Sequest, Maxquant, ProteinPilot, X tandem) ont été réalisées par Stéphane Audebert et Luc Camoin. On retrouve comme site de phosphorylation de confiance haute la tyrosine 806 (**figure 42c**), déjà connue pour être phosphorylée par les SFK, ce qui montre que l'analyse est correcte. De manière très intéressante, la sérine 797 a été également identifiée comme un site étant phosphorylé avec une confiance haute (**figure 42c**). Il serait important de déterminer si cette phosphorylation est due à la PKC $\delta$  activée par CDCP1.



**Figure 42 : CDCP1 est phosphorylée sur sérine.** (a) Western blot de phospho-PKC $\delta$  dans les trois lignées. (b) Analyse par western blot de la vitesse de migration de CDCP1 en présence ou non d'acide okadaïque. (c) Résultats de l'analyse par spectrométrie de masse des sites de phosphorylation sur sérine/thréonine de CDCP1.

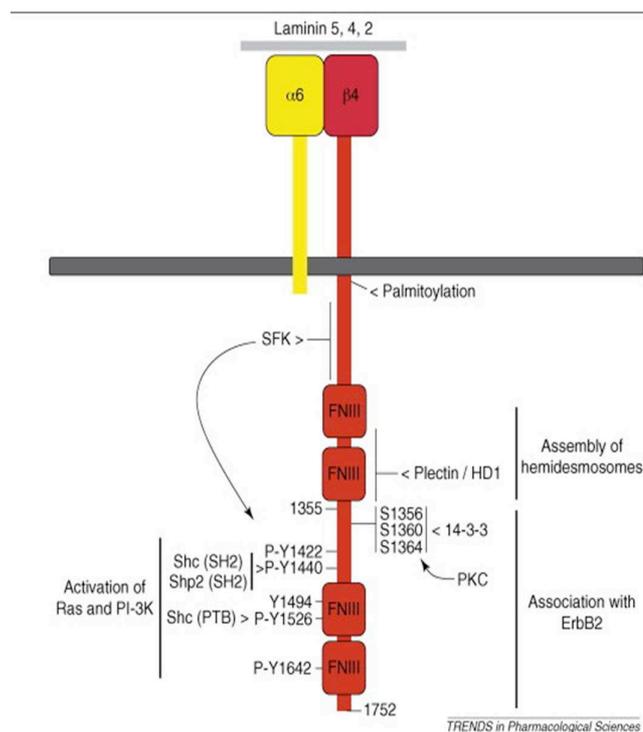
### Identification de nouveaux partenaires de CDCP1 par spectrométrie de masse.

Dans le but de découvrir de nouveaux partenaires pour la protéine CDCP1 et d'étudier la signalisation impliquée dans la résistance à l'anoïkis, nous avons réalisé d'autres immunoprécipitations de CDCP1 dans les cellules SW620 suivies d'une analyse en spectrométrie de masse dans le même service. Ceci a permis d'identifier différents partenaires de CDCP1 et les résultats sont résumés dans la **figure 43** où les protéines ont été classées en fonction de leur score.

Description	Score	Coverage	# Peptides
CUB domain containing protein 1 [Homo sapiens]	4317,37	29,55	140
CUB domain-containing protein 1 isoform 1 [Homo sapiens]	3520,43	29,55	126
tubulin, beta 2C, isoform CRA_b [Homo sapiens]	1251,29	46,45	38
tubulin beta-2A chain [Homo sapiens]	1107,09	38,20	33
tubulin beta-3 chain isoform 1 [Homo sapiens]	1005,17	26,89	26
tubulin alpha [Homo Sapiens]	724,53	34,62	26
transferin receptor [Homo Sapiens]	491,05	20,92	14
integrin beta 4 [Homo Sapiens]	421,47	6,05	11
sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 isoform d [Homo sapiens]	347,07	11,69	9
transportin/karyopherin beta 2 [Homo Sapiens]	279,19	9,98	8
tyrosine-protein kinase Fyn isoform a [Homo sapiens]	201,95	9,68	7
proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yes [Homo sapiens]	147,47	9,02	6
protein kinase C delta-type [Homo sapiens]	202,88	9,42	6
importin 7, isoform CRA_a [Homo sapiens]	136,48	3,94	4
exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs), isoform CRA_a [Homo sapiens]	93,51	4,86	3
ephrin type-A receptor 2 precursor [Homo sapiens]	96,45	2,46	2
integrin alpha 6 [Homo Sapiens]	72,47	3,64	2

**Figure 43 : Identification des différents partenaires de CDCP1.** Résultats de l'analyse par spectrométrie de masse de l'immunoprécipitation anti-CDCP1 dans les cellules SW620 en adhérence.

Le fait que les deux SFK, Fyn et Yes ainsi que la PKC $\delta$ , partenaires connus de CDCP1 aient été co-immunoprécipitées témoigne de la qualité de l'analyse. La co-immunoprécipitation non-spécifique des différents composants du cytosquelette d'actine est une composante constante des analyses en protéomique. Cependant, celle de la tubuline ne l'est pas et il est donc possible que celle-ci ait une signification dans le cas de CDCP1. Plusieurs protéines membranaires, surlignées en violet, ont été identifiées dont l'EphA2 et le couple intégrine  $\beta$ 4/intégrine  $\alpha$ 6. Parmi tous les récepteurs Eph, l'EphA2 a été étudiée extensivement vu son rôle dans la formation et la progression de nombreux cancers (Surawska et al., 2004). Une sur-expression de ce récepteur est souvent associée avec un mauvais pronostic. Cependant, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'intégrine  $\beta$ 4 (ITGB4). Cette intégrine, unique parmi les 24 intégrines connues des mammifères, est caractérisée par le fait qu'elle possède un domaine intra-cellulaire très long (1017 acides aminés) (**figure 44**).

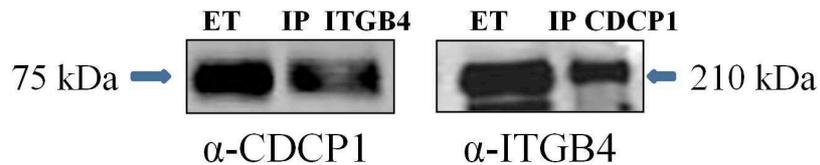


**Figure 44 : Modèle de signalisation de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$ .**

D'après Giancotti FG, Trends Pharmacol Sci., 2007.

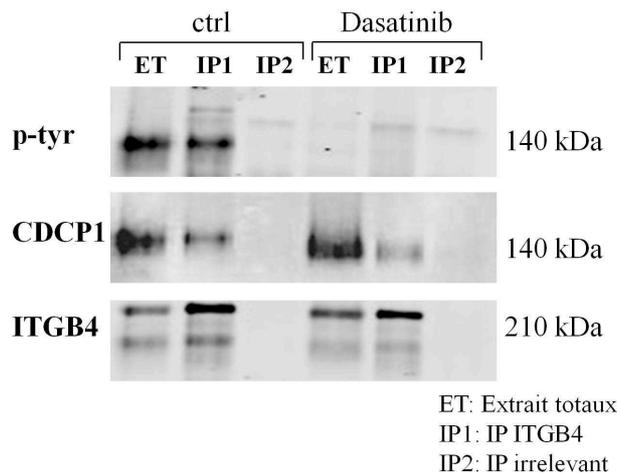
L'implication de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$ , récepteur de la laminine, dans l'organisation des hémidesmosomes est la plus étudiée mais des études récentes ont révélé de nouvelles fonctions dans la migration de cellules épithéliales tumorales dont les cancers colorectaux (Chao et al., 1996). Les voies de signalisation qui permettent à l'ITGB4 d'augmenter la migration et l'invasion ne sont pas dépendantes d'environnements matriciels spécifiques et il a été suggéré qu'elles étaient initiées par une auto-association des domaines cytoplasmiques (Mercurio et al., 2001). Enfin, l'expression de l'ITGB4 est régulée positivement dans divers types de tumeurs (Mercurio and Rabinovitz, 2001), et des études récentes ont indiqué qu'elle augmente la fonction de signalisation de multiples récepteurs oncogéniques à activité tyrosine kinase (RTK), comme ErbB2 (Guo et al., 2006), EGF-R (Mariotti et al., 2001) et Met (Giancotti, 2007). En outre, l'ITGB4 est exprimée dans les vaisseaux sanguins de la tumeur et favorise la phase invasive de l'angiogenèse tumorale (Nikolopoulos et al., 2004).

Afin de confirmer l'interaction CDCP1-ITGB4, nous avons réalisé une immunoprécipitation anti-ITGB4 ou anti-CDCP1 sur les cellules SW620 en adhésion. Comme le montre la **figure 45**, nous avons bien immunoprécipité CDCP1 avec l'anticorps anti-ITGB4 et, de manière réciproque, ITGB4 avec l'anticorps anti-CDCP1.



**Figure 45 : CDCP1 interagit avec l'ITGB4 en adhérence dans les cellules SW620 adhérentes.** Immunoprécipitation anti-CDCP1 ou anti-ITGB4 dans les cellules SW620 cultivées en adhérence et révélation ITGB4 ou CDCP1 respectivement.

Les complexes CDCP1-SFK-PKC $\delta$  sont dépendants de la phosphorylation sur tyrosine de CDCP1 par les SFKs. Nous avons voulu déterminer si l'association de l'ITGB4 à CDCP1 était, elle aussi, dépendante de cette phosphorylation. Après traitement ou non des cellules SW620 avec le dasatinib pendant 24 heures, nous avons effectué une immunoprécipitation anti-ITGB4 sur des SW620 lysées en flasques. Nous révélons l'association d'ITGB4 avec CDCP1 aussi bien en présence qu'en absence de dasatinib (**figure 46**).



**Figure 46 : CDCP1 interagit avec la protéine ITGB4 malgré une totale déphosphorylation des tyrosines en présence du dasatinib.** Immunoprécipitation anti-ITGB4 dans les cellules SW620 en adhérence en présence ou en absence du dasatinib et révélation de p-tyrosine, CDCP1 et l'ITGB4.

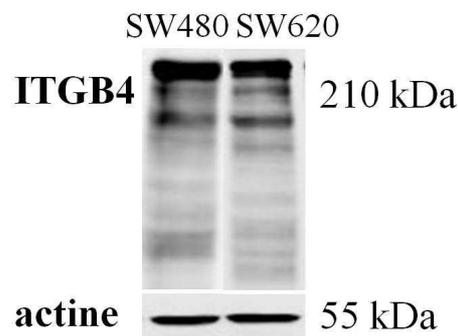
Nous avons également vérifié ce résultat en faisant l'immunoprécipitation inverse anti-CDCP1 que nous avons révélé ITGB4 (non montré). L'ensemble de ces résultats suggère que l'interaction de CDCP1 à l'ITGB4 est indépendante de la phosphorylation sur tyrosine de CDCP1.

Il est intéressant de noter, qu'en 1996, Xia et al ont découvert qu'une protéine de 80kD était phosphorylée sur tyrosine en réponse à la rupture de l'interaction entre l'intégrine  $\alpha6\beta4$  et la laminine (Xia et al, 1996). Cette protéine de 80 kD s'est ensuite révélée être la forme courte de CDCP1. Il est

probable que l'interaction physique que nous avons mise en évidence entre ITGB4 et CDCP1 favorise cette phosphorylation.

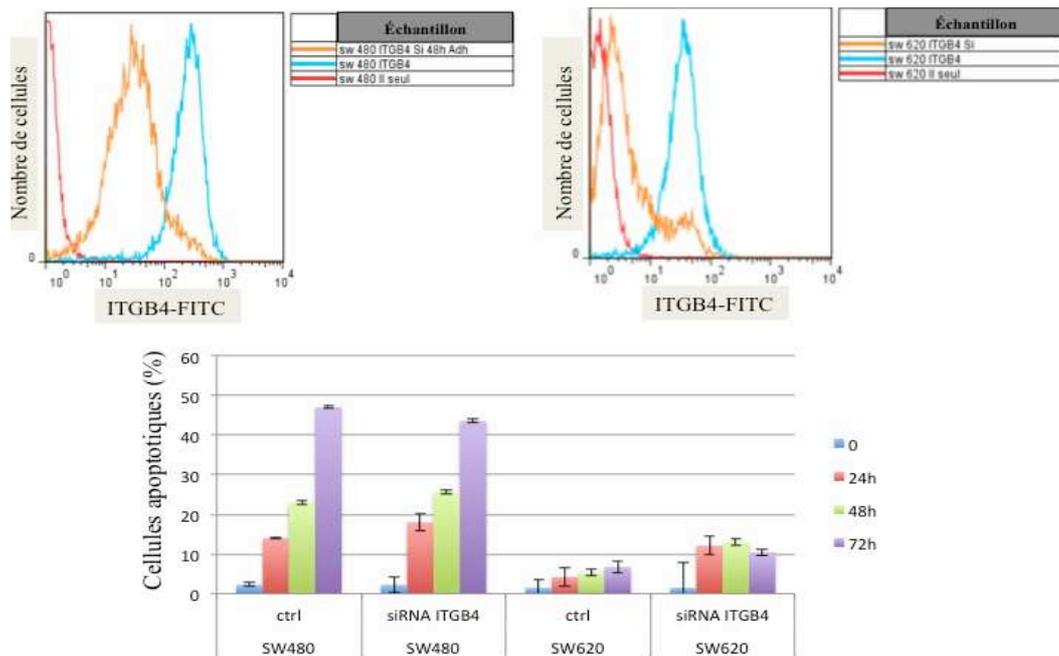
### Rôle de l'ITGB4 dans la résistance à l'anoïkis des cellules SW620.

Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'ITGB4 jouait un rôle dans la résistance des cellules SW620 à l'anoïkis. Nous avons tout d'abord regardé en western blot la distribution de l'ITGB4 dans les cellules SW480 et SW620 à l'aide d'un anticorps spécifique et trouvé que les deux lignées exprimaient cette intégrine à des taux équivalents (**figure 47**).



**Figure 47 : L'ITGB4 est exprimée dans les cellules SW480 et SW620 adhérentes à des taux comparables.**

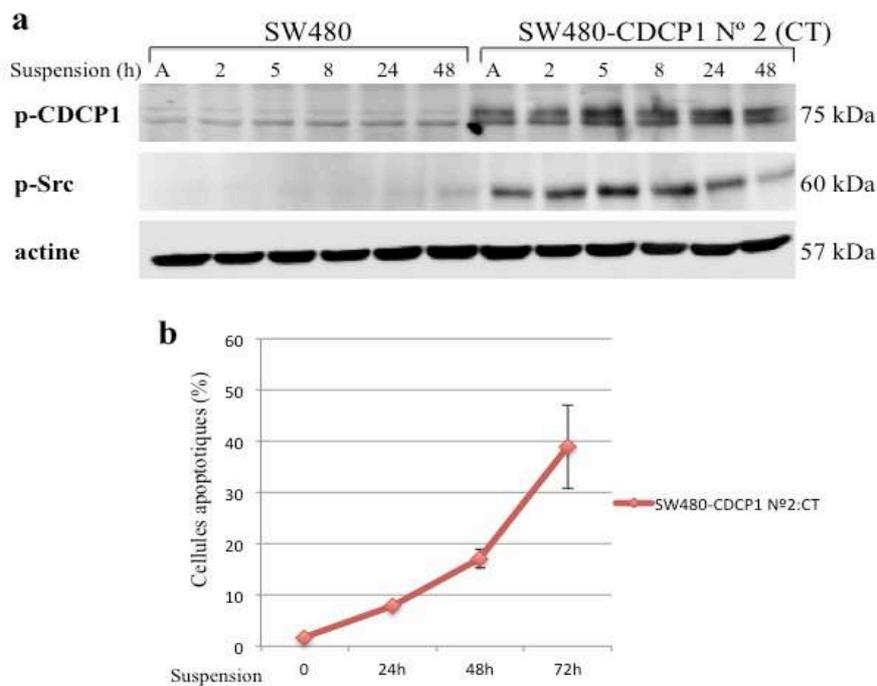
Afin d'étudier le rôle de l'ITGB4 dans la résistance à l'anoïkis de nos cellules, nous avons donc éteint son expression dans les cellules SW480 et SW620 à l'aide de la technique d'ARN interférence. Nous avons dans un premier temps vérifié par cytofluorométrie si nous avons bien éteint l'expression de l'ITGB4. Comme le montre la **figure 48a** cette extinction est modérée dans les cellules SW480 mais assez efficace dans les cellules SW620. Cependant, le siRNA ITGB4 reste sans effet sur la mort cellulaire aussi bien dans les cellules SW620 que dans les cellules SW480 (**figure 48b**). Il semble donc que l'association CDCP1-ITGB4 dans les cellules SW620 ne contribue pas à la résistance de ces dernières à l'anoïkis.



**Figure 48 : La diminution de l'expression de l'intégrine  $\beta 4$  n'a aucun effet sur la résistance des cellules à l'anoïkis.** (a) Analyse de l'expression de l'ITGB4 après transfection du siARN ITGB4 dans les cellules SW480 et SW620 par immunofluorescence. (b) Quantification du pourcentage de cellules apoptotiques dans les cellules contrôle et les cellules siARN ITGB4.

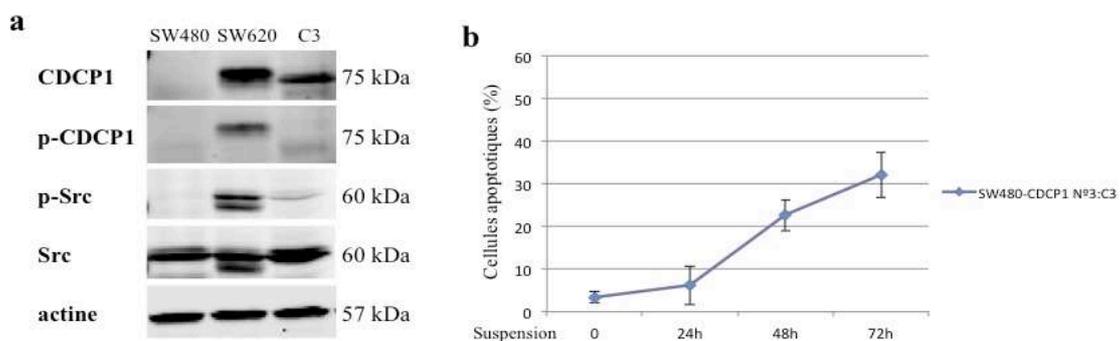
### Obtention de nouvelles lignées SW480 exprimant CDCP1

Avant de poursuivre ces travaux, nous avons voulu obtenir de nouvelles lignées SW480 exprimant CDCP1 pour confirmer les résultats obtenus dans la lignée SW480-CDCP1. Nous avons donc réalisé deux transfections successives avec le même vecteur d'expression de CDCP1. Les cellules SW480 exprimant CDCP1 ont ensuite été isolées sur un trieur de cellules. Comme le montre la **figure 49a**, la première lignée obtenue (CT) exprime correctement la forme phosphorylée de CDCP1 tout au long de la culture en suspension et montre une activité src accrue comme c'était le cas pour les cellules SW480-CDCP1. Cependant, les cellules CT restent sensibles à l'anoïkis (**figure 49b**).



**Figure 49 : Les cellules CT sont sensibles à l'anoïkis malgré une activation de Src et de CDCP1 maintenue tout au long de la cinétique.** (a) taux d'activation de CDCP1 et de Src dans les cellules SW480-CDCP1 N°2 : CT comparé aux cellules parentales SW480 en adhérence et en suspension. (b) Analyse de l'expression de CDCP1 sur la sensibilité des cellules SW480 à l'anoïkis. Les protéines sont normalisées par l'actine.

La deuxième transfection, en suivant la même méthodologie, a conduit à l'obtention de la lignée C3. Cette lignée exprime CDCP1 correctement (**figure 50a**) mais celui-ci n'est pas phosphorylé sur la tyrosine 734. De plus, l'activité src n'est pas augmentée dans ce transfectant. Enfin, tout comme les cellules CT, la lignée C3 reste sensible à l'anoïkis (**figure 50b**). Il faut également noter que, contrairement à la lignée SW480-CDCP1, la morphologie des cellules CT et C3 est semblable à celle de la lignée parentale et que leur vitesse de migration n'est pas augmentée (non montré).



**Figure 50 : La transfection de CDCP1 est sans effet quant à l'activation de Src et la sensibilité des cellules SW480-CDCP1 N°3:C3 à l'anoïkis.** (a) Analyse par western blot du taux d'activation de Src

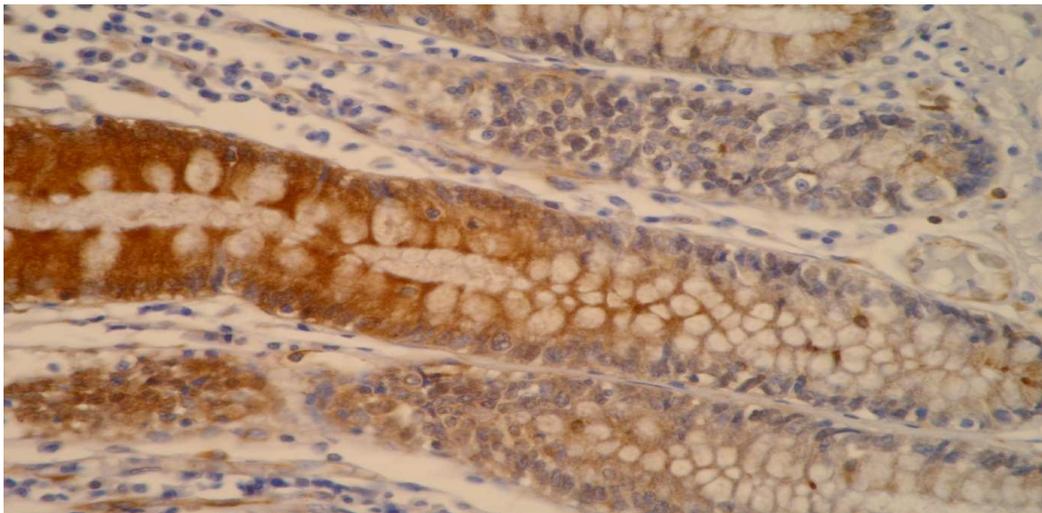
et de CDCP1 dans les cellules SW480, SW620 et C3. (b) Analyse du pourcentage de cellules apoptotiques. L'actine est utilisée comme contrôle de charge.

Nous n'avons pour le moment aucune explication pour ces résultats, mais ils nous ont conduits à ré-orienter notre travail dans une autre direction (ABT-737) à cause de l'incertitude qu'ils représentaient.

### **Expression de CDCP1 dans différentes tumeurs coliques.**

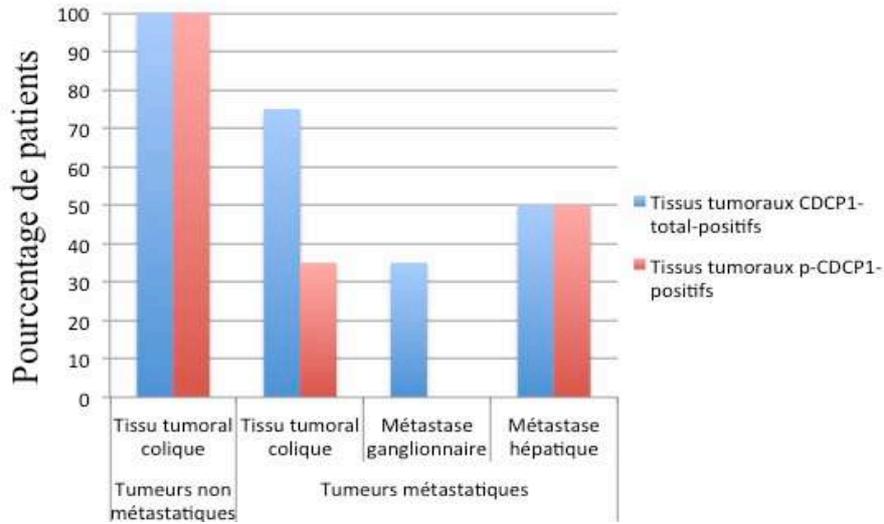
L'étude a été réalisée sur une cohorte de 16 patients atteints d'une tumeur colique. Chez 12 de ces patients la tumeur était métastatique au niveau des ganglions (8 patients), du foie (3 patients) ou des deux (1 patient). Les tissus tumoraux primaires, les tissus sains adjacents ainsi que les métastases ont été analysés.

Il avait été décrit que CDCP1 pouvait être présent dans les tissus coliques sains et nous avons confirmé cette observation. De fait, CDCP1 est exprimée à l'apex des villosités, c'est-à-dire dans les cellules prêtes à se desquamer, avec une localisation cytoplasmique (**figure 51**) et ce dans 60% des cas. Cependant elle est majoritairement non phosphorylée (20% de positivité avec l'anti-p-CDCP1).



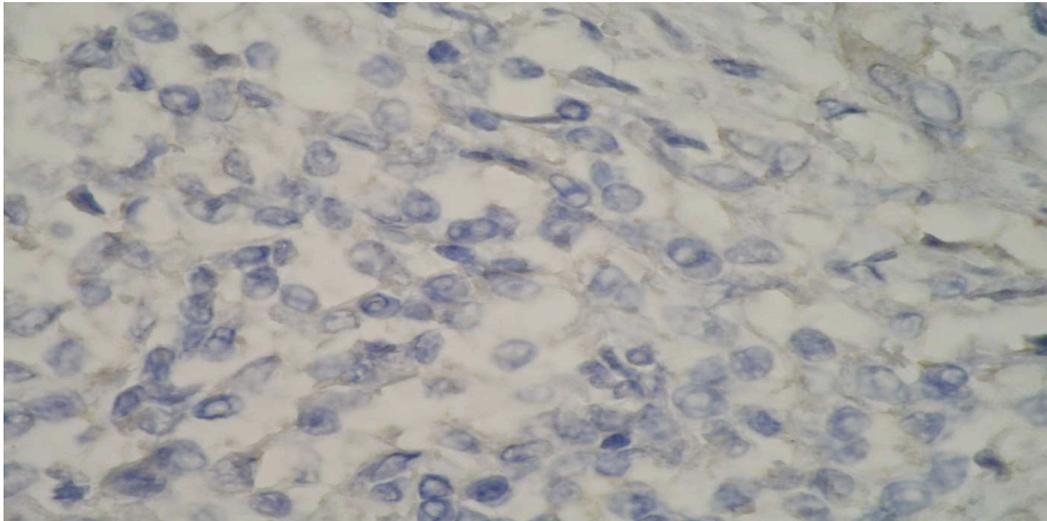
**Figure 51 : Marquage positif de CDCP1 dans un tissu colique sain (grossissement 400X).**

La **figure 52** résume les résultats obtenus sur l'ensemble des patients en ce qui concerne la positivité des tumeurs primaires et des métastases. On peut voir que CDCP1 est présente et phosphorylée dans les 4 tumeurs primaires non-métastatiques. Elle est également exprimée dans 75% des tumeurs primaires métastatiques mais, de manière surprenante, n'est phosphorylée que dans 30% d'entre elles. On retrouve CDCP1 dans 3 sur 9 des métastases ganglionnaires et elle n'est jamais phosphorylée. Enfin, elle est présente et phosphorylée dans 2 sur 4 des métastases hépatiques.

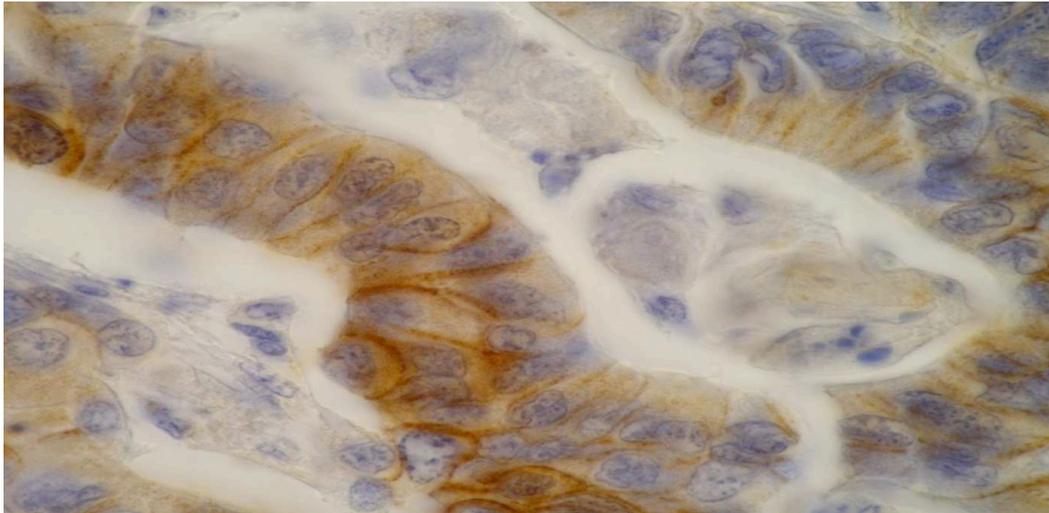


**Figure 52 : Pourcentage de tumeurs primaires, de métastases ganglionnaires ou hépatiques exprimant CDCP1 ou p-CDCP1.**

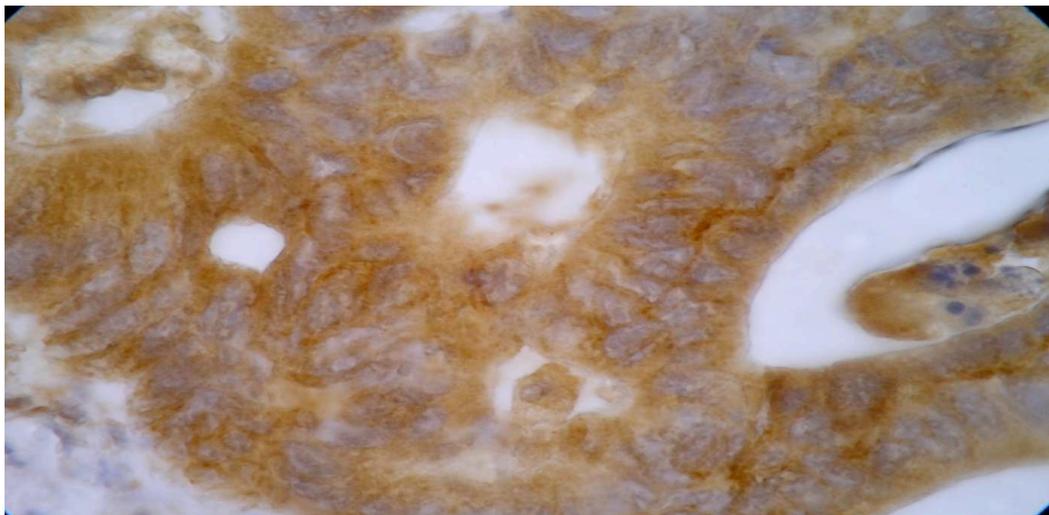
Les figures suivantes illustrent les images que nous avons obtenues :



**Figure 53 : Marquage négatif de CDCP1 dans un tissu colique tumoral (grossissement 1000X).**



**Figure 54 : Marquage à dominance membranaire de CDCP1 dans un tissu tumoral colique (grossissement 1000X).**



**Figure 55 : Marquage à dominance cytoplasmique de CDCP1 dans un tissu tumoral colique (grossissement 1000X).**

Chacun des deux types de marquage (membranaire ou cytoplasmique) est retrouvé dans environ la moitié des cas et nous n'avons pas trouvé de différence entre les tumeurs métastatiques ou non.

---

# **DISCUSSION GÉNÉRALE**

---



## **Partie 1 : Sensibilité à l'ABT-737 de cellules de cancer du côlon.**

La résistance à l'anoïkis est une caractéristique des cellules tumorales et une étape critique lors de la transformation métastatique (Geiger and Peeper, 2009; Grossmann, 2002; Simpson et al., 2008). Les cellules tumorales qui acquièrent cette résistance peuvent survivre après leur détachement de la tumeur primaire et pendant leur transit dans le système vasculaire jusqu'à leur site de colonisation.

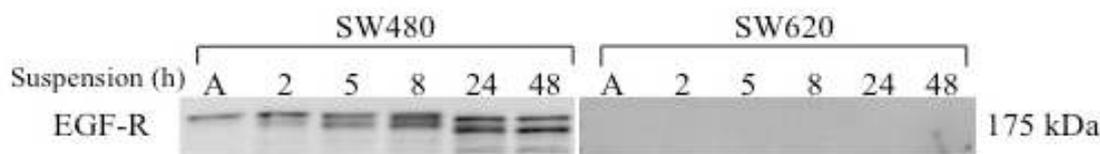
La TEM est un processus au cours duquel un groupe de cellules épithéliales perdent l'adhérence cellule-cellule notamment par la diminution de l'expression des cadhérines et acquièrent la capacité à adhérer à la MEC (notamment par l'expression des intégrines). La dégradation de la MEC s'effectue grâce à la sécrétion de métalloprotéases et s'accompagne d'une perte de marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine ou la cytokératine et une acquisition de protéines mésenchymateuses (N-cadhérine, vimentine, fibronectine). La TEM dans le cancer est perçue comme jouant un rôle important dans la progression tumorale (Kalluri and Weinberg, 2009) et il existe une corrélation importante entre la TEM et la résistance à l'anoïkis (Frisch et al., 2013). Ainsi, le blocage de la N-cadhérine sensibilise des cellules de mélanome à l'anoïkis (Li et al., 2001a) tandis que la déplétion en E-cadhérine protège des cellules mammaires de l'anoïkis (Onder et al., 2008). Cependant, l'étude des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux dans les lignées SW480 et SW620 a infirmé la notion selon laquelle les cellules SW620 seraient de nature mésenchymateuse puisqu'elles n'expriment pas la N-cadhérine et la fibronectine. Il reste possible que ces cellules aient subi une TEM pour se détacher de la tumeur primaire, envahir les tissus environnants, et finalement coloniser des sites distants, puis sont parvenues à obtenir à nouveau des caractéristiques similaires à des cellules épithéliales au cours du développement de la métastase par une transition mésenchymo-épithéliale (TME). De manière très intéressante, l'examen de coupes de cancers colorectaux et de leurs métastases montre un phénotype de dé-différentiation avec perte de la E-cadhérine sur le front invasif de la tumeur primaire et une ré-expression de la E-cadhérine dans des métastases hépatiques (Brabletz et al., 2001). Il existerait donc à l'intérieur d'une même tumeur une plasticité phénotypique qui permet à certaines métastases de réacquérir des propriétés épithéliales.

Bien que de nombreux travaux décrivent l'anoïkis comme étant un type d'apoptose intrinsèque, c'est à dire débutant à la mitochondrie (Gilmore et al., 2000; Puthalakath et al., 2001), certaines études mettent en évidence que l'activation des récepteurs de mort tels que TNF-R1, le récepteur Fas ou encore le récepteur DR5 de TRAIL comme un événement initiateur de la signalisation apoptotique dans l'anoïkis (Laguinje et al., 2008). Selon les modèles cellulaires étudiés, l'activation des récepteurs de mort est décrite soit comme dépendante de la présence du ligand (Aoudjit and Vuori, 2001; Rosen et al., 2002) soit comme faisant suite à l'agrégation spontanée de ces récepteurs (Frisch, 1999;

Rytomaa et al., 1999). L'initiation de la résistance à l'anoïkis via les récepteurs de mort implique souvent un défaut de formation du DISC lié à une altération de l'activation de la caspase-8 (Bozzo et al., 2006) ou à une surexpression de la protéine FLIP (Mawji et al., 2007).

Nous avons établi par l'étude de la sensibilité à l'anoïkis de clones surexprimant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 ou une forme dominant négatif de la protéine FADD, que l'anoïkis dans les cellules SW480 était initiée au niveau de la mitochondrie. Elle est donc sous le contrôle des protéines de la famille Bcl-2. Nous avons montré que les taux d'expression des membres anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL et du membre pro-apoptotique Bax sont équivalents dans les cellules SW480 et SW620 et qu'au cours de la mise en suspension des cellules leur niveau d'expression reste inchangé. Il est intéressant de préciser que la dégradation de Mcl-1 lors du détachement est un facteur déterminant pour l'initiation de l'anoïkis dans divers modèles cellulaires, comme par exemple les cellules fibroblastiques NIH 3T3 (Woods et al., 2007). Comparée à celles des membres de la famille Bcl-2, la demi-vie de Mcl-1 est courte (40mn) et est régulée par la voie du protéasome d'une manière dépendante de la kinase GSK-3 $\beta$  (Maurer et al., 2006) et de l'ubiquitine ligase Mule (Zhong et al., 2005). Cependant, le taux d'expression de Mcl-1 est élevé et stable dans les SW480 tandis qu'il est faible et souvent inconstant dans les cellules SW620. Il semble donc que la dégradation de Mcl-1 ne soit pas nécessaire à la mort par anoïkis des cellules SW480. Nous avons de plus remarqué que le taux d'expression de Bid était stable mais diminué dans les cellules SW620 comparées aux cellules SW480. Or, Valentijn et al. ont montré d'une manière assez surprenante que Bid est nécessaire pour l'anoïkis et n'a pas besoin d'être clivée par la caspase-8 pour jouer son rôle pro-apoptotique. Ainsi, la forme native de Bid en transloquant à la mitochondrie lors du détachement et initierait alors une forme bien particulière de la voie intrinsèque de l'apoptose (Valentijn and Gilmore, 2004). Nous n'avons pas exploré la possibilité que Bid puisse jouer un rôle dans l'anoïkis des cellules SW480 pour deux raisons principales : les travaux de Valentijn et al., n'ont jamais été confirmés par d'autres études et d'autre part, dans notre système utilisant les cellules SW620, il ne s'agit que d'une diminution de l'expression de Bid et non d'un manque total de Bid.

Parmi les autres protéines de la famille Bcl-2 que nous avons testées, seule la protéine pro-apoptotique Bim est fortement augmentée dans les cellules SW480 tandis qu'elle n'est que légèrement augmentée dans les cellules SW620. Reginato et al. ont identifié la protéine pro-apoptotique Bim comme étant un médiateur critique de l'anoïkis dans des cellules épithéliales mammaires (Reginato et al., 2003). Dans ce contexte, l'expression augmentée de Bim induite par le détachement nécessite le désengagement de l'intégrine- $\beta$ 1 et une perte d'expression du récepteur EGF-R. Nous n'avons pas trouvé de diminution d'expression de l'EGF-R dans les cellules SW480 en suspension mais plutôt une légère augmentation (**figure 56**).



**Figure 56 : Analyse par western blot du taux d'expression de l'EGF-R dans les cellules SW480 et SW620 cultivées en adhérence (A) et en suspension.**

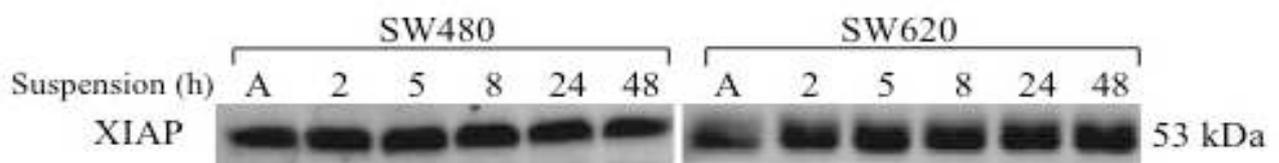
Nous avons également observé que les cellules SW620 n'expriment pas l'EGF-R, en accord avec des résultats déjà publiés (Balin-Gauthier et al., 2006). Cependant, l'inhibition de l'expression de Bim a confirmé son implication dans la mort des cellules SW480 par anoïkis. Toutefois, le pourcentage des cellules apoptotiques traitées avec le siARN Bim a diminué de moitié, ce qui indique qu'il existe d'autres voies responsables de la mort des cellules restantes. La protéine à BH3 seul, Bmf, a été identifiée comme étant impliquée dans le processus de l'anoïkis. De fait, il a été montré dans un modèle de cellules épithéliales intestinales humaines (Hausmann et al., 2011) et dans les cellules mammaires (Schmelzle et al., 2007), que l'extinction de l'expression de Bmf par ARN interférence est suffisant pour prévenir l'anoïkis. Bmf, dans les cellules normales, est complexée au cytosquelette d'actine via la chaîne légère de la dynéine 2 (DLC2). Les signaux activés suite au détachement des cellules permettent la libération de Bmf de l'actine et sa relocalisation à la mitochondrie (Puthalakath et al., 2001). Cependant, nous n'avons pas pu détecter Bmf par western blot dans aucune des deux lignées cellulaires. Il semble donc qu'une autre protéine à BH-3 seul, qui ne serait ni Bim ni Bmf, puisse être impliquée dans la mort en suspension de la fraction des cellules SW480-Bim indépendantes.

Le taux d'expression de Bim est régulé à deux niveaux : transcriptionnel via le facteur de transcription Foxo3 et post-traductionnel. Nos résultats indiquant que la première voie n'est pas impliquée dans la régulation du taux de Bim en suspension sont en accord avec les travaux de Wang et al. qui montrent que l'anoïkis ne nécessite pas de synthèse protéique (Wang et al., 2003). En revanche, l'inhibiteur de MEK, le PD0325901, sensibilise fortement les cellules SW480 et SW620 à l'anoïkis et entraîne une augmentation de l'expression de Bim dans les deux lignées. Donc cette inhibition de la voie Erk, en diminuant la dégradation de Bim par le protéasome, conduit à une augmentation de son expression qui suffit pour sensibiliser les cellules SW620 à l'anoïkis. On peut donc en conclure que c'est bien un taux de Bim insuffisant qui protège ces cellules en suspension. Cependant, nous avons trouvé paradoxalement une activité Erk plus élevée dans les cellules SW480 en suspension que dans les cellules SW620. Nous n'avons donc pas observé la corrélation inverse entre activité Erk et taux d'expression de Bim à laquelle nous nous serions attendus dans ces cellules contrôle. En revanche,

cette corrélation inverse existe lorsque les cellules sont traitées avec l'inhibiteur de MEK. De plus, dans les cellules SW480 traitées avec le PD325901, Bim change de mobilité électrophorétique indiquant sa déphosphorylation. Ainsi, la forte activité Erk retrouvée dans les cellules SW480 contrôle limite l'augmentation de Bim dans ces cellules et leur confère une sensibilité à l'anoïkis qui reste modérée. En revanche, Erk n'est que peu phosphorylée et donc peu activée dans les points précoces de culture en suspension des cellules SW620 et cependant l'expression de Bim n'augmente pas. Ces résultats suggèrent que, dans ces cellules, il existe sans doute des voies alternatives capables de réguler la demi-vie de Bim, autres que sa phosphorylation par Erk.

Il a été décrit que dans les cellules normales, Bim peut être associée aux microtubules par l'intermédiaire de la chaîne légère de la dynéine DLC1 (Day et al., 2004). Nous avons donc voulu déterminer si, en dehors de son taux d'expression, il y avait des différences dans la localisation de Bim entre les cellules SW480 et SW620. Dans la mesure où les microtubules se dépolymérisent en quelques minutes à température ambiante ou à 4°C, il est impossible de les séparer par centrifugation comme on peut le faire pour le cytosquelette d'actine. La tubuline monomérique et les protéines associées se retrouvent alors dans le cytosol. Lorsque nous avons comparé la fraction cytosolique et la fraction membrane/mitochondrie des cellules en adhérence et en suspension, nous avons trouvé que Bim se relocalisait dans la fraction mitochondriale des cellules détachées de façon nettement plus efficace dans la lignée SW480 comparée à la lignée SW620. Donc, en dehors du taux d'expression global, il est possible qu'une meilleure relocalisation de Bim à la mitochondrie dans les cellules détachées contribue à la différence de sensibilité à l'anoïkis des deux lignées. Il faut cependant remarquer que nous avons retrouvé relativement peu de Bim dans la fraction cytosolique que ce soit en adhérence ou en suspension. De fait, la liaison de Bim à DLC1 varie de façon substantielle selon le type cellulaire (Ley et al., 2005).

Enfin, il a été décrit que le détachement de cellules intestinales épithéliales conduisait à une synthèse accrue de XIAP via l'activation de NF-κB (Liu et al., 2006). Afin de déterminer si cet autre inhibiteur de l'apoptose, indépendant de la famille Bcl-2, pouvait jouer un rôle dans la résistance des cellules SW620 à l'anoïkis, nous avons étudié son expression dans les deux lignées en adhérence et en suspension (**figure 57**). Aucune différence n'a été observée.



**Figure 57 : Analyse par western blot du taux d'expression de XIAP dans les cellules SW480 et SW620 cultivées en adhérence (A) et en suspension.**

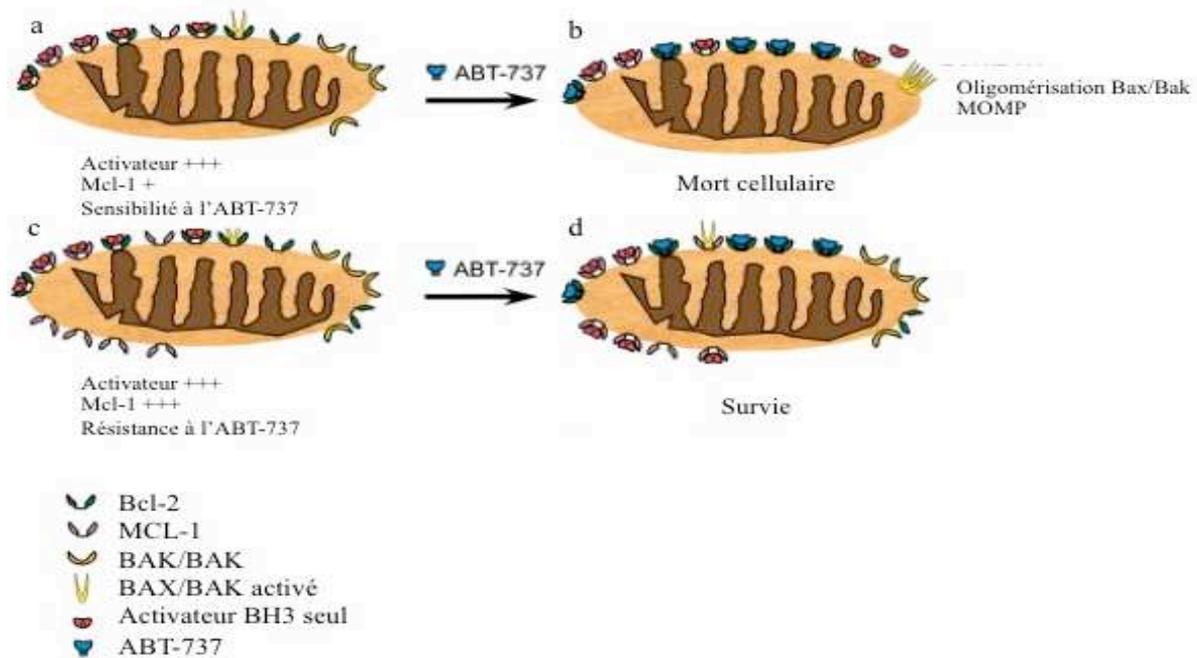
Nous concluons donc de cette partie du travail que c'est bien une augmentation insuffisante du taux d'expression de Bim dans les cellules en suspension qui est responsable de l'insensibilité des cellules SW620 à l'anoïkis.

En dehors de l'anoïkis, l'expression de la protéine Bim peut être augmentée par différents agents, en particulier certaines molécules utilisées en chimiothérapie. Différentes études ont montré dans ce cas une synergie entre Bim et l'ABT-737 et/ou l'ABT-263 (navitoclax). Ainsi, Cragg et ses collaborateurs ont mis en évidence, dans les lignées de carcinome pulmonaire non à petites cellules (NSCLC), que l'augmentation de l'expression de Bim est essentielle à la mort des cellules tumorales suite à un traitement par un inhibiteur de l'EGF-R, le gefitinib. De plus, ils ont montré que le gefitinib et l'ABT-737 agissent en synergie sur ces cellules (Cragg et al., 2007). Une autre étude sur un panel de lignées de mélanome murin montre que la combinaison cisplatine, vinblastine, dacarbazine (CVD) augmente l'expression de Bim et induit une mort modérée des cellules. L'addition d'ABT-737 au CVD promeut de manière très importante l'apoptose de ces cellules de mélanome alors que l'ABT-737 seul est sans effet (Anvekar et al., 2012). L'erlotinib, un autre inhibiteur de l'EGF-R, dans un modèle de xéno greffe de la lignée NCI-H1650 (NSCLC), résulte en une stabilisation des tumeurs sur une période de 21 jours dans 48% des cas tandis que le navitoclax n'a aucun effet. La combinaison erlotinib-navitoclax conduit à une régression tumorale durable dans 100% des souris (Chen et al., 2011).

Étant donné que les cellules SW480 cultivées en suspension présentent une expression de Bim augmentée au cours du temps, nous nous sommes donc demandé si une telle synergie avec l'ABT-737 pouvait exister dans ces cellules. Nous avons trouvé que les cellules SW480 meurent plus efficacement par anoïkis en présence de l'ABT-737. Cependant, de manière inattendue, nous avons trouvé que l'ABT-737 sensibilisait aussi les cellules SW620 à l'anoïkis malgré une faible augmentation de Bim. En revanche, les cellules SW480 et SW620 cultivées en adhérence ne sont pas sensibles à l'ABT-737.

Plusieurs études ont été entreprises pour déterminer les mécanismes d'action de l'ABT-737. Dans l'une d'entre elles utilisant des cellules de la leucémie aigüe myéloïde, il est suggéré que l'ABT-737 agit en induisant une dissociation des complexes Bcl-2/Bax et induit l'activation de l'apoptose intrinsèque de manière Bak-dépendante mais Bim-indépendante (Konopleva et al., 2006). De tels complexes ont été également montrés comme déterminants dans la sensibilité à l'ABT-737 de cellules de myélome multiple (Bodet et al., 2011). Cependant, dans des expériences de co-immunoprécipitation, nous n'avons pas détecté l'existence de tels complexes que ce soit dans les cellules SW480 ou dans les cellules SW620 et ce en adhérence ou en suspension (non montré). Dans une autre étude utilisant des cellules de la leucémie lymphocytaire chronique, l'ABT-737 rompt les

complexes Bcl-2/Bim, libérant ainsi Bim qui va à son tour induire l'activation de Bax et permettre la formation de pores à la membrane mitochondriale. De fait, la diminution de l'expression de Bim réduit la sensibilité de telles cellules à l'ABT-737 (Del Gaizo Moore et al., 2007). Nous avons mis en évidence des complexes Bcl-2/Bim et Bcl-xL/Bim dans les cellules SW480 et SW620 cultivées en suspension et ces complexes ne sont plus détectables en présence d'ABT-737. Ainsi ces deux types cellulaires, une fois détachés de la MEC, sont dans le même état que celui qui a été décrit par Letai et ses collaborateurs pour par exemple des cellules de leucémie lymphocytaire chronique: elles sont « prédisposées à la mort » (primed for death) (Certo et al., 2006; Del Gaizo Moore et al., 2007; Letai, 2008). Cet état est caractérisé par une dépendance sur les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pour leur survie des cellules qui corrèle avec la séquestration de molécules à BH3-seul activatrices (Bim, Bid) par ces protéines. Le déplacement des molécules à BH3-seul activatrices par des protéines à BH3-seul sensibilisatrices ou par l'ABT-737 conduit à l'activation de Bax/Bak et à la mort de la cellule. Ainsi, ce n'est pas le niveau global d'expression de Bcl-2 ou Bcl-xL qui détermine la sensibilité des cellules aux BH3-mimétiques mais la proportion de ces deux molécules qui sont couplées aux protéines à BH3-seul activatrices. La résistance à l'ABT-737 des cellules SW620 en adhérence, malgré un taux d'expression de Bcl-2 et Bcl-xL semblable à celui des cellules en suspension, peut ainsi s'expliquer par le fait que nous n'avons détecté aucun complexe Bcl-2/Bim ou Bcl-xL/Bim dans ces conditions de culture. En revanche, les cellules SW480 adhérentes sont aussi résistantes à l'ABT-737 et ce malgré la présence de complexes Bcl-2/Bim (nous n'avons pas détecté de complexes Bcl-xL/Bim dans ces cellules). Par ailleurs, une étude a rapporté qu'une forte expression de Mcl-1 peut conduire à une résistance à l'ABT-737 (van Delft et al., 2006). En effet, ce BH3-mimétique est un antagoniste de Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W mais pas de Mcl-1 (Oltersdorf et al., 2005). Il est probable que parmi les protéines Mcl-1 présentes, certaines ne soient pas complexées. Ainsi, les protéines pro-apoptotique libérées de Bcl-2 suite au traitement à l'ABT-737, en particulier Bim, peuvent se retrouver séquestrées par Mcl-1, inhibant ainsi l'apoptose (**figure 58**).



**Figure 58 : Mécanisme d'action de l'ABT-737 et de la réponse à ce traitement en fonction du ratio Bcl-2/Mcl-1 des cellules.** (a) les protéines BH3-seuls activatrices sont séquestrées par BCL-2 au niveau de la mitochondrie, préservant ainsi la survie. (b) Le traitement avec l'ABT-737 déplace les activateurs, qui activent alors BAX ou BAK , qui s'oligomérisent et induisent la MOMP. (c,d) Quand MCL-1 est plus abondant, les activateurs déplacés de BCL-2 par le traitement à l'ABT-737 peuvent être liés à MCL-1 pour échapper à la mort cellulaire.

De fait, le taux de Mcl-1 est élevé dans les cellules SW480 et, en adhérence, nous avons trouvé que la protéine Bim est complexée à Mcl-1. En revanche en suspension, les SW480 présentent un taux d'expression de Bim augmenté. Ainsi, la quantité de Bim libérée par le traitement à l'ABT-737 doit excéder le pouvoir tampon de Mcl-1, d'où la sensibilité de ces cellules en suspension à l'ABT-737.

Noxa a été prouvée comme une cible thérapeutique particulièrement pertinente pour la LLC, car elle interagit spécifiquement avec Mcl-1, neutralisant ainsi son action anti-apoptotique (Suzuki et al., 2009). En effet, Gomez-Bougie et ses collaborateurs ont montré que les complexes formés entre Noxa et Mcl-1 induisent le clivage de Mcl-1 ainsi que sa dégradation par le protéasome (Gomez-Bougie et al., 2007). De plus, l'augmentation de l'expression de Noxa induit une augmentation de complexes Mcl-1/Noxa aux dépens des complexes Mcl-1/Bim et Mcl-1/Bak. Par conséquent, les protéines telles que Bak ou Bim vont se retrouver sous forme libre permettant l'induction de l'apoptose. Ainsi, l'axe Noxa/Mcl-1 est une cible attrayante pour des stratégies thérapeutiques basées sur l'apoptose, en particulier les agents anticancéreux qui augmentent l'expression de Noxa semblent être de bons

candidats pour une combinaison avec l'ABT-737. Nous avons donc voulu évaluer si Noxa était augmentée dans les cellules SW480 et SW620 cultivées en suspension et pourrait participer à la sensibilité des cellules à l'ABT-737. Nous n'avons trouvé aucune variation du taux d'expression de Noxa ce qui indique qu'elle ne participe sans doute pas à la différence de sensibilité à l'ABT-737.

En conclusion, la période transitoire pendant laquelle les cellules tumorales représentent une étape intéressante durant laquelle les cellules peuvent être ciblées par les BH3 mimétiques tels que l'ABT-737. En dépit de son activité antitumorale, une limitation de l'utilisation de l'ABT-737 est due au fait de sa biodisponibilité limitée. C'est donc l'ABT-263 (navitoclax) qui est récemment entré en essais cliniques de phase I pour le traitement de lymphomes, de la leucémie lymphocytaire chronique et des tumeurs solides telles que le cancer du poumon à petites cellules (Tse et al., 2008). Dans la mesure où l'ABT-263 neutralise spécifiquement Bcl-xL, cet agent provoque une thrombocytopenie dose-dépendante prévisible en raison de la dépendance des plaquettes sur Bcl-xL pour leur survie. De plus, ceci fournit une preuve pharmacodynamique du mécanisme d'action du médicament. L'activité clinique modeste de navitoclax est probablement liée à l'incapacité d'optimiser sa dose en raison de cette thrombopénie dose-limitante (Davids and Letai, 2013). C'est pour cette raison qu'AbbVie a développé l'ABT-199. C'est un inhibiteur très puissant et sélectif de Bcl-2 mais non de Bcl-xL et préserve la fonction des plaquettes. L'ABT-199 tue de manière effective diverses lignées cellulaires de lymphome non hodgkinien (LNH) et de leucémie myéloïde aiguë, suggérant que le médicament a le potentiel d'être efficace contre une grande variété de tumeurs malignes. Cependant, le travail clinique a été suspendu après le décès de deux patients en raison d'une lyse tumorale très rapide, ce qui, en fin de compte, témoigne de l'efficacité de la drogue et permettra sans doute, une fois les doses optimales déterminées, d'établir cet inhibiteur spécifique de Bcl-2 comme une approche valable pour le traitement de certains cancers (Souers et al., 2013).

La plupart des essais cliniques sont effectués sur les hémopathies humaines malignes. Ce que notre étude indique, c'est que des composés tels que l'ABT-263 ou -199 pourraient aussi avoir un effet sur les tumeurs épithéliales lors leur transit dans la vasculature.

## **Partie II : Rôle de la protéine CDCP1 dans la résistance à l'anoïkis des cellules coliques métastatiques.**

C-src , prototype des « Src Family Kinases » (SFK), joue un rôle important dans de nombreuses fonctions cellulaires incluant la prolifération l'adhérence et la migration (Playford and Schaller, 2004). De nombreuses études ont montré une expression ou une activité Src augmentée dans diverses tumeurs (Summy and Gallick, 2003). Cette activité accrue est souvent corrélée avec le potentiel malin des tumeurs et un mauvais pronostic (Yeatman, 2004). Ainsi les SFK peuvent contribuer à des aspects variés de la progression tumorale, incluant une prolifération et une migration non contrôlées, la perte des contacts cellule-cellule, l'invasion, l'angiogenèse et la formation de métastases. Src est constitutivement active dans plus de 80% des cancers du colon et particulièrement dans les métastases (Talamonti et al., 1993). Nous avons de fait trouvé une activité Src beaucoup plus importante dans les cellules SW620 que dans les cellules SW480. D'une manière très intéressante, l'expression de Src actif dans les cellules SW480 augmente leur résistance à l'anoïkis (Windham et al., 2002). De plus, dans une étude antérieure, nous avons montré qu'un inhibiteur de Src, le SU6656, induisait la sensibilité des cellules SW620 à l'anoïkis (non montré). Ces résultats suggéraient qu'un substrat de Src était sans doute à l'origine de la différence de sensibilité à l'anoïkis des cellules SW480 et SW620. nous avons identifié, par analyse protéomique par un anticorps anti-phospho-tyrosine, une protéine qui n'est reconnue que dans les cellules SW620. Il s'agit de la protéine transmembranaire CDCP1 qui est justement un substrat des SFK. L'étude de l'expression de CDCP1 nous a permis de montrer qu'en fait CDCP1 n'était exprimée que dans ces dernières. CDCP1 semblait un bon candidat pour expliquer la résistance des cellules métastatiques SW620 à l'anoïkis dans la mesure, au cours de notre étude, Uekita et al. ont montré que l'inhibition de l'expression de CDCP1 par ARN interférence induit l'apoptose des cellules d'adénocarcinome pulmonaire cultivées en suspension mais pas des cellules cultivées en adhérence (Uekita et al., 2007).

Pour explorer notre hypothèse, nous avons produit une lignée de SW480 exprimant CDCP1 de façon stable. La lignée obtenue (SW480-CDCP1) s'est révélée être résistante à l'anoïkis. La preuve irréfutable que CDCP1 jouait un rôle dans cette résistance a été obtenue en éteignant son expression à l'aide de siRNA spécifiques : les cellules redeviennent alors sensibles à l'anoïkis. Nous avons déterminé que le taux d'expression de CDCP1 était comparable dans les lignées SW480-CDCP1 et SW620 et qu'elle était phosphorylée sur tyrosine dans les deux lignées. De plus nous avons trouvé une activité SFK augmentée dans les cellules SW480-CDCP1 comparées aux cellules SW480 ce qui confirme qu'il existe une boucle d'amplification entre CDCP1 et les SFK (Liu et al., 2011). De plus, nous avons observé que l'expression de CDCP1 dans les cellules SW480 entraîne une altération de la morphologie des cellules qui acquièrent un phénotype fibroblastique. Ceci conforte les résultats

obtenus sur les cellules HeLa transfectées avec CDCP1 (Wortmann et al., 2011). De plus nous avons montré que les cellules SW480-CDCP1 présentent une vitesse de migration accrue ainsi qu'une augmentation de l'activité de la petite GTPase Rho.

A ce stade, toutes les données étaient donc cohérentes et c'est pourquoi nous avons poursuivi notre étude. Les résultats obtenus vont être commentés dans cette discussion. Cependant, vers le milieu de l'étude, nous avons voulu établir d'autres lignées SW480 transfectées avec CDCP1 afin de confirmer nos résultats. Deux lignées ont ainsi été obtenues au cours de deux transfections successives, CT et C3. Dans les deux cas, les cellules exprimant CDCP1 ont été isolées sur un trieur de cellules. Elles expriment CDCP1 à un niveau comparable à celui des cellules SW480-CDCP1. Dans la lignée CT, CDCP1 est phosphorylée et l'activité SFK est augmentée. Dans la lignée C3, CDCP1 n'est pas phosphorylée et l'activité SFK n'est pas augmentée. Cependant, dans les deux cas et de manière surprenante les cellules restent sensibles à l'anoïkis. Bien sûr, ces résultats nous ont plongés dans une grande perplexité. Ils semblent indiquer que CDCP1 serait nécessaire à la protection contre l'anoïkis, étant donné les résultats obtenus avec le siCDCP1 dans la lignée SW480-CDCP1, mais pas suffisant. Un autre événement, en dehors de l'expression de CDCP1, se serait alors produit dans cette lignée. Nous ne pouvons pas parler d'un effet clone car cette lignée n'a pas été clonée. Il reste cependant possible qu'un clone dans lequel se serait produit cet événement supplémentaire ait fini par prendre le dessus dans la culture. Une telle possibilité est confortée par le fait que non seulement les lignées CT et C3 sont sensibles à l'anoïkis mais elles n'ont pas, contrairement aux cellules SW480-CDCP1, de changement de morphologie ou de vitesse de migration augmentée.

Les résultats qui suivent ne concernent donc que la lignée SW480-CDCP1 et la lignée SW620. Nous avons, à chaque fois que possible, confirmé à l'aide d'un siRNA spécifique que les observations faites étaient bien dues à CDCP1.

Le détachement des cellules de la MEC a été montré comme étant nécessaire à la phosphorylation de CDCP1 dans certaines cellules épithéliales (Spasov et al., 2009). Nous n'avons pas confirmé ces données dans notre modèle où CDCP1 est phosphorylée aussi bien en adhérence qu'en suspension. Il a été décrit que le clivage de CDCP1 induit sa phosphorylation (He et al., 2010) et CDCP1 est clivée aussi bien par la trypsine utilisée pour détacher les cellules que par la dispase utilisée pour leur culture en suspension. Cependant, la phosphorylation de CDCP1 ne semble pas être due à son clivage dans nos cellules dans la mesure où elle est retrouvée sur la forme native à 140kD de CDCP1 lorsque les cellules sont lysées directement dans le flacon de culture. Les relations entre le détachement, la protéolyse et la phosphorylation de CDCP1 nécessitent d'être plus clairement définies (Wortmann et al., 2009).

Dans la mesure où l'anoïkis est une apoptose de type intrinsèque dans les cellules SW480 nous avons étudié l'expression de divers membres de la famille Bcl-2 au cours de la culture en suspension. Plusieurs travaux indiquent que Bcl-xL est induit comme conséquence de la signalisation SFK et que cet événement conduit à une résistance à l'anoïkis (Coll et al., 2002; Rosen et al., 2001). Bien que

l'activité SFK soit augmentée dans les cellules SW480-CDCP1 nous n'avons pas trouvé d'induction de l'expression Bcl-xL. Nous avons remarqué que Bax était globalement présent à un taux plus faible dans les cellules SW480-CDCP1 comparées aux cellules SW480. Il semble donc possible que cela contribue à leur résistance à l'anoïkis, mais nous n'avons pas exploré cette possibilité. Nous avons également trouvé que l'expression de Bim était beaucoup moins augmentée dans les cellules SW480-CDCP1 au cours de la culture que dans les cellules SW480. Ce manque d'augmentation semble être directement dû à CDCP1 car l'extinction de CDCP1 par siRNA permet de retrouver une augmentation de Bim. Donc, dans les cellules SW480-CDCP1 en suspension, CDCP1 pourrait s'opposer à l'augmentation de Bim. L'inhibition de la voie MEK-Erk par le PD0325901 permet de retrouver une augmentation de Bim et une sensibilisation à l'anoïkis dans les cellules SW480-CDCP1. Cette observation suggère que les cellules SW480-CDCP1 sont sensibles à Bim pourvu que celle-ci soit présente à un niveau suffisant. Cependant, ceci ne prouve pas que CDCP1 empêche l'augmentation de Bim via la voie MEK-Erk. De fait, l'activité Erk est comparable et soutenue dans les cellules SW480 et SW480-CDCP1 cultivées en suspension. Il est donc probable que la régulation de Bim par CDCP1 se fasse par une autre voie.

Nos travaux ont été orientés vers les SFK et CDCP1 dans la mesure où un inhibiteur des SFK, le SU 6656 sensibilisait les cellules SW620 à l'anoïkis. Nous avons repris ce type d'étude avec un inhibiteur plus spécifique des SFK, le dasatinib, qui inhibe l'activité des SFK et celle de la kinase Abl. De manière surprenante, la présence de cet inhibiteur lors de la culture en suspension, ne sensibilise ni les cellules SW620 ni les cellules SW480-CDCP1 à l'anoïkis et ce malgré une inhibition très efficace de l'activité SFK et de la phosphorylation de CDCP1. Ces résultats vont à l'encontre de toutes les études qui indiquent que la fonction de CDCP1 nécessite sa phosphorylation sur la tyrosine 734. La seule indication d'une activité de CDCP1 qui pourrait être indépendante de sa phosphorylation sur tyrosine vient d'une étude faite dans des cellules HeLa transfectées soit avec CDCP1 soit avec le mutant non phosphorylable de CDCP1, CDCP1-Y734F. Les deux formes de CDCP1 se sont montrées très efficaces pour la formation de métastases dans un modèle d'embryons de poulet (Deryugina et al., 2009). Aucun commentaire n'a été fait dans cet article concernant la contradiction entre cette observation et le reste de la littérature sur CDCP1. Serait-il possible que le rôle de la phosphorylation sur tyrosine dans certaines activités de CDCP1 ait été sur-évalué ? Quoiqu'il en soit, nos résultats sont en contradiction avec l'étude d'Uekita et al., montrant que CDCP1 doit être phosphorylée sur tyrosine pour protéger des cellules de cancer du poumon de l'anoïkis (Uekita et al., 2007). Il en va de même en ce qui concerne le rôle de la PKC $\delta$  dans la mesure où l'extinction d'expression de la cette PKC ne sensibilise pas les cellules SW480-CDCP1 à l'anoïkis.

Nous avons mis en évidence, par analyse en spectrométrie de masse, que CDCP1 était phosphorylée sur la serine 797 qui est située dans la partie C-terminal de CDCP1. Il serait intéressant de muter cette sérine afin de déterminer si cette phosphorylation joue un rôle dans l'activité de CDCP1.

Dans la mesure où la PKC $\delta$  ne semble pas responsable de la résistance à l'anoïkis dans nos cellules, nous avons entrepris une recherche de nouveaux partenaires de CDCP1 par spectrométrie de masse en analysant les cellules SW620. Nous avons identifié des partenaires connus de CDCP1 (Fyn, Yes, PKC $\delta$ ) ce qui valide la qualité de la co-immunoprécipitation. Le fait que nous ayons trouvé Fyn, Yes et non Src est en accord avec une autre étude qui ne montre qu'une très faible association entre CDCP1 et Src (Uekita et al., 2007). D'une manière très intéressante, nous avons co-immunoprécipité l'éphrine A2 (EphA2) et l'intégrine  $\beta$ 4 (ITGB4). Nous avons rapproché ces résultats d'une étude très récente faite sur une signalisation alternative induite par l'EGF-R. Dans la signalisation classique, la liaison au ligand conduit à l'autophosphorylation de l'EGF-R et à l'activation d'une cascade de signalisation qui peut être bloquée par des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (TKI) de l'EGF-R tels que le gefitinib ou l'erlotinib. Cependant, lors de l'activation de Met par l'HGF la signalisation EGF-R est altérée de manière drastique. L'HGF induit une résistance de la signalisation EGF-R aux TKI et l'assemblage d'un module comprenant EGF-R, CDCP1, ITGB4, EphA2, et Axl. La liaison de ces différents interacteurs entraîne un mécanisme de signalisation alternatif qui ne nécessite pas la phosphorylation de l'EGF-R et est donc insensible aux TKI (Gusenbauer et al., 2012). Comme montré précédemment, nous avons trouvé que les cellules SW620 n'expriment pas l'EGF-R. Cependant, nous émettons l'hypothèse qu'un module de signalisation semblable, indépendant de l'EGF-R, pourrait exister dans les cellules SW620 et qu'il pourrait constituer une voie de signalisation alternative pour CDCP1.

Dans ce cadre et dans un premier temps, nous avons confirmé l'interaction CDCP1/ITGB4 par immunoprécipitation. Et, de manière importante, nous avons montré que cette interaction était indépendante de la phosphorylation sur Y-734 de CDCP1. Cependant, l'extinction de l'expression d'ITGB4 dans les cellules SW620 ne les sensibilise pas à l'anoïkis. Nous aimerions pouvoir réaliser le même genre d'expérience avec l'EphA2.

Nous concluons de ces travaux que l'expression de CDCP1 dans les cellules SW480 est nécessaire mais non suffisante pour induire une protection contre l'anoïkis. Nous n'avons pas été en mesure d'identifier le deuxième événement qui s'est probablement produit dans les cellules SW480-CDCP1 pour conduire à cette protection. Quoi qu'il en soit ce pouvoir protecteur de CDCP1 contre l'anoïkis implique un blocage de l'augmentation d'expression de Bim au cours de la culture en suspension. De plus, il ne semble pas nécessiter la phosphorylation de CDCP1 sur tyrosine et pourrait donc être du à un mode de signalisation alternatif de cette protéine.

Comme décrit dans la littérature, nous avons visualisé par immunohistochimie que la protéine CDCP1 est exprimée dans les tissus sains coliques. Nous avons déterminé de plus que cette protéine est exclusivement cytoplasmique et n'est phosphorylée que dans une petite minorité des cas. Dans la mesure où toutes les données publiées indiquent que CDCP1 doit être membranaire et phosphorylé pour être actif, il semblerait donc que la protéine soit largement sous sa forme inactive dans les tissus coliques sains. Notre étude a révélé un gradient de CDCP1 dans ces tissus avec une localisation essentiellement au niveau de l'apex des microvillosités. Sachant que ces cellules correspondent à celles qui sont en cours de desquamation, il semble donc que les cellules, qui sont prêtes à être relarguées dans la lumière de la microvillosité, et donc à se décrocher de sa matrice extracellulaire, augmentent leur expression de CDCP1.

Avant tout commentaire sur les résultats obtenus dans les tissus tumoraux, il faut souligner que la cohorte que nous avons pu analyser est très petite : 16 patients au total avec seulement 4 cas de tumeurs non métastatiques. Il semble donc que les résultats obtenus doivent être relativisés en fonction de ce fait. La tendance qui découle de nos résultats est qu'il n'y aurait pas de corrélation entre le taux d'expression de CDCP1 dans la tumeur colique et le pouvoir métastatique et ceci quelque soit le paramètre étudié : pourcentage de positivité, localisation membranaire ou non, intensité de marquage, pourcentage de cellules positives à l'intérieur de la tumeur. Nous avons eu accès au compte-rendu anatomopathologique des patients et avons pu en déduire que l'expression de CDCP1 n'était pas non plus corrélée au stade de différenciation de la tumeur ni à son statut dans la classification TNM. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que, dans le cancer du côlon, la plupart des modifications génétiques s'effectuent aux stades précoces de la tumeur, c'est-à-dire pendant l'évolution de l'adénome en carcinome invasif. Par conséquent, lorsque l'étude immunohistochimique est réalisée, ces modifications sont d'or et déjà effectuées et il n'existerait donc pas de grandes différences d'expression protéique entre une tumeur métastatique de type T4 et une tumeur métastatique moins évoluée de type T3, par exemple. De même, il n'existerait pas de grandes différences d'expression protéique entre une tumeur métastatique et une tumeur non métastatique. Même si cette dernière remarque peut être expliquée par le fait que les tumeurs non métastatiques analysées allaient très certainement développer des métastases avec le temps et possèderaient donc les mêmes modifications que les tumeurs métastatiques étudiées. De plus, nous ignorons à ce jour le devenir des patients qui ont tous été opérés en 2007. Par conséquent, nous ne pouvons pas déterminer si l'expression de CDCP1 pourrait avoir une valeur pronostique comme cela a été montré dans d'autres tumeurs épithéliales (rein (Awakura et al., 2008), poumon (Ikeda et al., 2009), pancréas (Miyazawa et al., 2010)).

Il est intéressant de noter que le nombre de cellules exprimant la protéine au sein d'un tissu varie d'un patient à l'autre. En effet, nous constatons dans le cas des tumeurs métastatiques que le pourcentage de cellules exprimant la protéine dans les tissus tumoraux coliques varie considérablement en fonction des patients, puisqu'il peut passer de 5 à 100%. Ceci est certainement dû à l'hétérogénéité qui caractérise toutes les tumeurs. En ce qui concerne l'expression de CDCP1, cette hétérogénéité semble plus importante dans les tumeurs métastatiques comparées aux tumeurs non métastatiques dans lesquelles l'expression de CDCP1 est assez uniforme. Cependant, nous pouvons penser que le nombre de cellules tumorales exprimant la protéine au sein d'un même tissu varie au cours du temps en suivant un mécanisme comportant des étapes chronologiques encore inconnues, et ce, dans le but de faciliter l'évolution tumorale. Ainsi, notre marquage immunohistochimique ne reflèterait que l'expression de la protéine à un temps donné et cette expression pourrait varier rapidement dans le temps.

Dans cette étude, nous avons l'originalité de disposer d'un anticorps anti-phospho (Y734)-CDCP1 que nous avons fait faire à façon et qui s'est révélé être compatible avec l'immunohistochimie. En fait, plus que l'expression totale, nous attendions une corrélation entre la présence de la forme phosphorylée de CDCP1 et le stade de progression tumorale. Tel n'est pas le cas dans la mesure où CDCP1 est phosphorylée dans toutes les tumeurs non-métastatiques mais seulement dans 33% des tumeurs métastatiques. Cette différence est surprenante et plus difficile à interpréter. Il semble en effet contre-intuitif d'imaginer une déphosphorylation de CDCP1 au fur et à mesure de la progression tumorale et c'est pourtant ce que les résultats semblent suggérer. Cependant, il faut souligner que dans presque la moitié des tumeurs métastatiques, CDCP1 total n'a été détecté que dans moins de 20% des cellules ce qui pourrait rendre plus difficile la détection de sa phosphorylation.

La forme membranaire de la protéine CDCP1, qui est notre forme d'intérêt, est plus souvent présente que la forme cytoplasmique dans les deux types de tumeurs CDCP1-positives. Cette forme est présente quelque soit le stade tumoral, renforçant l'idée qu'il n'y ait pas de lien entre l'expression de la protéine et le stade tumoral. Il est intéressant de noter que les résultats avec l'anti-p-CDCP1 montrent exclusivement un marquage intra-cytoplasmique. Ceci qui supposerait l'existence d'un mécanisme encore inconnu empêchant le maintien à long terme de la position membranaire de la protéine phosphorylée.

Une autre observation intéressante et inattendue a été le fait que des métastases négatives pour CDCP1 pouvaient dériver d'une tumeur positive. C'est en particulier le cas des métastases ganglionnaires où, sur les 7 patients dont la tumeur primaire exprimait CDCP1, cette protéine n'a été retrouvée que sur 3

des métastases ganglionnaires. De plus, elle n'était jamais phosphorylée dans ces métastases. Il semble donc peu probable que CDCP1 intervienne dans le développement des métastases ganglionnaires. Il reste possible que son expression soit maintenue au cours du trajet vers le ganglion et ne soit abolie qu'une fois la métastase installée. Pourtant, la lignée cellulaire SW620, sur laquelle nous travaillons, exprime la protéine alors qu'elle est issue d'une métastase ganglionnaire. Ceci suppose donc que le patient dont est issu cette lignée cellulaire, ferait partie des rares patients présentant des métastases ganglionnaires exprimant la protéine. La situation est différente dans le cas des métastases hépatiques où l'on retrouve la forme phosphorylée de CDCP1 dans 2 des 3 cas où la tumeur primaire était positive. Nous pouvons penser que l'activation de la protéine jouerait un rôle dans le développement et/ou le maintien de la métastase au niveau du foie.

Il serait intéressant d'effectuer une étude immunohistochimique sur une plus grande cohorte de patients dont le devenir est connu. Ainsi, le lien entre, d'une part, le pouvoir métastatique et, d'autre part, les paramètres tels que le pourcentage de positivité, la localisation membranaire, l'intensité du marquage et le pourcentage de phosphorylation, pourra être déterminé avec plus de certitude.



---

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---



- Adams, J.M., and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-1337.
- Ahmed, S., and Nawshad, A. (2007). Complexity in interpretation of embryonic epithelial-mesenchymal transition in response to transforming growth factor-beta signaling. *Cells, tissues, organs* 185, 131-145.
- Algeciras-Schimnich, A., Pietras, E.M., Barnhart, B.C., Legembre, P., Vijayan, S., Holbeck, S.L., and Peter, M.E. (2003). Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 11445-11450.
- Alvares, S.M., Dunn, C.A., Brown, T.A., Wayner, E.E., and Carter, W.G. (2008). The role of membrane microdomains in transmembrane signaling through the epithelial glycoprotein Gp140/CDCP1. *Biochimica et biophysica acta* 1780, 486-496.
- Andre, M., Le Caer, J.P., Greco, C., Planchon, S., El Nemer, W., Boucheix, C., Rubinstein, E., Chamot-Rooke, J., and Le Naour, F. (2006). Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/MS and MALDI-FTICR-MS. *Proteomics* 6, 1437-1449.
- Andreu, P., Colnot, S., Godard, C., Gad, S., Chafey, P., Niwa-Kawakita, M., Laurent-Puig, P., Kahn, A., Robine, S., Perret, C., and Romagnolo, B. (2005). Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development* 132, 1443-1451.
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J.J., Mazzei, G., *et al.* (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-372.
- Anvekar, R.A., Asciola, J.J., Lopez-Rivera, E., Floros, K.V., Izadmehr, S., Elkholi, R., Belbin, G., Sikora, A.G., and Chipuk, J.E. (2012). Sensitization to the mitochondrial pathway of apoptosis augments melanoma tumor cell responses to conventional chemotherapeutic regimens. *Cell death & disease* 3, e420.
- Aoudjit, F., and Vuori, K. (2001). Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. *The Journal of cell biology* 152, 633-643.
- Arnaut, M.A., Goodman, S.L., and Xiong, J.P. (2007). Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Current opinion in cell biology* 19, 495-507.
- Arya, R., Mallik, M., and Lakhota, S.C. (2007). Heat shock genes - integrating cell survival and death. *Journal of biosciences* 32, 595-610.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Attisano, L., and Wrana, J.L. (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296, 1646-1647.
- Attwell, S., Roskelley, C., and Dedhar, S. (2000). The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene* 19, 3811-3815.
- Avivar-Valderas, A., Salas, E., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J.A., Nagi, C., Debnath, J., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2011). PERK integrates autophagy and oxidative stress responses to promote survival during extracellular matrix detachment. *Molecular and cellular biology* 31, 3616-3629.

- Bagnoli, M., Canevari, S., and Mezzanzanica, D. (2010). Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology* *42*, 210-213.
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., and Korsmeyer, S.J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* *41*, 899-906.
- Balin-Gauthier, D., Delord, J.P., Rochaix, P., Mallard, V., Thomas, F., Hennebelle, I., Bugat, R., Canal, P., and Allal, C. (2006). In vivo and in vitro antitumor activity of oxaliplatin in combination with cetuximab in human colorectal tumor cell lines expressing different level of EGFR. *Cancer chemotherapy and pharmacology* *57*, 709-718.
- Barnhart, B.C., Alappat, E.C., and Peter, M.E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Seminars in immunology* *15*, 185-193.
- Benes, C.H., Poulgiannis, G., Cantley, L.C., and Soltoff, S.P. (2012). The SRC-associated protein CUB Domain-Containing Protein-1 regulates adhesion and motility. *Oncogene* *31*, 653-663.
- Benes, C.H., Wu, N., Elia, A.E., Dharia, T., Cantley, L.C., and Soltoff, S.P. (2005). The C2 domain of PKCdelta is a phosphotyrosine binding domain. *Cell* *121*, 271-280.
- Berezovskaya, O., Schimmer, A.D., Glinskii, A.B., Pinilla, C., Hoffman, R.M., Reed, J.C., and Glinsky, G.V. (2005). Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer research* *65*, 2378-2386.
- Bergin, E., Levine, J.S., Koh, J.S., and Lieberthal, W. (2000). Mouse proximal tubular cell-cell adhesion inhibits apoptosis by a cadherin-dependent mechanism. *American journal of physiology. Renal physiology* *278*, F758-768.
- Bhatt, A.S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Craik, C.S., and Moasser, M.M. (2005). Adhesion signaling by a novel mitotic substrate of src kinases. *Oncogene* *24*, 5333-5343.
- Blagosklonny, M.V. (2001). Unwinding the loop of Bcl-2 phosphorylation. *Leukemia* *15*, 869-874.
- Bodet, L., Gomez-Bougie, P., Touzeau, C., Dousset, C., Descamps, G., Maiga, S., Avet-Loiseau, H., Bataille, R., Moreau, P., Le Gouill, S., *et al.* (2011). ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma. *Blood* *118*, 3901-3910.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* *85*, 803-815.
- Borner, C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular immunology* *39*, 615-647.
- Bozzo, C., Sabbatini, M., Tiberio, R., Piffanelli, V., Santoro, C., and Cannas, M. (2006). Activation of caspase-8 triggers anoikis in human neuroblastoma cells. *Neuroscience research* *56*, 145-153.
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R., and Kirchner, T. (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 10356-10361.

- Breitschopf, K., Haendeler, J., Malchow, P., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2000). Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 20, 1886-1896.
- Brodeur, G.M., Nakagawara, A., Yamashiro, D.J., Ikegaki, N., Liu, X.G., Azar, C.G., Lee, C.P., and Evans, A.E. (1997). Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas. *Journal of neuro-oncology* 31, 49-55.
- Brown, T.A., Yang, T.M., Zaitsevskaja, T., Xia, Y., Dunn, C.A., Sigle, R.O., Knudsen, B., and Carter, W.G. (2004). Adhesion or plasmin regulates tyrosine phosphorylation of a novel membrane glycoprotein p80/gp140/CUB domain-containing protein 1 in epithelia. *The Journal of biological chemistry* 279, 14772-14783.
- Buchheit, C.L., Rayavarapu, R.R., and Schafer, Z.T. (2012). The regulation of cancer cell death and metabolism by extracellular matrix attachment. *Seminars in cell & developmental biology* 23, 402-411.
- Buhring, H.J., Kuci, S., Conze, T., Rathke, G., Bartolovic, K., Grunebach, F., Scherl-Mostageer, M., Brummendorf, T.H., Schweifer, N., and Lammers, R. (2004). CDCP1 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and nonhematopoietic origin. *Stem Cells* 22, 334-343.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.
- Cartron, P.F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M., and Juin, P. (2004a). The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Molecular cell* 16, 807-818.
- Cartron, P.F., Oliver, L., Juin, P., Meflah, K., and Vallette, F.M. (2004b). The p18 truncated form of Bax behaves like a Bcl-2 homology domain 3-only protein. *The Journal of biological chemistry* 279, 11503-11512.
- Casar, B., He, Y., Ionomou, M., Hooper, J.D., Quigley, J.P., and Deryugina, E.I. (2012a). Blocking of CDCP1 cleavage in vivo prevents Akt-dependent survival and inhibits metastatic colonization through PARP1-mediated apoptosis of cancer cells. *Oncogene* 31, 3924-3938.
- Casar, B., Rimann, I., Kato, H., Shattil, S.J., Quigley, J.P., and Deryugina, E.I. (2012b). In vivo cleaved CDCP1 promotes early tumor dissemination via complexing with activated beta1 integrin and induction of FAK/PI3K/Akt motility signaling. *Oncogene*.
- Cassavaugh, J., and Lounsbury, K.M. (2011). Hypoxia-mediated biological control. *Journal of cellular biochemistry* 112, 735-744.
- Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature reviews. Cancer* 4, 118-132.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A., and Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer cell* 9, 351-365.
- Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E.S., and Shi, Y. (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104, 769-780.
- Chan, F.K., and Baehrecke, E.H. (2012). RIP3 finds partners in crime. *Cell* 148, 17-18.

- Chao, C., Lotz, M.M., Clarke, A.C., and Mercurio, A.M. (1996). A function for the integrin alpha6beta4 in the invasive properties of colorectal carcinoma cells. *Cancer research* *56*, 4811-4819.
- Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M., and Ingber, D.E. (1997). Geometric control of cell life and death. *Science* *276*, 1425-1428.
- Chen, J., Jin, S., Abraham, V., Huang, X., Liu, B., Mitten, M.J., Nimmer, P., Lin, X., Smith, M., Shen, Y., *et al.* (2011). The Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor, navitoclax, enhances the activity of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics* *10*, 2340-2349.
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular cell* *17*, 393-403.
- Chen, S., Dai, Y., Pei, X.Y., and Grant, S. (2009). Bim upregulation by histone deacetylase inhibitors mediates interactions with the Bcl-2 antagonist ABT-737: evidence for distinct roles for Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1. *Molecular and cellular biology* *29*, 6149-6169.
- Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K., and Hardwick, J.M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* *278*, 1966-1968.
- Cheng, E.H., Sheiko, T.V., Fisher, J.K., Craigen, W.J., and Korsmeyer, S.J. (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* *301*, 513-517.
- Chiarugi, P., and Giannoni, E. (2008). Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochemical pharmacology* *76*, 1352-1364.
- Christofori, G. (2006). New signals from the invasive front. *Nature* *441*, 444-450.
- Clarke, P.G., and Clarke, S. (1996). Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anatomy and embryology* *193*, 81-99.
- Clarke, P.G., and Clarke, S. (2012). Nineteenth century research on cell death. *Experimental oncology* *34*, 139-145.
- Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veluona, M.A., and Hardwick, J.M. (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 554-559.
- Coll, M.L., Rosen, K., Ladedo, V., and Filmus, J. (2002). Increased Bcl-xL expression mediates v-Src-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *Oncogene* *21*, 2908-2913.
- Collins, N.L., Reginato, M.J., Paulus, J.K., Sgroi, D.C., Labaer, J., and Brugge, J.S. (2005). G1/S cell cycle arrest provides anoikis resistance through Erk-mediated Bim suppression. *Molecular and cellular biology* *25*, 5282-5291.
- Conradt, B., and Horvitz, H.R. (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* *93*, 519-529.
- Conze, T., Lammers, R., Kuci, S., Scherl-Mostageer, M., Schweifer, N., Kanz, L., and Buhring, H.J. (2003). CDCP1 is a novel marker for hematopoietic stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* *996*, 222-226.

- Cragg, M.S., Kuroda, J., Puthalakath, H., Huang, D.C., and Strasser, A. (2007). Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics. *PLoS medicine* 4, 1681-1689; discussion 1690.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *The Biochemical journal* 341 ( Pt 2), 233-249.
- Crouch, D.H., Fincham, V.J., and Frame, M.C. (1996). Targeted proteolysis of the focal adhesion kinase pp125 FAK during c-MYC-induced apoptosis is suppressed by integrin signalling. *Oncogene* 12, 2689-2696.
- Danial, N.N. (2007). BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 7254-7263.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B., and Greenberg, M.E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Molecular cell* 6, 41-51.
- Davids, M.S., and Letai, A. (2012). Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30, 3127-3135.
- Davids, M.S., and Letai, A. (2013). ABT-199: taking dead aim at BCL-2. *Cancer cell* 23, 139-141.
- Davies, M.A., Koul, D., Dhesi, H., Berman, R., McDonnell, T.J., McConkey, D., Yung, W.K., and Steck, P.A. (1999). Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN. *Cancer research* 59, 2551-2556.
- Day, C.L., Puthalakath, H., Skea, G., Strasser, A., Barsukov, I., Lian, L.Y., Huang, D.C., and Hinds, M.G. (2004). Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands. *The Biochemical journal* 377, 597-605.
- de Caestecker, M.P., Piek, E., and Roberts, A.B. (2000). Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 1388-1402.
- Dedhar, S. (2000). Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Current opinion in cell biology* 12, 250-256.
- Del Gaizo Moore, V., Brown, J.R., Certo, M., Love, T.M., Novina, C.D., and Letai, A. (2007). Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *The Journal of clinical investigation* 117, 112-121.
- Derksen, P.W., Liu, X., Saridin, F., van der Gulden, H., Zevenhoven, J., Evers, B., van Beijnum, J.R., Griffioen, A.W., Vink, J., Krimpenfort, P., *et al.* (2006). Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer cell* 10, 437-449.
- Deryugina, E.I., Conn, E.M., Wortmann, A., Partridge, J.J., Kupriyanova, T.A., Ardi, V.C., Hooper, J.D., and Quigley, J.P. (2009). Functional role of cell surface CUB domain-containing protein 1 in tumor cell dissemination. *Molecular cancer research : MCR* 7, 1197-1211.

- Desagher, S., and Martinou, J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in cell biology* *10*, 369-377.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (2001). Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Molecular cell* *8*, 601-611.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *The Journal of cell biology* *144*, 891-901.
- Desgrosellier, J.S., Barnes, L.A., Shields, D.J., Huang, M., Lau, S.K., Prevost, N., Tarin, D., Shattil, S.J., and Cheresch, D.A. (2009). An integrin alpha(v)beta(3)-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nature medicine* *15*, 1163-1169.
- Dewson, G., and Kluck, R.M. (2009). Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *Journal of cell science* *122*, 2801-2808.
- Diaz-Montero, C.M., Wygant, J.N., and McIntyre, B.W. (2006). PI3-K/Akt-mediated anoikis resistance of human osteosarcoma cells requires Src activation. *Eur J Cancer* *42*, 1491-1500.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffey, P.J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Current biology : CB* *10*, 1201-1204.
- Ding, Q., He, X., Hsu, J.M., Xia, W., Chen, C.T., Li, L.Y., Lee, D.F., Liu, J.C., Zhong, Q., Wang, X., and Hung, M.C. (2007). Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Molecular and cellular biology* *27*, 4006-4017.
- Ding, Q., Huo, L., Yang, J.Y., Xia, W., Wei, Y., Liao, Y., Chang, C.J., Yang, Y., Lai, C.C., Lee, D.F., *et al.* (2008). Down-regulation of myeloid cell leukemia-1 through inhibiting Erk/Pin 1 pathway by sorafenib facilitates chemosensitization in breast cancer. *Cancer research* *68*, 6109-6117.
- Dive, C., Gregory, C.D., Phipps, D.J., Evans, D.L., Milner, A.E., and Wyllie, A.H. (1992). Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochimica et biophysica acta* *1133*, 275-285.
- Doi, K., Li, R., Sung, S.S., Wu, H., Liu, Y., Manieri, W., Krishnegowda, G., Awwad, A., Dewey, A., Liu, X., *et al.* (2012). Discovery of marinopyrrole A (maritoclax) as a selective Mcl-1 antagonist that overcomes ABT-737 resistance by binding to and targeting Mcl-1 for proteasomal degradation. *The Journal of biological chemistry* *287*, 10224-10235.
- Domina, A.M., Vrana, J.A., Gregory, M.A., Hann, S.R., and Craig, R.W. (2004). MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* *23*, 5301-5315.
- Douma, S., Van Laar, T., Zevenhoven, J., Meuwissen, R., Van Garderen, E., and Peeper, D.S. (2004). Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* *430*, 1034-1039.
- Du, L., Lyle, C.S., and Chambers, T.C. (2005). Characterization of vinblastine-induced Bcl-xL and Bcl-2 phosphorylation: evidence for a novel protein kinase and a coordinated phosphorylation/dephosphorylation cycle associated with apoptosis induction. *Oncogene* *24*, 107-117.

Duxbury, M.S., Ito, H., Benoit, E., Waseem, T., Ashley, S.W., and Whang, E.E. (2004). A novel role for carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 as a determinant of gemcitabine chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer research* *64*, 3987-3993.

Easwaran, H., and Baylin, S.B. (2013). Epigenetic abnormalities in cancer find a "home on the range". *Cancer cell* *23*, 1-3.

Eckelman, B.P., and Salvesen, G.S. (2006). The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *The Journal of biological chemistry* *281*, 3254-3260.

El-Bahrawy, M., Poulson, R., Rowan, A.J., Tomlinson, I.T., and Alison, M.R. (2004). Characterization of the E-cadherin/catenin complex in colorectal carcinoma cell lines. *International journal of experimental pathology* *85*, 65-74.

Elliott, R.L., and Blobe, G.C. (2005). Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *23*, 2078-2093.

Ellis, R.E., Yuan, J.Y., and Horvitz, H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annual review of cell biology* *7*, 663-698.

Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M., and Thompson, C.B. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer research* *64*, 3892-3899.

Emerling, B.M., Benes, C.H., Poulgiannis, G., Bell, E.L., Courtney, K., Liu, H., Choo-Wing, R., Bellinger, G., Tsukazawa, K.S., Brown, V., *et al.* (2013). Identification of CDCP1 as a hypoxia-inducible factor 2alpha (HIF-2alpha) target gene that is associated with survival in clear cell renal cell carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 3483-3488.

Fabre, E., Spano, J.P., Atlan, D., Braud, A.C., Mitry, E., Panis, Y., and Faivre, J. (2000). [Cancer of the colon: an update]. *Bulletin du cancer Suppl* *4*, 5-20.

Fan, W., Tang, Z., Yin, L., Morrison, B., Hafez-Khayyata, S., Fu, P., Huang, H., Bagai, R., Jiang, S., Kresak, A., *et al.* (2011). MET-independent lung cancer cells evading EGFR kinase inhibitors are therapeutically susceptible to BH3 mimetic agents. *Cancer research* *71*, 4494-4505.

Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D.P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Hacker, G., and Leverkus, M. (2011). cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Molecular cell* *43*, 449-463.

Fischer, U., Stroh, C., and Schulze-Osthoff, K. (2006). Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene* *25*, 152-159.

Fizazi, K. (2007). The role of Src in prostate cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* *18*, 1765-1773.

Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Developmental cell* *1*, 515-525.

Frisch, S.M. (1999). Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain-containing proteins in anoikis. *Current biology : CB* *9*, 1047-1049.

- Frisch, S.M., and Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of cell biology* *124*, 619-626.
- Frisch, S.M., Schaller, M., and Cieply, B. (2013). Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis. *Journal of cell science* *126*, 21-29.
- Frisch, S.M., and Screaton, R.A. (2001). Anoikis mechanisms. *Current opinion in cell biology* *13*, 555-562.
- Fujita, J., Yoshida, O., Ebi, Y., Nakayama, H., Onoue, H., Rhim, J.S., and Kitamura, Y. (1988). Detection of ras oncogenes by analysis of p21 proteins in human tumor cell lines. *Urological research* *16*, 415-418.
- Fukazawa, H., Noguchi, K., Masumi, A., Murakami, Y., and Uehara, Y. (2004). BimEL is an important determinant for induction of anoikis sensitivity by mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitors. *Molecular cancer therapeutics* *3*, 1281-1288.
- Fukuchi, K., Steiniger, S.C., Deryugina, E., Liu, Y., Lowery, C.A., Gloeckner, C., Zhou, B., Kaufmann, G.F., Quigley, J.P., and Janda, K.D. (2010). Inhibition of tumor metastasis: functional immune modulation of the CUB domain containing protein 1. *Molecular pharmaceutics* *7*, 245-253.
- Fung, C., Lock, R., Gao, S., Salas, E., and Debnath, J. (2008). Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Molecular biology of the cell* *19*, 797-806.
- Gagos, S., Hopwood, V.L., Iliopoulos, D., Kostakis, A., Karayannakos, P., Yatzides, H., Skalkeas, G.D., and Pathak, S. (1995). Chromosomal markers associated with metastasis in two colon cancer cell lines established from the same patient. *Anticancer research* *15*, 369-378.
- Garcia-Saez, A.J., Fuertes, G., Suckale, J., and Salgado, J. (2010). Permeabilization of the outer mitochondrial membrane by Bcl-2 proteins. *Advances in experimental medicine and biology* *677*, 91-105.
- Geiger, T.R., and Peeper, D.S. (2009). Metastasis mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* *1796*, 293-308.
- Geserick, P., Drewniok, C., Hupe, M., Haas, T.L., Diessenbacher, P., Sprick, M.R., Schon, M.P., Henkler, F., Gollnick, H., Walczak, H., and Leverkus, M. (2008). Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to TRAIL- and CD95L-mediated apoptosis. *Oncogene* *27*, 3211-3220.
- Giancotti, F.G. (2007). Targeting integrin beta4 for cancer and anti-angiogenic therapy. *Trends in pharmacological sciences* *28*, 506-511.
- Giannoni, E., Buricchi, F., Grimaldi, G., Parri, M., Cialdai, F., Taddei, M.L., Raugei, G., Ramponi, G., and Chiarugi, P. (2008). Redox regulation of anoikis: reactive oxygen species as essential mediators of cell survival. *Cell death and differentiation* *15*, 867-878.
- Giannoni, E., Fiaschi, T., Ramponi, G., and Chiarugi, P. (2009). Redox regulation of anoikis resistance of metastatic prostate cancer cells: key role for Src and EGFR-mediated pro-survival signals. *Oncogene* *28*, 2074-2086.
- Gilmore, A.P. (2005). Anoikis. *Cell death and differentiation* *12 Suppl 2*, 1473-1477.
- Gilmore, A.P., Metcalfe, A.D., Romer, L.H., and Streuli, C.H. (2000). Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *The Journal of cell biology* *149*, 431-446.

- Goldsmith, K.C., Gross, M., Peirce, S., Luyindula, D., Liu, X., Vu, A., Sliozberg, M., Guo, R., Zhao, H., Reynolds, C.P., and Hogarty, M.D. (2012). Mitochondrial Bcl-2 family dynamics define therapy response and resistance in neuroblastoma. *Cancer research* *72*, 2565-2577.
- Gomez-Bougie, P., Wulleme-Toumi, S., Menoret, E., Trichet, V., Robillard, N., Philippe, M., Bataille, R., and Amiot, M. (2007). Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer research* *67*, 5418-5424.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* *305*, 626-629.
- Green, K.J., Getsios, S., Troyanovsky, S., and Godsel, L.M. (2010). Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *2*, a000125.
- Grimm, S., and Brdiczka, D. (2007). The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* *12*, 841-855.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., and et al. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* *66*, 589-600.
- Gross, A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development* *13*, 1899-1911.
- Grossmann, J. (2002). Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* *7*, 247-260.
- Guo, W., Pylayeva, Y., Pepe, A., Yoshioka, T., Muller, W.J., Inghirami, G., and Giancotti, F.G. (2006). Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* *126*, 489-502.
- Gusenbauer, S., Vlaicu, P., and Ullrich, A. (2012). HGF induces novel EGFR functions involved in resistance formation to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*.
- Gyrd-Hansen, M., and Meier, P. (2010). IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nature reviews. Cancer* *10*, 561-574.
- Haigis, K.M., Kendall, K.R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M.C., Glickman, J.N., Niwa-Kawakita, M., Sweet-Cordero, A., Sebolt-Leopold, J., Shannon, K.M., et al. (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature genetics* *40*, 600-608.
- Haldar, S., Chintapalli, J., and Croce, C.M. (1996). Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer research* *56*, 1253-1255.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hanks, S.K., Ryzhova, L., Shin, N.Y., and Brabek, J. (2003). Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* *8*, d982-996.
- Hann, C.L., Daniel, V.C., Sugar, E.A., Dobromilskaya, I., Murphy, S.C., Cope, L., Lin, X., Hierman, J.S., Wilburn, D.L., Watkins, D.N., and Rudin, C.M. (2008). Therapeutic efficacy of ABT-737, a selective inhibitor of BCL-2, in small cell lung cancer. *Cancer research* *68*, 2321-2328.

- Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., and Taketo, M.M. (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *The EMBO journal* 18, 5931-5942.
- Hausmann, M., Leucht, K., Ploner, C., Kiessling, S., Villunger, A., Becker, H., Hofmann, C., Falk, W., Krebs, M., Kellermeier, S., *et al.* (2011). BCL-2 modifying factor (BMF) is a central regulator of anoikis in human intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 286, 26533-26540.
- He, Y., Wortmann, A., Burke, L.J., Reid, J.C., Adams, M.N., Abdul-Jabbar, I., Quigley, J.P., Leduc, R., Kirchhofer, D., and Hooper, J.D. (2010). Proteolysis-induced N-terminal ectodomain shedding of the integral membrane glycoprotein CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) is accompanied by tyrosine phosphorylation of its C-terminal domain and recruitment of Src and PKCdelta. *The Journal of biological chemistry* 285, 26162-26173.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Herrant, M., Jacquet, A., Marchetti, S., Belhacene, N., Colosetti, P., Luciano, F., and Auberger, P. (2004). Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene* 23, 7863-7873.
- Hewitt, R.E., McMarlin, A., Kleiner, D., Wersto, R., Martin, P., Tsokos, M., Stamp, G.W., and Stetler-Stevenson, W.G. (2000). Validation of a model of colon cancer progression. *The Journal of pathology* 192, 446-454.
- High, L.M., Szymanska, B., Wilczynska-Kalak, U., Barber, N., O'Brien, R., Khaw, S.L., Vikstrom, I.B., Roberts, A.W., and Lock, R.B. (2010). The Bcl-2 homology domain 3 mimetic ABT-737 targets the apoptotic machinery in acute lymphoblastic leukemia resulting in synergistic in vitro and in vivo interactions with established drugs. *Molecular pharmacology* 77, 483-494.
- Hikita, H., Takehara, T., Shimizu, S., Kodama, T., Shigekawa, M., Iwase, K., Hosui, A., Miyagi, T., Tatsumi, T., Ishida, H., *et al.* (2010). The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology* 52, 1310-1321.
- Ho, L.H., Taylor, R., Dorstyn, L., Cakouros, D., Bouillet, P., and Kumar, S. (2009). A tumor suppressor function for caspase-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5336-5341.
- Hofmann, C., Obermeier, F., Artinger, M., Hausmann, M., Falk, W., Schoelmerich, J., Rogler, G., and Grossmann, J. (2007). Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 132, 587-600.
- Hooper, J.D., Zijlstra, A., Aimes, R.T., Liang, H., Claassen, G.F., Tarin, D., Testa, J.E., and Quigley, J.P. (2003). Subtractive immunization using highly metastatic human tumor cells identifies SIMA135/CDCP1, a 135 kDa cell surface phosphorylated glycoprotein antigen. *Oncogene* 22, 1783-1794.
- Horvitz, H.R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer research* 59, 1701s-1706s.
- Howard, E.W., Leung, S.C., Yuen, H.F., Chua, C.W., Lee, D.T., Chan, K.W., Wang, X., and Wong, Y.C. (2008). Decreased adhesiveness, resistance to anoikis and suppression of GRP94 are integral to the survival of circulating tumor cells in prostate cancer. *Clinical & experimental metastasis* 25, 497-508.

- Howe, J.R., Roth, S., Ringold, J.C., Summers, R.W., Jarvinen, H.J., Sistonen, P., Tomlinson, I.P., Houlston, R.S., Bevan, S., Mitros, F.A., *et al.* (1998). Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 280, 1086-1088.
- Huber, M.A., Azoitei, N., Baumann, B., Grunert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., and Wirth, T. (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *The Journal of clinical investigation* 114, 569-581.
- Ikeda, J., Oda, T., Inoue, M., Uekita, T., Sakai, R., Okumura, M., Aozasa, K., and Morii, E. (2009). Expression of CUB domain containing protein (CDCP1) is correlated with prognosis and survival of patients with adenocarcinoma of lung. *Cancer science* 100, 429-433.
- Ikeda, J.I., Morii, E., Kimura, H., Tomita, Y., Takakuwa, T., Hasegawa, J.I., Kim, Y.K., Miyoshi, Y., Noguchi, S., Nishida, T., and Aozasa, K. (2006). Epigenetic regulation of the expression of the novel stem cell marker CDCP1 in cancer cells. *The Journal of pathology* 210, 75-84.
- Ilic, D., Almeida, E.A., Schlaepfer, D.D., Dazin, P., Aizawa, S., and Damsky, C.H. (1998). Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *The Journal of cell biology* 143, 547-560.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of deathreceptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Ishikawa, Y., Kusaka, E., Enokido, Y., Ikeuchi, T., and Hatanaka, H. (2003). Regulation of Bax translocation through phosphorylation at Ser-70 of Bcl-2 by MAP kinase in NO-induced neuronal apoptosis. *Molecular and cellular neurosciences* 24, 451-459.
- Ito, T., Deng, X., Carr, B., and May, W.S. (1997). Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *The Journal of biological chemistry* 272, 11671-11673.
- Janes, S.M., and Watt, F.M. (2004). Switch from alphavbeta5 to alphavbeta6 integrin expression protects squamous cell carcinomas from anoikis. *The Journal of cell biology* 166, 419-431.
- Janssen, K.P., Alberici, P., Fsihi, H., Gaspar, C., Breukel, C., Franken, P., Rosty, C., Abal, M., El Marjou, F., Smits, R., *et al.* (2006). APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology* 131, 1096-1109.
- Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J.C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4997-5002.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119, 1420-1428.
- Kanayama, S., Yamada, Y., Kawaguchi, R., Tsuji, Y., Haruta, S., and Kobayashi, H. (2008). Hepatocyte growth factor induces anoikis resistance by up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in uterine endometrial cancer cells. *Oncology reports* 19, 117-122.
- Kantak, S.S., and Kramer, R.H. (1998). E-cadherin regulates anchorage-independent growth and survival in oral squamous cell carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* 273, 16953-16961.
- Karin, M., and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature immunology* 3, 221-227.

- Katsumi, A., Orr, A.W., Tzima, E., and Schwartz, M.A. (2004). Integrins in mechanotransduction. *The Journal of biological chemistry* 279, 12001-12004.
- Kazi, A., Sun, J., Doi, K., Sung, S.S., Takahashi, Y., Yin, H., Rodriguez, J.M., Becerril, J., Berndt, N., Hamilton, A.D., *et al.* (2011). The BH3 alpha-helical mimic BH3-M6 disrupts Bcl-X(L), Bcl-2, and MCL-1 protein-protein interactions with Bax, Bak, Bad, or Bim and induces apoptosis in a Bax- and Bim-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 286, 9382-9392.
- Keith, B., Johnson, R.S., and Simon, M.C. (2012). HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews. Cancer* 12, 9-22.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.
- Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., Pandey, P., Kaneki, M., Wang, Q., Cheng, K., Chen, Y.N., Campbell, A., Sudha, T., *et al.* (2000). Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* 275, 322-327.
- Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, P., Wennstrom, S., Warne, P.H., and Downward, J. (1997). Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *The EMBO journal* 16, 2783-2793.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.L. (2011a). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* 13, 132-141.
- Kim, W., Kook, S., Kim, D.J., Teodorof, C., and Song, W.K. (2004). The 31-kDa caspase-generated cleavage product of p130cas functions as a transcriptional repressor of E2A in apoptotic cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 8333-8342.
- Kim, W.Y., Lee, S.Y., Jung, Y.J., Chae, H.B., Nawkar, G.M., Shin, M.R., Kim, S.Y., Park, J.H., Kang, C.H., Chi, Y.H., *et al.* (2011b). Inhibitor of apoptosis (IAP)-like protein lacks a baculovirus IAP repeat (BIR) domain and attenuates cell death in plant and animal systems. *The Journal of biological chemistry* 286, 42670-42678.
- Kimura, H., Morii, E., Ikeda, J.I., Ezoe, S., Xu, J.X., Nakamichi, N., Tomita, Y., Shibayama, H., Kanakura, Y., and Aozasa, K. (2006). Role of DNA methylation for expression of novel stem cell marker CDCP1 in hematopoietic cells. *Leukemia* 20, 1551-1556.
- Kinnally, K.W., and Antonsson, B. (2007). A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 12, 857-868.
- Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Vogelstein, B., Bryan, T.M., Levy, D.B., Smith, K.J., Preisinger, A.C., Hamilton, S.R., Hedge, P., Markham, A., and *et al.* (1991). Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 251, 1366-1370.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.
- Kobayashi, S., Lee, S.H., Meng, X.W., Mott, J.L., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Craig, R.W., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (2007). Serine 64 phosphorylation enhances the antiapoptotic function of Mcl-1. *The Journal of biological chemistry* 282, 18407-18417.
- Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P.P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y.X., Sneed, T., *et al.* (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer cell* 10, 375-388.

- Kops, G.J., and Burgering, B.M. (2000). Forkhead transcription factors are targets of signalling by the proto-oncogene PKB (C-AKT). *Journal of anatomy* *197 Pt 4*, 571-574.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* *275*, 1784-1787.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., and Reed, J.C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer research* *53*, 4701-4714.
- Kroemer, G., Zamzami, N., and Susin, S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology today* *18*, 44-51.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular cell* *17*, 525-535.
- Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* *111*, 331-342.
- Laguinje, L.M., Samara, R.N., Wang, W., El-Deiry, W.S., Corner, G., Augenlicht, L., Mishra, L., and Jessup, J.M. (2008). DR5 receptor mediates anoikis in human colorectal carcinoma cell lines. *Cancer research* *68*, 909-917.
- Le, Q.T., Denko, N.C., and Giaccia, A.J. (2004). Hypoxic gene expression and metastasis. *Cancer metastasis reviews* *23*, 293-310.
- Leber, B., Lin, J., and Andrews, D.W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene* *29*, 5221-5230.
- Lei, K., and Davis, R.J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 2432-2437.
- Leibovitz, A., Stinson, J.C., McCombs, W.B., 3rd, McCoy, C.E., Mazur, K.C., and Mabry, N.D. (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer research* *36*, 4562-4569.
- Lessene, G., Czabotar, P.E., and Colman, P.M. (2008). BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery* *7*, 989-1000.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer cell* *2*, 183-192.
- Letai, A.G. (2008). Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nature reviews. Cancer* *8*, 121-132.
- Ley, R., Balmanno, K., Hadfield, K., Weston, C., and Cook, S.J. (2003). Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *The Journal of biological chemistry* *278*, 18811-18816.
- Ley, R., Ewings, K.E., Hadfield, K., and Cook, S.J. (2005). Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell death and differentiation* *12*, 1008-1014.

- Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2001a). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer research* *61*, 3819-3825.
- Li, G., Satyamoorthy, K., Meier, F., Berking, C., Bogenrieder, T., and Herlyn, M. (2003). Function and regulation of melanoma-stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil. *Oncogene* *22*, 3162-3171.
- Li, G.M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell research* *18*, 85-98.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* *94*, 491-501.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001b). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* *412*, 95-99.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479-489.
- Li, W., Zhang, X., and Olumi, A.F. (2007). MG-132 sensitizes TRAIL-resistant prostate cancer cells by activating c-Fos/c-Jun heterodimers and repressing c-FLIP(L). *Cancer research* *67*, 2247-2255.
- Lin, B., Kolluri, S.K., Lin, F., Liu, W., Han, Y.H., Cao, X., Dawson, M.I., Reed, J.C., and Zhang, X.K. (2004). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* *116*, 527-540.
- Lin, S.S., Bassik, M.C., Suh, H., Nishino, M., Arroyo, J.D., Hahn, W.C., Korsmeyer, S.J., and Roberts, T.M. (2006). PP2A regulates BCL-2 phosphorylation and proteasome-mediated degradation at the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* *281*, 23003-23012.
- Liu, H., Ong, S.E., Badu-Nkansah, K., Schindler, J., White, F.M., and Hynes, R.O. (2011). CUB-domain-containing protein 1 (CDCP1) activates Src to promote melanoma metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 1379-1384.
- Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, R.S., Taniguchi, K., Krishnadath, K.K., Halling, K.C., Cunningham, J.M., Boardman, L.A., Qian, C., *et al.* (2000). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nature genetics* *26*, 146-147.
- Liu, Z., Li, H., Wu, X., Yoo, B.H., Yan, S.R., Stadnyk, A.W., Sasazuki, T., Shirasawa, S., LaCasse, E.C., Korneluk, R.G., and Rosen, K.V. (2006). Detachment-induced upregulation of XIAP and cIAP2 delays anoikis of intestinal epithelial cells. *Oncogene* *25*, 7680-7690.
- Loeb, L.A. (1991). Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer research* *51*, 3075-3079.
- Lozupone, F., Lugini, L., Matarrese, P., Luciani, F., Federici, C., Iessi, E., Margutti, P., Stassi, G., Malorni, W., and Fais, S. (2004). Identification and relevance of the CD95-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *The Journal of biological chemistry* *279*, 9199-9207.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* *94*, 481-490.
- Lynch, H.T., and Lynch, J.F. (1998). Genetics of colonic cancer. *Digestion* *59*, 481-492.

- Mackey, A.M., Sanvicens, N., Groeger, G., Doonan, F., Wallace, D., and Cotter, T.G. (2008). Redox survival signalling in retina-derived 661W cells. *Cell death and differentiation* 15, 1291-1303.
- Mamat, S., Ikeda, J., Enomoto, T., Ueda, Y., Rahadiani, N., Tian, T., Wang, Y., Qiu, Y., Kimura, T., Aozasa, K., and Morii, E. (2010). Prognostic significance of CUB domain containing protein expression in endometrioid adenocarcinoma. *Oncology reports* 23, 1221-1227.
- Mariotti, A., Kedeshian, P.A., Dans, M., Curatola, A.M., Gagnoux-Palacios, L., and Giancotti, F.G. (2001). EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin alpha6beta4 at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. *The Journal of cell biology* 155, 447-458.
- Martinou, J.C., and Green, D.R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 63-67.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., and Kroemer, G. (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281, 2027-2031.
- Matsuoka, H., Okada, M., Ishii, N., and Maeda, S. (1998). Study of the effects of disperse in the chemotherapy of multicellular tumour spheroids of small-cell lung carcinoma in man. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 50, 285-290.
- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A.S., Dejardin, E., and Green, D.R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Molecular cell* 21, 749-760.
- Mawji, I.A., Simpson, C.D., Hurren, R., Gronda, M., Williams, M.A., Filmus, J., Jonkman, J., Da Costa, R.S., Wilson, B.C., Thomas, M.P., *et al.* (2007). Critical role for Fas-associated death domain-like interleukin-1-converting enzyme-like inhibitory protein in anoikis resistance and distant tumor formation. *Journal of the National Cancer Institute* 99, 811-822.
- May, W.S., Jr. (1997). Control of apoptosis by cytokines. *Adv Pharmacol* 41, 219-246.
- McCoy, F., Hurwitz, J., McTavish, N., Paul, I., Barnes, C., O'Hagan, B., Odrzywol, K., Murray, J., Longley, D., McKerr, G., and Fennell, D.A. (2010). Obatoclox induces Atg7-dependent autophagy independent of beclin-1 and BAX/BAK. *Cell death & disease* 1, e108.
- Menoret, E., Gomez-Bougie, P., Surget, S., Trichet, V., Oliver, L., Pellat-Deceunynck, C., and Amiot, M. (2010). Mcl-1(128-350) fragment induces apoptosis through direct interaction with Bax. *FEBS letters* 584, 487-492.
- Mercurio, A.M., and Rabinovitz, I. (2001). Towards a mechanistic understanding of tumor invasion--lessons from the alpha6beta 4 integrin. *Seminars in cancer biology* 11, 129-141.
- Mercurio, A.M., Rabinovitz, I., and Shaw, L.M. (2001). The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration. *Current opinion in cell biology* 13, 541-545.
- Meredith, J.E., Jr., Fazeli, B., and Schwartz, M.A. (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. *Molecular biology of the cell* 4, 953-961.
- Merino, D., Giam, M., Hughes, P.D., Siggs, O.M., Heger, K., O'Reilly, L.A., Adams, J.M., Strasser, A., Lee, E.F., Fairlie, W.D., and Bouillet, P. (2009). The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *The Journal of cell biology* 186, 355-362.

- Mezzanzanica, D., Balladore, E., Turatti, F., Luison, E., Alberti, P., Bagnoli, M., Figini, M., Mazzoni, A., Raspagliesi, F., Oggionni, M., *et al.* (2004). CD95-mediated apoptosis is impaired at receptor level by cellular FLICE-inhibitory protein (long form) in wild-type p53 human ovarian carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *10*, 5202-5214.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* *114*, 181-190.
- Miller, L.K. (1999). An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends in cell biology* *9*, 323-328.
- Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E.A., and Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* *75*, 653-660.
- Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell* *80*, 293-299.
- Miyazawa, Y., Uekita, T., Hiraoka, N., Fujii, S., Kosuge, T., Kanai, Y., Nojima, Y., and Sakai, R. (2010). CUB domain-containing protein 1, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation. *Cancer research* *70*, 5136-5146.
- Morel, C., Carlson, S.M., White, F.M., and Davis, R.J. (2009). Mcl-1 integrates the opposing actions of signaling pathways that mediate survival and apoptosis. *Molecular and cellular biology* *29*, 3845-3852.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* *275*, 1787-1790.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., *et al.* (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* *381*, 335-341.
- Mukhopadhyay, D., Tsiokas, L., Zhou, X.M., Foster, D., Brugge, J.S., and Sukhatme, V.P. (1995). Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* *375*, 577-581.
- Murphy, K.M., Ranganathan, V., Farnsworth, M.L., Kavallaris, M., and Lock, R.B. (2000). Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell death and differentiation* *7*, 102-111.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., *et al.* (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* *85*, 817-827.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *The Journal of biological chemistry* *273*, 2926-2930.
- Nagase, H., and Nakamura, Y. (1993). Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Human mutation* *2*, 425-434.
- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell* *7*, 683-694.

- Nawshad, A., Lagamba, D., Polad, A., and Hay, E.D. (2005). Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells, tissues, organs* 179, 11-23.
- Nesbit, M., Nesbit, H.K., Bennett, J., Andl, T., Hsu, M.Y., Dejesus, E., McBrian, M., Gupta, A.R., Eck, S.L., and Herlyn, M. (1999). Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes. *Oncogene* 18, 6469-6476.
- Ni Chonghaile, T., and Letai, A. (2008). Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene* 27 *Suppl 1*, S149-157.
- Nikolopoulos, S.N., Blaikie, P., Yoshioka, T., Guo, W., and Giancotti, F.G. (2004). Integrin beta4 signaling promotes tumor angiogenesis. *Cancer cell* 6, 471-483.
- Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R., and Sikorska, M. (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *The EMBO journal* 12, 3679-3684.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.
- Oikonomou, E., and Pintzas, A. (2006). Cancer genetics of sporadic colorectal cancer: BRAF and PI3KCA mutations, their impact on signaling and novel targeted therapies. *Anticancer research* 26, 1077-1084.
- Olberding, K.E., Wang, X., Zhu, Y., Pan, J., Rai, S.N., and Li, C. (2010). Actinomycin D synergistically enhances the efficacy of the BH3 mimetic ABT-737 by downregulating Mcl-1 expression. *Cancer biology & therapy* 10, 918-929.
- Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., *et al.* (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435, 677-681.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.
- Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., and Weinberg, R.A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer research* 68, 3645-3654.
- Park, J.J., Jin, Y.B., Lee, Y.J., Lee, J.S., Lee, Y.S., Ko, Y.G., and Lee, M. (2012). KAI1 suppresses HIF-1alpha and VEGF expression by blocking CDCP1-enhanced Src activation in prostate cancer. *BMC cancer* 12, 81.
- Paterson, E.L., Kazenwadel, J., Bert, A.G., Khew-Goodall, Y., Ruszkiewicz, A., and Goodall, G.J. (2013). Down-regulation of the miRNA-200 family at the invasive front of colorectal cancers with degraded basement membrane indicates EMT is involved in cancer progression. *Neoplasia* 15, 180-191.
- Pawlak, G., and Helfman, D.M. (2001). Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Current opinion in genetics & development* 11, 41-47.
- Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Delcommenne, M., Troussard, A., Sanghera, J., and Dedhar, S. (2000). Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and

induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3207-3212.

Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes & development* 17, 1709-1713.

Playford, M.P., and Schaller, M.D. (2004). The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 23, 7928-7946.

Pommier, Y., and Kohn, K.W. (2003). [Cell cycle and checkpoints in oncology: new therapeutic targets]. *Medecine sciences : M/S* 19, 173-186.

Portier, B.P., and Taglialatela, G. (2006). Bcl-2 localized at the nuclear compartment induces apoptosis after transient overexpression. *The Journal of biological chemistry* 281, 40493-40502.

Pullan, S., Wilson, J., Metcalfe, A., Edwards, G.M., Goberdhan, N., Tilly, J., Hickman, J.A., Dive, C., and Streuli, C.H. (1996). Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *Journal of cell science* 109 ( Pt 3), 631-642.

Putchu, G.V., Moulder, K.L., Golden, J.P., Bouillet, P., Adams, J.A., Strasser, A., and Johnson, E.M. (2001). Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron* 29, 615-628.

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

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

Rahmani, M., Aust, M.M., Attkisson, E., Williams, D.C., Jr., Ferreira-Gonzalez, A., and Grant, S. (2013). Dual inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL strikingly enhances PI3K inhibition-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a GSK3- and Bim-dependent mechanism. *Cancer research* 73, 1340-1351.

Razorenova, O.V., Finger, E.C., Colavitti, R., Chernikova, S.B., Boiko, A.D., Chan, C.K., Krieg, A., Bedogni, B., LaGory, E., Weissman, I.L., *et al.* (2011). VHL loss in renal cell carcinoma leads to up-regulation of CUB domain-containing protein 1 to stimulate PKC $\{\delta\}$ -driven migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 1931-1936.

Reginato, M.J., Mills, K.R., Paulus, J.K., Lynch, D.K., Sgroi, D.C., Debnath, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. (2003). Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nature cell biology* 5, 733-740.

Riedl, S.J., Fuentes-Prior, P., Renatus, M., Kairies, N., Krapp, S., Huber, R., Salvesen, G.S., and Bode, W. (2001). Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14790-14795.

Roberts, A.W., Seymour, J.F., Brown, J.R., Wierda, W.G., Kipps, T.J., Khaw, S.L., Carney, D.A., He, S.Z., Huang, D.C., Xiong, H., *et al.* (2012). Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30, 488-496.

- Robertson, A.M., Bird, C.C., Waddell, A.W., and Currie, A.R. (1978). Morphological aspects of glucocorticoid-induced cell death in human lymphoblastoid cells. *The Journal of pathology* *126*, 181-187.
- Rogers, K.M., Thomas, M., Galligan, L., Wilson, T.R., Allen, W.L., Sakai, H., Johnston, P.G., and Longley, D.B. (2007). Cellular FLICE-inhibitory protein regulates chemotherapy-induced apoptosis in breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* *6*, 1544-1551.
- Romashkova, J.A., and Makarov, S.S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* *401*, 86-90.
- Rosen, K., Coll, M.L., Li, A., and Filmus, J. (2001). Transforming growth factor-alpha prevents detachment-induced inhibition of c-Src kinase activity, Bcl-XL down-regulation, and apoptosis of intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* *276*, 37273-37279.
- Rosen, K., Rak, J., Leung, T., Dean, N.M., Kerbel, R.S., and Filmus, J. (2000). Activated Ras prevents downregulation of Bcl-X(L) triggered by detachment from the extracellular matrix. A mechanism of Ras-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *The Journal of cell biology* *149*, 447-456.
- Rosen, K., Shi, W., Calabretta, B., and Filmus, J. (2002). Cell detachment triggers p38 mitogen-activated protein kinase-dependent overexpression of Fas ligand. A novel mechanism of Anoikis of intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* *277*, 46123-46130.
- Rudin, C.M., Hann, C.L., Garon, E.B., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P.D., Camidge, D.R., Chu, Q., Giaccone, G., Khaira, D., Ramalingam, S.S., *et al.* (2012). Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *18*, 3163-3169.
- Ruvolo, P.P., Deng, X., Carr, B.K., and May, W.S. (1998). A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* *273*, 25436-25442.
- Rytomaa, M., Martins, L.M., and Downward, J. (1999). Involvement of FADD and caspase-8 signalling in detachment-induced apoptosis. *Current biology : CB* *9*, 1043-1046.
- Sakamoto, S., and Kyprianou, N. (2010). Targeting anoikis resistance in prostate cancer metastasis. *Molecular aspects of medicine* *31*, 205-214.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal* *17*, 1675-1687.
- Schendel, S.L., Montal, M., and Reed, J.C. (1998). Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell death and differentiation* *5*, 372-380.
- Scherl-Mostageer, M., Sommergruber, W., Abseher, R., Hauptmann, R., Ambros, P., and Schweifer, N. (2001). Identification of a novel gene, CDCP1, overexpressed in human colorectal cancer. *Oncogene* *20*, 4402-4408.
- Schlesinger, P.H., Gross, A., Yin, X.M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G., and Korsmeyer, S.J. (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 11357-11362.

- Schmelzle, T., Mailleux, A.A., Overholtzer, M., Carroll, J.S., Solimini, N.L., Lightcap, E.S., Veiby, O.P., and Brugge, J.S. (2007). Functional role and oncogene-regulated expression of the BH3-only factor Bmf in mammary epithelial anoikis and morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 3787-3792.
- Schmitt, E., Beauchemin, M., and Bertrand, R. (2007). Nuclear colocalization and interaction between bcl-xL and cdk1(cdc2) during G2/M cell-cycle checkpoint. *Oncogene* *26*, 5851-5865.
- Sclabas, G.M., Fujioka, S., Schmidt, C., Li, Z., Frederick, W.A., Yang, W., Yokoi, K., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Hess, K.R., *et al.* (2005). Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *11*, 440-449.
- Shanmugathan, M., and Jothy, S. (2000). Apoptosis, anoikis and their relevance to the pathobiology of colon cancer. *Pathology international* *50*, 273-279.
- Shim, S.R., Kook, S., Kim, J.I., and Song, W.K. (2001). Degradation of focal adhesion proteins paxillin and p130cas by caspases or calpains in apoptotic rat-1 and L929 cells. *Biochemical and biophysical research communications* *286*, 601-608.
- Shoemaker, A.R., Mitten, M.J., Adickes, J., Ackler, S., Refici, M., Ferguson, D., Oleksijew, A., O'Connor, J.M., Wang, B., Frost, D.J., *et al.* (2008). Activity of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263 in a panel of small cell lung cancer xenograft models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *14*, 3268-3277.
- Shuker, S.B., Hajduk, P.J., Meadows, R.P., and Fesik, S.W. (1996). Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* *274*, 1531-1534.
- Simpson, C.D., Anyiwe, K., and Schimmer, A.D. (2008). Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer letters* *272*, 177-185.
- Siva, A.C., Wild, M.A., Kirkland, R.E., Nolan, M.J., Lin, B., Maruyama, T., Yantiri-Wernimont, F., Frederickson, S., Bowdish, K.S., and Xin, H. (2008). Targeting CUB domain-containing protein 1 with a monoclonal antibody inhibits metastasis in a prostate cancer model. *Cancer research* *68*, 3759-3766.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., *et al.* (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of cell biology* *144*, 281-292.
- Smith, G., Carey, F.A., Beattie, J., Wilkie, M.J., Lightfoot, T.J., Coxhead, J., Garner, R.C., Steele, R.J., and Wolf, C.R. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 9433-9438.
- Snowden, R.T., Sun, X.M., Dyer, M.J., and Cohen, G.M. (2003). Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in chronic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1. *Leukemia* *17*, 1981-1989.
- Sosic, D., Richardson, J.A., Yu, K., Ornitz, D.M., and Olson, E.N. (2003). Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity. *Cell* *112*, 169-180.

- Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., *et al.* (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature medicine* *19*, 202-208.
- Spassov, D.S., Baehner, F.L., Wong, C.H., McDonough, S., and Moasser, M.M. (2009). The transmembrane src substrate Trask is an epithelial protein that signals during anchorage deprivation. *The American journal of pathology* *174*, 1756-1765.
- Sreekumar, R., Sayan, B.S., Mirnezami, A.H., and Sayan, A.E. (2011). MicroRNA Control of Invasion and Metastasis Pathways. *Frontiers in genetics* *2*, 58.
- Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., and Alnemri, E.S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* *410*, 112-116.
- Stupack, D.G., Puente, X.S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C.M., and Cheresch, D.A. (2001). Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *The Journal of cell biology* *155*, 459-470.
- Summy, J.M., and Gallick, G.E. (2003). Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer metastasis reviews* *22*, 337-358.
- Sun, S., Ning, X., Zhang, Y., Lu, Y., Nie, Y., Han, S., Liu, L., Du, R., Xia, L., He, L., and Fan, D. (2009). Hypoxia-inducible factor-1alpha induces Twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition. *Kidney international* *75*, 1278-1287.
- Surawska, H., Ma, P.C., and Salgia, R. (2004). The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine & growth factor reviews* *15*, 419-433.
- Suzuki, S., Nakasato, M., Shibue, T., Koshima, I., and Taniguchi, T. (2009). Therapeutic potential of proapoptotic molecule Noxa in the selective elimination of tumor cells. *Cancer science* *100*, 759-769.
- Taddei, M.L., Giannoni, E., Fiaschi, T., and Chiarugi, P. (2012). Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *The Journal of pathology* *226*, 380-393.
- Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current opinion in cell biology* *7*, 619-627.
- Takeyama, Y., Sato, M., Horio, M., Hase, T., Yoshida, K., Yokoyama, T., Nakashima, H., Hashimoto, N., Sekido, Y., Gazdar, A.F., *et al.* (2010). Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells. *Cancer letters* *296*, 216-224.
- Talamonti, M.S., Roh, M.S., Curley, S.A., and Gallick, G.E. (1993). Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer. *The Journal of clinical investigation* *91*, 53-60.
- Ten Dijke, P., Goumans, M.J., Itoh, F., and Itoh, S. (2002). Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *Journal of cellular physiology* *191*, 1-16.
- Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K., and Meier, P. (2011). The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Molecular cell* *43*, 432-448.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews. Cancer* *2*, 442-454.

- Thomas, L.W., Lam, C., and Edwards, S.W. (2010). Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS letters* 584, 2981-2989.
- Thompson, E.W., Newgreen, D.F., and Tarin, D. (2005). Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer research* 65, 5991-5995; discussion 5995.
- Tinel, A., and Tschopp, J. (2004). The PIDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304, 843-846.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B., and Issa, J.P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 8681-8686.
- Tromp, J.M., Geest, C.R., Breij, E.C., Elias, J.A., van Laar, J., Luijks, D.M., Kater, A.P., Beaumont, T., van Oers, M.H., and Eldering, E. (2012). Tipping the Noxa/Mcl-1 balance overcomes ABT-737 resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 487-498.
- Tse, C., Shoemaker, A.R., Adickes, J., Anderson, M.G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E.F., Marsh, K.C., Mitten, M.J., Nimmer, P., *et al.* (2008). ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer research* 68, 3421-3428.
- Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. (1985a). The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 229, 1390-1393.
- Tsujimoto, Y., Jaffe, E., Cossman, J., Gorham, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1985b). Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature* 315, 340-343.
- Uekita, T., Jia, L., Narisawa-Saito, M., Yokota, J., Kiyono, T., and Sakai, R. (2007). CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma. *Molecular and cellular biology* 27, 7649-7660.
- Uekita, T., and Sakai, R. (2011). Roles of CUB domain-containing protein 1 signaling in cancer invasion and metastasis. *Cancer science* 102, 1943-1948.
- Uekita, T., Tanaka, M., Takigahira, M., Miyazawa, Y., Nakanishi, Y., Kanai, Y., Yanagihara, K., and Sakai, R. (2008). CUB-domain-containing protein 1 regulates peritoneal dissemination of gastric scirrhous carcinoma. *The American journal of pathology* 172, 1729-1739.
- Urtishak, K.A., Edwards, A.Y., Wang, L.S., Hudome, A., Robinson, B.W., Barrett, J.S., Cao, K., Cory, L., Moore, J.S., Bantly, A.D., *et al.* (2013). Potent obatoclax cytotoxicity and activation of triple death mode killing across infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 121, 2689-2703.
- Valentijn, A.J., and Gilmore, A.P. (2004). Translocation of full-length Bid to mitochondria during anoikis. *The Journal of biological chemistry* 279, 32848-32857.
- Valentijn, A.J., Metcalfe, A.D., Kott, J., Streuli, C.H., and Gilmore, A.P. (2003). Spatial and temporal changes in Bax subcellular localization during anoikis. *The Journal of cell biology* 162, 599-612.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., *et al.* (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-250.

- van Delft, M.F., Wei, A.H., Mason, K.D., Vandenberg, C.J., Chen, L., Czabotar, P.E., Willis, S.N., Scott, C.L., Day, C.L., Cory, S., *et al.* (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer cell* *10*, 389-399.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., and Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews. Molecular cell biology* *11*, 700-714.
- Vega, S., Morales, A.V., Ocana, O.H., Valdes, F., Fabregat, I., and Nieto, M.A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes & development* *18*, 1131-1143.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine* *319*, 525-532.
- Vogler, M., Weber, K., Dinsdale, D., Schmitz, I., Schulze-Osthoff, K., Dyer, M.J., and Cohen, G.M. (2009). Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell death and differentiation* *16*, 1030-1039.
- Walker, N.P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferez, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C., Hammill, L.D., and *et al.* (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell* *78*, 343-352.
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., and Reed, J.C. (1999). Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* *284*, 339-343.
- Wang, J., Chun, H.J., Wong, W., Spencer, D.M., and Lenardo, M.J. (2001). Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 13884-13888.
- Wang, J.L., Zhang, Z.J., Choksi, S., Shan, S., Lu, Z., Croce, C.M., Alnemri, E.S., Korngold, R., and Huang, Z. (2000). Cell permeable Bcl-2 binding peptides: a chemical approach to apoptosis induction in tumor cells. *Cancer research* *60*, 1498-1502.
- Wang, P., Gilmore, A.P., and Streuli, C.H. (2004). Bim is an apoptosis sensor that responds to loss of survival signals delivered by epidermal growth factor but not those provided by integrins. *The Journal of biological chemistry* *279*, 41280-41285.
- Wang, P., Valentijn, A.J., Gilmore, A.P., and Streuli, C.H. (2003). Early events in the anoikis program occur in the absence of caspase activation. *The Journal of biological chemistry* *278*, 19917-19925.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* *123*, 309-314.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* *292*, 727-730.
- Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., *et al.* (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature genetics* *38*, 787-793.
- Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Hohler, T., Galle, P.R., and Buchler, M.W. (2005). Colorectal cancer. *Lancet* *365*, 153-165.

- Widakowich, C., de Castro, G., Jr., de Azambuja, E., Dinh, P., and Awada, A. (2007). Review: side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. *The oncologist* *12*, 1443-1455.
- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes & development* *19*, 1294-1305.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., *et al.* (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* *315*, 856-859.
- Wilson, T.R., McLaughlin, K.M., McEwan, M., Sakai, H., Rogers, K.M., Redmond, K.M., Johnston, P.G., and Longley, D.B. (2007). c-FLIP: a key regulator of colorectal cancer cell death. *Cancer research* *67*, 5754-5762.
- Windham, T.C., Parikh, N.U., Siwak, D.R., Summy, J.M., McConkey, D.J., Kraker, A.J., and Gallick, G.E. (2002). Src activation regulates anoikis in human colon tumor cell lines. *Oncogene* *21*, 7797-7807.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of cell biology* *139*, 1281-1292.
- Wong, C.H., Baehner, F.L., Spassov, D.S., Ahuja, D., Wang, D., Hann, B., Blair, J., Shokat, K., Welm, A.L., and Moasser, M.M. (2009). Phosphorylation of the SRC epithelial substrate Trask is tightly regulated in normal epithelia but widespread in many human epithelial cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *15*, 2311-2322.
- Woodford-Richens, K.L., Rowan, A.J., Gorman, P., Halford, S., Bicknell, D.C., Wasan, H.S., Roylance, R.R., Bodmer, W.F., and Tomlinson, I.P. (2001). SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 9719-9723.
- Woods, N.T., Yamaguchi, H., Lee, F.Y., Bhalla, K.N., and Wang, H.G. (2007). Anoikis, initiated by Mcl-1 degradation and Bim induction, is deregulated during oncogenesis. *Cancer research* *67*, 10744-10752.
- Worthley, D.L., Whitehall, V.L., Spring, K.J., and Leggett, B.A. (2007). Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* *13*, 3784-3791.
- Wortmann, A., He, Y., Christensen, M.E., Linn, M., Lumley, J.W., Pollock, P.M., Waterhouse, N.J., and Hooper, J.D. (2011). Cellular settings mediating Src Substrate switching between focal adhesion kinase tyrosine 861 and CUB-domain-containing protein 1 (CDCP1) tyrosine 734. *The Journal of biological chemistry* *286*, 42303-42315.
- Wortmann, A., He, Y., Deryugina, E.I., Quigley, J.P., and Hooper, J.D. (2009). The cell surface glycoprotein CDCP1 in cancer--insights, opportunities, and challenges. *IUBMB life* *61*, 723-730.
- Xia, Y., Gil, S.G., and Carter, W.G. (1996). Anchorage mediated by integrin alpha6beta4 to laminin 5 (epiligrin) regulates tyrosine phosphorylation of a membrane-associated 80-kD protein. *The Journal of cell biology* *132*, 727-740.
- Xu, Y., and Pasche, B. (2007). TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Human molecular genetics* *16 Spec No 1*, R14-20.

- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.
- Yeatman, T.J. (2004). A renaissance for SRC. *Nature reviews. Cancer* 4, 470-480.
- Yecies, D., Carlson, N.E., Deng, J., and Letai, A. (2010). Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood* 115, 3304-3313.
- Yu, X., Liu, L., Cai, B., He, Y., and Wan, X. (2008). Suppression of anoikis by the neurotrophic receptor TrkB in human ovarian cancer. *Cancer science* 99, 543-552.
- Yu, X., Miyamoto, S., and Mekada, E. (2000). Integrin alpha 2 beta 1-dependent EGF receptor activation at cell-cell contact sites. *Journal of cell science* 113 ( Pt 12), 2139-2147.
- Zall, H., Weber, A., Besch, R., Zantl, N., and Hacker, G. (2010). Chemotherapeutic drugs sensitize human renal cell carcinoma cells to ABT-737 by a mechanism involving the Noxa-dependent inactivation of Mcl-1 or A1. *Molecular cancer* 9, 164.
- Zanotti, S., Gibertini, S., Bragato, C., Mantegazza, R., Morandi, L., and Mora, M. (2011). Fibroblasts from the muscles of Duchenne muscular dystrophy patients are resistant to cell detachment apoptosis. *Experimental cell research* 317, 2536-2547.
- Zeng, Q., Chen, S., You, Z., Yang, F., Carey, T.E., Saims, D., and Wang, C.Y. (2002). Hepatocyte growth factor inhibits anoikis in head and neck squamous cell carcinoma cells by activation of ERK and Akt signaling independent of NFkappa B. *The Journal of biological chemistry* 277, 25203-25208.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619-628.
- Zhan, F., Colla, S., Wu, X., Chen, B., Stewart, J.P., Kuehl, W.M., Barlogie, B., and Shaughnessy, J.D., Jr. (2007). CKS1B, overexpressed in aggressive disease, regulates multiple myeloma growth and survival through SKP2- and p27Kip1-dependent and -independent mechanisms. *Blood* 109, 4995-5001.
- Zhang, C., Cai, T.Y., Zhu, H., Yang, L.Q., Jiang, H., Dong, X.W., Hu, Y.Z., Lin, N.M., He, Q.J., and Yang, B. (2011). Synergistic antitumor activity of gemcitabine and ABT-737 in vitro and in vivo through disrupting the interaction of USP9X and Mcl-1. *Molecular cancer therapeutics* 10, 1264-1275.
- Zhang, W., Konopleva, M., Ruvolo, V.R., McQueen, T., Evans, R.L., Bornmann, W.G., McCubrey, J., Cortes, J., and Andreeff, M. (2008a). Sorafenib induces apoptosis of AML cells via Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Leukemia* 22, 808-818.
- Zhang, Y., Fujiwara, Y., Doki, Y., Takiguchi, S., Yasuda, T., Miyata, H., Yamazaki, M., Ngan, C.Y., Yamamoto, H., Ma, Q., and Monden, M. (2008b). Overexpression of tyrosine kinase B protein as a predictor for distant metastases and prognosis in gastric carcinoma. *Oncology* 75, 17-26.
- Zheng, L., Yang, W., Zhang, C., Ding, W.J., Zhu, H., Lin, N.M., Wu, H.H., He, Q.J., and Yang, B. (2011). GDC-0941 sensitizes breast cancer to ABT-737 in vitro and in vivo through promoting the degradation of Mcl-1. *Cancer letters* 309, 27-36.
- Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 121, 1085-1095.



---

# ANNEXE

---