



Les cellules apoptotiques vecteurs d'oncogènes viraux : Une voie alternative de la carcinogenèse associée aux HPV

Emilie Gaiffe

► To cite this version:

Emilie Gaiffe. Les cellules apoptotiques vecteurs d'oncogènes viraux : Une voie alternative de la carcinogenèse associée aux HPV. Médecine humaine et pathologie. Université de Franche-Comté, 2011. Français. NNT : 2011BESA3006 . tel-01227181

HAL Id: tel-01227181

<https://theses.hal.science/tel-01227181>

Submitted on 10 Nov 2015

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.

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
UFR SCIENCES MEDICALES ET PHARMACEUTIQUES DE BESANÇON
Année Universitaire 2010 – 2011

THESE

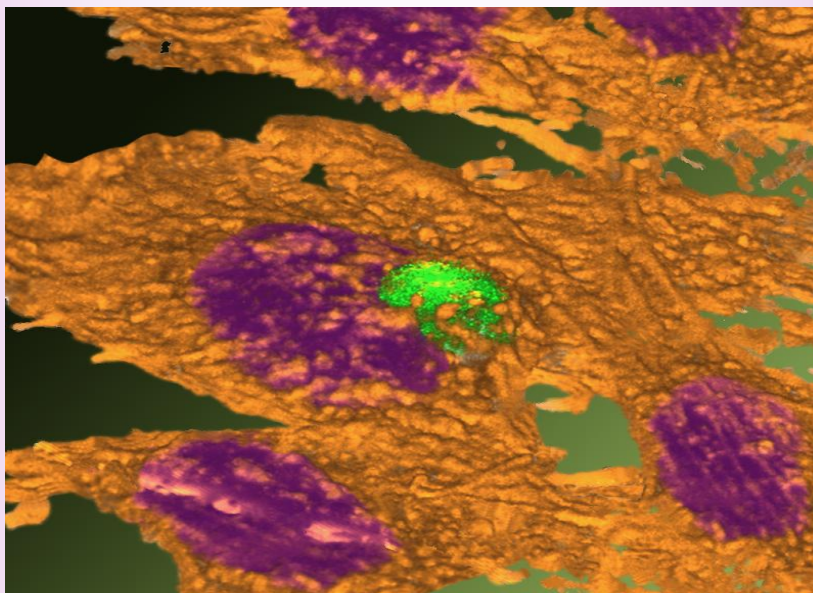
Pour l'obtention du diplôme
de Doctorat de l'Université de Franche-Comté
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

n° bibliothèque :

Présentée et soutenue publiquement le 11 Juillet 2011 par

Emilie Gaiffe

**Les cellules apoptotiques vecteurs d'oncogènes viraux :
Une voie alternative de la carcinogenèse associée aux HPV**



Sous la direction du Professeur Christiane MOUGIN

Composition du Jury :

Directeur de thèse :	Pr. Christiane MOUGIN	Université de Franche-Comté
Rapporteurs :	Pr. Pierre Formstecher	Université de Lille
	Dr. Nathalie Jacobs, chercheur qualifié	Université de Liège, Belgique
Examineurs :	Pr. Pierre OUDET	Université de Strasbourg
	Pr. Philippe Saas	Université de Franche-Comté
	Dr. Patrick SANDOZ, chargé de recherches CNRS	Université de Franche-Comté



THESE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° 25.11.05

Présentée par Madame, Monsieur, Emilie Goffe

Né(e) le 06 Décembre 1982

et ayant pour titre :

Les cellules apoptotiques vecteurs d'oncogènes viraux :
Une voie alternative de la carcinogénèse associée aux HPV

Vu et permis d'imprimer,

Besançon, le 10 2011

Le Directeur de Thèse,

Pour le Président et par délégation,
Le Directeur de l'UFR SMP,

E. SAMAIN



Rermerciements

Je tiens, en premier lieu, à remercier Monsieur le Professeur Pierre Formstecher, Directeur de l'équipe de recherche INSERM U837 et Président du Cancéropôle Nord-Ouest, et Madame le Docteur Nathalie Jacobs, Chercheur qualifié FNRS au département des Sciences Biomédicales et Précliniques dans le service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de l'Université de Liège, pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir jugé mon travail. Je leur suis très reconnaissante d'avoir porté un regard critique de spécialiste, chacun dans leur domaine, sur ce travail qui fait appel à des compétences transversales.

Toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Pierre Oudet, Chef de Service du Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire de l'Hôpital de Hautepierre et coordonnateur scientifique du Cancéropôle Grand-Est, qui a accepté d'examiner ce travail. Vous avez initié ce travail et m'avez fait l'honneur de le juger. Votre gentillesse et vos compétences sont un exemple. Soyez assuré de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Patrick Sandoz, Chargé de Recherches CNRS au département de Mécanique Appliquée à l'Institut FEMTO-ST de l'Université de Franche-Comté, qui nous a permis de développer une collaboration enrichissante scientifiquement et humainement. Vous m'avez fait l'honneur de juger ce travail, je vous exprime ma gratitude et ma considération.

A Monsieur le Professeur Philippe Saas, Directeur adjoint de l'équipe de recherche INSERM UMR 645 et Directeur du Département « Recherche et Formation » de l'Etablissement Français du Sang Bourgogne/Franche-Comté, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de mon respect.

Je remercie tout particulièrement Madame le Professeur Christiane Mougin, ma directrice de thèse, Praticien Hospitalier au CHU de Besançon et Directrice de l'EA3181 de l'Université de Franche-Comté, pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour son encadrement, ses conseils et son enthousiasme. Merci également à Monsieur le Docteur Jean-Luc Prétet, Praticien Hospitalier au CHU de Besançon et Maître de Conférences à l'Université de Franche-Comté, pour son encadrement et ses conseils. Je vous remercie tout deux pour m'avoir proposé ce sujet novateur et pour m'avoir laissé une autonomie importante, tout en étant présents au travers de nos enrichissantes discussions. Vous m'avez fait découvrir le transfert horizontal de gènes par votre expérience en Biologie Cellulaire et dans le domaine du cancer du col de l'utérus. Vous avez su m'encourager à communiquer, et enrichir mes connaissances. J'ai pu apprécier votre gentillesse et votre disponibilité, veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude. Enfin j'apprécie toujours de me replonger quatre ans en arrière et de revoir les différentes étapes franchies ensemble depuis le début de ma thèse.

Je remercie l'Université de Franche-Comté, l'école doctorale Homme, Environnement, Santé, le CIES de Lyon, le Cancéropôle et la Région Franche-Comté pour leur soutien financier et pour les formations qu'ils m'ont permis de réaliser.

Je tiens à remercier tous les seniors de l'équipe dont Madame le Docteur Isabelle Lascombe, Madame le Docteur Sylvie Fauconnet et Monsieur le Professeur Aubin pour leurs conseils lors des différentes réunions. Je remercie en particulier Monsieur le Professeur Laurent Bermont de m'avoir proposé un poste d'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche qui m'a permis de terminer cette thèse.

Je voudrais également exprimer toute ma sympathie au Docteur Frédéric Deschaseaux qui m'a donné le goût de la recherche et encouragée dans cette voie. Ma vie scientifique a commencé lors de mes stages de BTS dans votre équipe et s'est poursuivie en master. Je vous remercie particulièrement pour la formation technique que vous m'avez apportée.

Mes remerciements vont aux membres de l'EA3181 d'hier et d'aujourd'hui avec qui j'ai eu le plaisir de partager des moments de convivialité : Anne (la préparatrice de potion explosive), Elise (le padawoane PCR devenu expert), Fabienne et François les padawaones, Guillaume et Magalie (qui m'ont montré que même si on en bave on y arrive - valable pour JS aussi), Maelle (la directrice de colo, pro- de la PCR), Manue (la prochaine, allez courage) et Julie.

Je remercie aussi les membres du laboratoire de Biologie Cellulaire du CHU : Evelyne, Françoise, Laurence, Alice et tout particulièrement Sylvianne pour le temps passé sur mes lames d'HIS et Pascale, le maître zen aux nerfs d'acier.

Un très grand merci à tous les membres de l'IBCT (ancien et nouveaux). Vous m'avez accueillie au sein du bâtiment, et permis de travailler dans un climat amical et chaleureux. Alors un grand merci à (par ordre alphabétique pour qu'il n'y ait pas de jaloux) : Alphonsine, ambassadrice de l'autoclave ; Amandine, la future maman ; Amélie (la jeune bosseuse) ; Audrey (la vieille bosseuse) ; Baptiste, Tac en journée et Robin des bois en soirée ; Camille, la nouvelle suisse ; Chantal (et son monde) ; Damien, mon barbu du L2 cinéophile ; Dom, mon philosophe matinal, maître suprême des souris ; Francis le bosseur pour les pauses cigarettes techniques et ses grognements occasionnels (ou presque) ; Jean-René, mon Jason Statham d'un moment ; Jean-Seb, mon MSNeur ; Jérémie, le footballeur humoriste ; Jessy, la survoltée des soirées à paillettes d'or ; Kiki & filles, le fil rouge de toutes ces années ; Lolo (précédemment dénommé Mr le Professeur Laurent Bermont), pour ses monologues du midi ; Lyllia, le papillon Bulgare de la science ; Mélanie, pour les pauses cigarettes grand air, et nos séances de cinéma « d'auteurs » ; Myriam, dit Mymi la courtisée ou Mymi la positive, relectrice homologuée ; Romain B le chouchou de ces dames ; Romain V, Tic en journée et Tintin en soirée ; Pascale, la déchainée ; Sophie, ma colloc' de bureau à multiples casquettes : chatteuse, pense-bête, standardiste, dictionnaire, goûteur, désodorisant, et j'en passe, qui a contribué physiquement et moralement à ma thèse ; Vincent, mon ex-colloc' de bureau musicien, Virginie, l'experte de cytométrie ; Zélie, grâce à qui mes maniaqueries sont passées inaperçues ; et Zohair, celui qui faute de m'avoir tout appris m'a enseigné 2 choses i) que les limites de l'agacement peuvent toujours être repoussées et ii) qu'il ne faut pas se fier au premier avis, même si l'avis dure plusieurs mois.

Je remercie également tout mes conscrits de thèse, July (prononcé « Rouli »), ma binôme physicienne ; Gwen (fournisseur officiel de fibros humains) et ses collègues Céline et Kevin ; Stéphanie, Sophie C, Carole et tous les autres.

Je tiens à remercier tout mes amis qui m'ont permis certaines fois de relativiser en me montrant que la science et les manip ne sont pas tout dans la vie : Tol (le seul non scientifique à avoir assisté au monologue final), David & Mary (et Alexis leur p'tit bout), Nath & Ced, Lelex et sa famille (et maintenant sa chérie), Caro & Enzo (que j'ai vu grandir), Ced B (le squatteur de dessin animé), Grisou (grâce à qui j'ai rencontré mon chéri), Manu (de maintenant pas d'avant), Guy (le meilleur organisateur de nouvel an), Max (là depuis l'origine), Séverine, Max, Anne-Flore et Sylvain (viva Las Rocas), Anou, Ricard, Robin & Anne-Claire (partenaires de poker délocalisés), Xav (Binôme d'un jour, binôme pour toujours), les filles du foot (les anciennes et les nouvelles), les gars de la boxe (qui ont subi parfois mes humeurs), mes entraîneurs (Didou et Momo), tous les cocos de mon enfance, ceux de Dannemarie et de Grandfontaine et tout ceux que je n'ai pu citer...

Je voudrais remercier toute ma famille, mon grand frère Olivier, qui a ouvert la voie, sa chérie Sarah qui a agrandi la branche scientifique de la famille, mon petit frère Benjamin qui restera toujours mon protégé et sa gentille moitié Annabelle.

A ma maman, sans qui rien ne serait, le Big Bang de ma vie qui nous a élevé et a fait de nous ce que nous sommes.

A mon chéri, qui a pris cette aventure en cours de route, qui m'a rendu ces dernières années plus faciles et qui m'a permis, grâce à ses conseils avisés, de relativiser tout au long de ce travail.

La tradition veut l'écriture de ces remerciements. L'exercice est difficile mais nous permet de remercier toutes les personnes qui ont contribué à l'avancement de ce travail et qui nous ont soutenues moralement. Cette tâche n'étant pas facile, la liste des personnes impliquées au cours de ces années ne peut pas être exhaustive. C'est pourquoi je remercie toutes les personnes que je n'ai pas citées précédemment et je m'excuse de l'oubli.

Résumé

Résumé

Il est à l'heure actuelle admis que de nombreuses modifications du génome conduisent à la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses. Ces modifications consistent en des mutations et des réarrangements de l'ADN chromosomique, des gains ou des pertes de chromosomes suite à des mitoses anormales et à l'intervention de parasites intracellulaires, et en particulier des virus qui contribuent à l'évolution des génomes vers un état cancéreux (*i.e.* perte du contrôle interne et externe du cycle cellulaire, immortalisation du clone cellulaire). La phagocytose de cellules apoptotiques pourrait jouer un rôle clef non seulement dans l'étiologie des tumeurs, mais aussi dans l'évolution, l'invasion et le potentiel métastatique des tumeurs.

Chez les mammifères, les cellules apoptotiques sont internalisées et éliminées par des cellules phagocytaires spécialisées ou non qui dégradent les composants cellulaires. Cependant, les cellules apoptotiques ne sont pas toujours complètement dégradées et peuvent servir de vecteur d'ADN. Les gènes transférés peuvent être d'origine cellulaire ou virale et sont exprimés par la cellule phagocytaire. Le transfert d'oncogènes cellulaires, tels que *c-myc* et *H-ras*^{V12}, aboutit à la transformation des cellules receveuses. Cependant, la cellule receveuse doit être déficiente en p53 pour être transformée. Le transfert de l'antigène T de SV40 avec les oncogènes *c-myc* et *H-ras*^{V12} induit la transformation des cellules receveuses possédant une p53 fonctionnelle. L'antigène T de SV40 inhiberait le mécanisme de protection de la cellule hôte en induisant la dégradation de p53 et pRb. Les oncogènes E6 et E7 des papillomavirus humains (HPV) à haut risque ayant des actions similaires à l'antigène T de SV40, il est concevable que le transfert horizontal de ces oncogènes soit à l'origine d'un mécanisme alternatif de carcinogenèse associée aux HPV.

Afin de confirmer cette hypothèse, l'apoptose de cellules dérivées de cancer du col de l'utérus, abritant ou non des séquences d'HPV, a été induite par un traitement chimique combiné à une irradiation UV. Les cellules apoptotiques, quel que soit leur statut virologique, sont phagocytées par les fibroblastes primaires. Cependant, seules les cellules apoptotiques dérivées de cellules donneuses abritant de l'ADN d'HPV sont capables de transformer les cellules receveuses. L'expression de l'ADN viral, en particulier de l'oncogène E6, dans les fibroblastes receveurs transformés ainsi que la perte d'expression des protéines p53 et p21 laissent supposer que le mécanisme de protection a été contourné par les oncogènes d'HPV, permettant la transformation cellulaire. Ces résultats suggèrent que le transfert horizontal

d'oncogènes viraux par des cellules apoptotiques peut être responsable de la transformation de cellules primaires et contribuer à la progression des tumeurs associées aux HPV.

Lors de l'étude du mécanisme d'internalisation des cellules apoptotiques, nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe de Patrick Sandoz du laboratoire d'optique de FEMTO-ST qui a mis au point des lames de microscope avec un système de repositionnement intégré. Nous avons adapté ce microsystème à l'observation de matériel biologique vivant, en particulier à l'observation de cultures cellulaires. Le repositionnement a été automatisé grâce au couplage du logiciel de repositionnement avec une platine motorisée. Ce système permet actuellement des observations séquentielles d'une préparation biologique avec une excellente précision.

L'internalisation des cellules apoptotiques a été suivie en temps réel à l'aide de ce système référencé en position. Nous avons aussi, grâce à des études pharmacologiques, déterminé quel mécanisme d'internalisation est impliqué dans le transfert horizontal de gènes ainsi que les récepteurs potentiellement impliqués dans la prise en charge de la cellule apoptotique par la cellule receveuse.

Les résultats présentés dans ces travaux mettent en évidence un nouveau mécanisme de carcinogenèse associée aux HPV *via* la phagocytose des cellules apoptotiques.

Sommaire

Sommaire

Résumé	11
Sommaire	15
Table des illustrations	19
Liste des abréviations	21
Préambule	25
Revue de la littérature	31
I) Transfert horizontal de gènes chez les mammifères	31
1-1) Modèles cellulaires du THG	31
1-2) Transfert de gènes	34
1-2-1) Transfert de gènes cellulaires et viraux	34
1-2-2) Régulation du transfert	36
1-2-3) Expression des gènes transférés	37
1-2-4) Réplication des gènes transférés	39
1-3) Transformation par transfert d'oncogènes	41
1-3-1) Transfert des oncogènes	41
1-3-2) Transformation	42
1-3-3) Régulation de la transformation	42
1-4) THG <i>in vivo</i>	44
II) Cellule apoptotique vecteur d'ADN	46
2-1) Formation des corps apoptotiques	46
2-1-1) Mort cellulaire programmée ou apoptose	46
2-1-2) Induction et effecteurs de l'apoptose	48
2-1-3) Formation des corps apoptotiques	51
2-2) Devenir des corps apoptotiques	54
2-2-1) Clairance des corps apoptotiques	54
2-2-2) Mécanisme de reconnaissance par les phagocytes	55
2-2-3) Internalisation et dégradation des cellules apoptotiques	59
2-2-4) Mécanisme d'internalisation par les cellules non spécialisées	61
2-3) Observation de l'internalisation des cellules apoptotiques : utilisation d'un système référencé en position	66
2-3-1) Système référencé en position	66
2-3-2) Fabrication de la mire	67
III) Transformation cellulaire	69
3-1) Transformation tumorale	69
3-1-1) Cas général : transfert vertical d'oncogènes	69
3-1-2) Cas du cancer du col : implication des HPV	73
3-2) p53, une barrière au développement tumoral	78
3-2-1) Structure et régulation de p53	78
3-2-2) Induction de la voie p53	81
3-2-3) Voie p53 dans l'arrêt de cycle, la réparation, la sénescence et l'apoptose	84
3-3) Apoptose intratumorale	88
Contexte et objectifs	93

Matériel & méthodes	99
I) Schéma général	99
II) Cellules	100
2-1) Lignées cellulaires dérivées de cancer du col de l'utérus	100
2-2) Cellules primaires et immortalisées	100
III) Apoptose	101
3-1) Induction de l'apoptose	101
3-2) Caractérisation de l'apoptose	101
IV) Coculture	102
V) Internalisation des cellules apoptotiques	102
5-1) Microscopie confocale	102
5-2) Cytométrie en flux	103
5-3) Utilisation de la mire microscopie confocal	103
VI) Transformation cellulaire	104
6-1) Sélection des cellules transformées	104
6-2) Caractérisation des cellules transformées	104
VII) Transfert de gènes	105
7-1) Détection des gènes transférés	105
7-2) Expression des gènes transférés	106
Introduction à la publication n°1	109
Supporting information	123
Résultats supplémentaires non publiés	125
I/ Mise au point du modèle de coculture	125
II/ Transformation des fibroblastes murins par transfert d'oncogènes d'HPV	128
III/ Transformation des kératinocytes primaires humains	130
Conclusion de la publication n°1	133
Introduction des publications n°2 et n°3	137
Mise au point et utilisations de la mire	139
I/ Utilisation de la mire pour l'observation d'une préparation biologique	139
II/ Utilisation de la mire pour se repositionner sur un même champ optique	141
III/ Utilisation de la mire pour suivre un événement biologique	143
Conclusion des publications n°2 et n°3	179
Mécanisme d'internalisation des cellules apoptotiques	183
I/ Spécificité de l'internalisation	183
II/ Cinétiques d'internalisation	184
III/ Etude du mécanisme d'internalisation	186
IV/ Etudes des molécules impliquées dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par les fibroblastes	187
V/ Conclusion	190

Discussion et perspectives	193
Conclusion générale	207
Bibliographie	211
Annexe 1 : poster 1	231
Annexe 2 : poster 2	233
Annexe 3 : poster 3	235
Annexe 4 : Encadrements, enseignements, formations et responsabilités collectives.	237

Table des illustrations

Tableau I :	Différents modèles utilisés dans l'étude du THG chez les mammifères.	p 27
Figure 1 :	Schéma de l'arbre de vie décrit par Darwin, additionné de l'évolution réticulée et du transfert de gènes.	p 20
Figure 2 :	Mécanisme de THG chez les mammifères.	p 26
Figure 3 :	Régulation du THG.	p 29
Figure 4 :	Devenir de l'ADN transféré.	p 32
Figure 5 :	Régulation de la réplication du gène transféré.	p 34
Figure 6 :	Régulation de la transformation par THG.	p 37
Figure 7 :	Différents types de mort cellulaire.	p 41
Figure 8 :	Induction de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort (extrinsèque) et par la voie mitochondriale (intrinsèque).	p 43
Figure 9 :	Structure et activation des caspases.	p 44
Figure 10 :	Corps apoptotique.	p 47
Figure 11 :	Molécules de reconnaissance impliquées dans la phagocytose des corps apoptotiques.	p 51
Figure 12 :	Internalisation et dégradation des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires.	p 54
Figure 13 :	Molécules de reconnaissance impliquées dans l'internalisation des cellules apoptotiques par les cellules non spécialisées.	p 56
Figure 14 :	Différentes entrées dans la cellule.	p 59
Figure 15 :	Référentiel en position, mire.	p 61
Figure 16 :	Principe de fabrication de la mire par photolithographie (procédé lift-off).	p 62
Figure 17 :	Transformation tumorale.	p 66
Figure 18 :	Implication des protéines E6, E7 et E5 dans l'immortalisation/transformation cellulaire.	p 69
Figure 19 :	Structure et modifications post-traductionnelles de p53.	p 73
Figure 20 :	Activation de p53 par la voie des dommages à l'ADN et du stress oncogénique.	p 77
Figure 21 :	Voie de p53 dans l'arrêt de cycle, la réparation de l'ADN, la sénescence et l'apoptose.	p 80
Figure 22 :	Relation entre index apoptotique et progression tumorale.	p 83
Figure 23 :	Schéma général des expériences réalisées.	p 87
Figure 24 :	Internalisation des cellules apoptotiques au cours du temps.	p 119
Figure 25 :	Transformation des fibroblastes primaires par les cellules apoptotiques en fonction du temps d'incubation.	p 120
Figure 26 :	Coculture des cellules apoptotiques et des fibroblastes à différents rapports.	p 121
Figure 27 :	Internalisation des cellules apoptotiques incubées à différents rapports avec des fibroblastes primaires.	p 122
Figure 28 :	Transformation par THG chez des fibroblastes murins.	p 123
Figure 29 :	Transformation des kératinocytes primaires par les cellules apoptotiques abritant des HPV.	p 124
Figure 30 :	Transformation par THG dans le modèle du cancer du col de l'utérus.	p 127
Figure 31 :	Mise au point du logiciel d'analyse d'intensité.	p 134
Figure 32 :	Adaptation du système de culture référencé en position aux observations à l'objectif x 60.	p 134
Figure 33 :	(A) Interface de repositionnement. (B) Photographies des champs optiques de la mire et de la culture.	p 136
Figure 34 :	Utilisation du système référencé en position pour retrouver une zone d'observation.	p 137
Figure 35 :	Utilisation du système référencé en position pour repositionner des images.	p 138
Figure 36 :	Exemples de morphologie de cellules NIH/3T3 (phalloïdine-TRITC) internalisant un corps apoptotique HeLa (CFDA, SE) observées en microscopie confocale.	p 177
Figure 37 :	Cinétiques d'internalisation des cellules apoptotiques HeLa, Ca Ski et C-33 A par les fibroblastes primaires.	p 178
Figure 38 :	Cinétiques d'internalisation des cellules apoptotiques HeLa par les fibroblastes primaires.	p 179
Figure 39 :	Mécanisme d'internalisation des cellules apoptotiques HeLa par les fibroblastes primaires.	p 181
Figure 40 :	Implication des phosphatidylsérines dans la phagocytose des cellules apoptotiques HeLa par les fibroblastes primaires.	p 182
Figure 41 :	Détection des ARN codant les récepteurs aux phosphatidylsérines par RT-PCR qualitative.	p 183
Figure 42 :	Récepteurs et cofacteurs impliqués dans l'internalisation des cellules apoptotiques HeLa par les fibroblastes primaires.	p 184
Figure 43 :	Carcinogenèse du col de l'utérus : voie classique et voie alternative.	p 187

Liste des abréviations

A

ABC1 : ATP-binding cassette transporter
 ADN : Acide DésoxyriboNucleotide
 AIF : Apoptosis Inducing Factor
 AKT : AK; FcRn A-chain Knockout mice T; Transforming
 AP : Adaptator Protein
 AP-2 α : Activating enhancer-binding Protein 2 α
 APAF-1 : Apoptotic Protease Activating Factor
 Arf6 : ADP-Ribosylation Factor 6
 ARN : Acide RiboNucleotide
 ARP : Actin-Related Proteins
 ASPP : Apoptosis Stimulating Protein of p53
 ATCC : American Type Culture Collection
 ATM : Ataxia-Telangiectasia Mutated
 ATP : Adenosine TriPhosphate
 ATR : Ataxia Telangiectasia and RAD-3 related

B

BAI-1 : Brain specific angiogenesis inhibitor-1
 Bcl-2 : B-Cell Lymphoma-2
 BHK : Baby Hamster Kidney
 Bid : BH3-Interacting domain Death agonist
 BTF3 : Basic Transcription Factor 3

C

CAD : Caspase Activated DNase
 CARD : CAspase Recruitment Domain
 Caspase : Cystein ASPartic Acid proteASE
 CDC25 : Cell Division Cycle 25
 CD-IC : Cytoplasmic Dynein Intermediate Chain
 CDK : Cyclin Dependent Kinase
 CDKI : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
 CADM1 : Cell ADhesion Molecule 1
 CFDA, SE : 5-(and 6-)-CarboxyFluoresceine DiAcetate Succinimidyl Ester
 Chk : CHeckpoint Kinase
 CrkII : Chicken tumour virus no. 10 Regulator of Kinase II
 c-IAP : Cellular-Inhibitor of Apoptosis Protein
 c-myc : cellular-MYeloCytoMatosis gene
 COP1 : COnstitutive Photomorphogenic 1

D

DAMPs : Damage-Associated Molecular Pattern
 DAPI : 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
 DD : Death Domain
 DEC1 : Deleted in Eosophageal Cancer 1
 DED : Death Effector Domain
 DIABLO : Direct IAP Binding protein with LOw pl
 DISC : Death Including Signaling Complex
 DFF : DNA Fragmentation Factor
 DFMO : DiFluoroMéthylOrnithine
 DNA-PK : DNA-Activated Protein Kinase
 Dock : Dedicator Of CytoKinesis
 DR : Death Receptor

E

E6AP : E6 Associated Protein
 EBV : Epstein Barr Virus
 EBNA1 : Epstein Barr Nuclear Antigen 1
 EBER : EBV-encoded RNA
 EF-1 α : Elongation Factor-1
 EGFR-1 : Epidermal Growth Factor Receptor 1
 eIF1 : Eukaryotic translation Initiation Factor 1
 Elmo : EnguLfment and cell Motility
 ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases

F

FADD : Fas Associated Death Domain
 FAK : Focal Adhesion Kinase
 FasL : Fas ligand
 FGF : Fibroblast Growth Factor
 FLICE : FADD-Like IL-1 β Converting Enzyme
 FLIP : FLICE Inhibitory Protein
 FPH : Fibroblastes Primaires Humains

G

Gadd45 : Growth Arrest and DNA Damage 45
 Gas 6 : Growth Arrest Specific 6
 GFP : Green fluorescent protein
 GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 beta
 GRASP65 : Golgi ReAssembly Stacking Protein
 GTP : Guanosine TriPhosphate
 GULP : enGULfment Adaptor PTB domain containing Protein

H

H2AX : Histone 2AX
 H2B : Histone 2B
 HAT : Histone Acetyl Transferase
 HAUST : Herpesvirus-Associated-Ubiquitin-Specific proTease
 HDAC : Histone DeAcetylase
 HDI : Histone DeAcetylase Inhibitors
 HER : Human EGF Receptor related
 HIF-1 α : Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
 HMGB1 : High-Mobility Group Box 1
 HPV : Human PapillomaVirus
 HR : Homologous Recombinaison
 H-ras : Harvey-ras
 HSP : Heat Shock Protein
 hTERT : human telomerase reverse transcriptase
 HTLV-I : Human T-lymphotropic virus-I

I

iASPP : inhibitory member of the ASPP family
 IAP : Inhibitor of Apoptosis Proteins
 ICAD : inhibitors of CAD
 I-CAM : Intercellular Adhesion Molecule
 IGF : Insulin-like Growth Factor
 IGF-BP3 : IGF-Binding Protein-3
 IL : InterLeukine
 INK4a : INhibitor of cycline dependant Kinase 4a

J

JMY : Junction-Mediating and -regulatorY protein
JNK : c-Jun NH₂-terminal Kinase

K

KPH : Kératinocytes Primaires Humains
KSHV : Kaposi's Sarcoma HerpesVirus

L

LOX1 : Lectin-like OXLDL-receptor 1
LRP1 : Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1

M

MAP4 : Microtubule Associated Protein 4
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MBL : Mannose Binding Lectine
MDM : Murine Double Minute
MEK : MAP/ERK/Kinase
MFG-E8 : Milk Fat Globuline EGF factor 8
MGMT : O(6)-MéthylGuanine MéthylTransférase
MRN : Mre11-Rad50-Nbs1
MST1 : Mammalian Sterile-20
mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin
MTT : bromure de 3-(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5-diphényl Tétrazolium)

N

NHEJ : Non-Homologous End Joining
NFATC : Nuclear Factor of Activated T-Cells
NFκB : Nuclear Factor-kappa B
NF-1 : NeuroFibromatosis Type 1
NFX1-91 : Nuclear Factor X box-binding protein 1-91
NK : Natural Killer

O

oxLDL : OXidized Low-Density Lipoprotein particules

P

p53AIP1 : p53-regulated Apoptosis-Inducing Protein 1
p70S6K : P70-ribosomal S6 Kinase
PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1
PARP : Poly(ADP-Ribose) Glycohydrate
Pak : p21-Activated protein Kinase
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDK : Phosphoinositide-Dependent Kinase
PDMS : PolyDiMéthylSiloxane
PERV : Porcine Endogenous RetroVirus
PIKKs : Phosphatidylinositol 3-Kinase-like Kinases
PIP3 : Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphate
Pirh2 : p53-Induced-RING-H2
PKB : Protein Kinase B
PML : ProMyelocytic Leukemia
PML-NB : PML-Nuclear Body
PP2A : Protein Phosphatase 2A
PSR : PhosphatidylSerine Receptor

PUMA : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis

R

Rac : Rat sarcoma homolog A related C3 botulinum toxin substrat
Raf : RAt Fibrosarcoma
Ras : RAt Sarcoma viral oncogene homolog
ROCK1 : Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1
RPA : Replication Protein A
RPP0 : Ribosomal Protein Predicted 0
RT-PCR : Reverse transcriptase-PCR

S

SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency
Smac : Second Mitochondria-derived Activator of Caspase
SP1 : Specificity Protein 1
SP-A/D : Surfactant Proteins A/D
SR-A : Scavenger receptor of class A
STS : STauroSporine
SV40 : Simian virus 40
SV40LT : Simian virus 40 Large T antigen
SV40ST : Simian virus 40 Small T antigen

T

t-Bid : Truncated Bid
TGF : Tumor Growth Factor
THG : Transfert Horizontal de Gènes
TIM : T cell immunoglobulin-and-mucin-domain molecule
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNF-R : TNF Receptor
TRADD : TNF R1-Associated Death Domain
TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAMP : TNF Receptor-related Apoptosis-Mediating Protein
TRITC : (TetramethylRhodamine-IsoThioCyanate)-conjugated phalloidin
TSP-1 : ThromboSpondine Protein 1

U

uPA : urinary Plasminogen Activator

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VIH-1 : Virus de l'Immunodéficience Humaine 1
VPS-34 : Vacuolar Protein Sorting 34

W

WASP : Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE : WASP-family VErpilin-homologous protein
WT-1 : Wilms' Tumour gene 1 protein

X

XLf : XRCC4-Like Factor
XRCC1 : X-ray Repair Complementing defective repair in Chinese hamster Cells 1
XIAP : X linked IAP

Préambule

Préambule

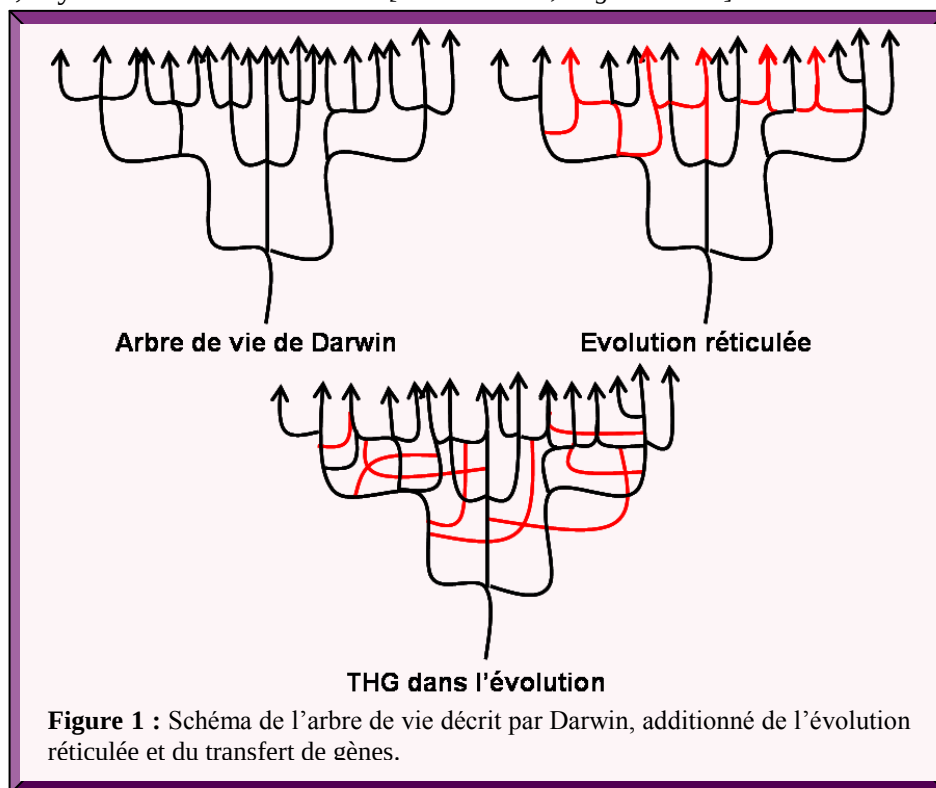
Le transfert vertical de gènes est par définition le transfert de gènes d'un organisme à son descendant. Le mécanisme classique de transfert de gènes chez les eucaryotes unicellulaires, mais aussi chez les eucaryotes pluricellulaires, est la division par mitose d'une cellule mère en deux cellules filles après duplication et répartition du matériel génétique. Au niveau des organismes pluricellulaires et de certains unicellulaires comme les champignons, il existe une reproduction sexuée qui consiste en la transmission verticale de gènes de deux organismes parents de la même espèce après fusion des gamètes.

Le transfert horizontal de gènes (THG) s'oppose au transfert vertical car la transmission de tout ou une partie du génome a lieu entre deux organismes sans rapport d'ascendance et sans nécessairement un rapport d'espèce. Le THG s'effectue généralement entre cellules voisines. Ce mécanisme a été originellement décrit chez les procaryotes dans les années 1940 lors d'un échange de gènes de résistance à un antibiotique entre deux souches bactériennes.

Chez les procaryotes et en particulier chez les eubactéries, il existe trois grands modes de transfert horizontal de gènes : la transformation, la conjugaison et la transduction (pour revue [Thomas 2005]). La transformation a été le premier mécanisme décrit de transfert de gènes. Ce processus implique le transfert d'ADN entre bactéries par l'absorption d'ADN libre provenant de l'environnement (bactéries dégradées) dans le cytosol bactérien. Généralement, les bactéries développent cette compétence lorsque leurs conditions de croissance sont altérées comme lors d'un manque de nutriments ou d'une densité trop importante. Le transfert de gènes par conjugaison permet le transfert d'ADN après jonction des cellules et la formation du pilus, qui permet le contact intercellulaire et la formation du pore nécessaire au transfert d'ADN. La transduction est aussi une forme de transfert d'ADN. Elle est conduite par des virus à tropisme bactérien à réplication indépendante appelés bactériophages (ou phages). Parfois, les bactériophages peuvent accidentellement empaqueter de l'ADN de la cellule hôte dans leur capsid et injecter cet ADN dans un nouvel hôte. Quel que soit le mécanisme de transfert, les bactéries doivent ensuite stabiliser l'ADN transféré, soit en l'intégrant à leur génome par recombinaison, soit en le circularisant. Divers processus dépendant de l'espèce bactérienne et du mécanisme de transfert impliqué, limitent le transfert, l'absorption et la stabilisation de l'ADN étranger et par conséquent les échanges de gènes.

L'arbre de vie décrit par Darwin (figure 1) est devenu le standard illustré de l'évolution des espèces, impliquant une racine commune à toute vie sur Terre et un processus de bifurcation de l'évolution [Doolittle 1999]. Toutefois, il existe plusieurs exceptions à ce point de vue [Koonin 2003]. Par exemple, les botanistes ont constaté que de nombreuses espèces végétales divergeaient du modèle de bifurcation car elles combinent les génomes de différentes espèces parentales. Ce processus provenant de l'hybridation des deux espèces parentales a été appelé évolution réticulée (figure 1).

L'endosymbiose des protéobactéries et des cellules eucaryotes ancestrales est à l'origine des mitochondries [Keeling 2008, Doolittle 1998, Genereux 2003]. Certaines protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire et illustrent le troisième processus impliqué dans l'évolution, le transfert de gènes de la mitochondrie vers le noyau. On sait maintenant que l'organisation binaire et la réticulation des lignées sont complétées par le THG qui forme des liens entre les différentes branches de l'arbre de vie (figure 1). Pour exemple, d'après une analyse de la teneur en GC et des codons du génome d'*Escherichia coli*, 18% des cadres de lecture ouverts ont été introduits dans le génome d'*E. coli* dont plus de 30% par transfert horizontal de gènes depuis que cette espèce a divergé de la lignée *Salmonella*, il y a 100 millions d'années [Ochman 2000, Gogarten 2005].



Aujourd'hui, le THG est connu pour avoir été la source d'une fraction du génome des eubactéries et des *archaea*, et peut concerner des gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire, telles que la HMGCoA réductase chez les *archaea*, la glutamine

synthétase, l'HSP70, certaines ATPases, et les aminoacyl-ARNt synthétases [Gogarten 2002]. Toutes les catégories fonctionnelles de gènes peuvent être horizontalement transférées. Cependant, certaines ont manifestement une propension plus élevée pour le transfert que d'autres [Davids 2008]. Le THG peut fournir à la cellule receveuse les moyens d'occuper de nouvelles niches écologiques. L'avantage sélectif conféré par des gènes transférés est alors fondamental et se manifeste le mieux dans certaines pathologies et écosystèmes extrêmes [Olendzenski 2009]. La recombinaison homologue ne se limite pas aux échanges de gènes au sein d'une espèce, elle peut permettre d'incorporer des gènes provenant de donneurs d'espèces différentes. Si un nouveau gène fournit un avantage sélectif, il peut être échangé entre des organismes non apparentés par THG. La fréquence des échanges dépendra de cinq facteurs : la proximité, la compatibilité du métabolisme, les adaptations à l'environnement, le système d'expression du gène et les mécanismes de transfert [Gogarten 2005].

L'examen comparatif du génome d'autres cellules montre que le THG n'est pas seulement une particularité de l'évolution des bactéries entériques mais existe aussi chez les *archaea* et les eucaryotes, y compris dans les cellules fongiques, végétales et humaines [de la Cruz 2000, Katz 2002, Sanders 2006, Gladyshev 2008]. Si le mécanisme impliqué dans le transfert de gènes chez les bactéries est particulièrement bien décrit, le(s) mécanisme(s) de THG chez les eucaryotes supérieurs, et en particulier chez l'Homme reste(nt) encore mal connu(s). Un des mécanismes potentiels décrit en 1999 implique les cellules apoptotiques comme vecteurs d'ADN. Ainsi, après internalisation de la cellule apoptotique par une cellule environnante, l'ADN contenu à l'intérieur de la cellule apoptotique est transféré et exprimé par la cellule receveuse.

Il a été montré que ce processus pourrait être impliqué dans la transformation tumorale. La théorie de l'évolution de Dawkins propose que l'évolution repose sur la sélection naturelle des gènes et non des individus, soutenant que le gène assure égoïstement sa propre survie, et non celle des autres gènes, de la cellule ou de l'individu [Shanahan 1999]. Ainsi, l'acquisition de modifications géniques favorables à l'individu serait due au hasard. Cette théorie est sujette à controverse. Certains la décrivent comme s'opposant à la théorie de l'évolution de Darwin qui repose sur la sélection naturelle favorisant le développement des individus les plus adaptés à leur environnement, alors que d'autres pensent que ces théories ne s'opposent pas vraiment mais se compléteraient en démontrant que la sélection naturelle n'existe pas seulement au niveau des individus mais aussi au niveau cellulaire et moléculaire.

Le développement tumoral qui fait suite à l'expansion clonale d'une cellule modifiée grâce à la pression de sélection pourrait être considéré comme une évolution cellulaire au

détriment de l'individu. Ainsi, la cellule tumorale serait une cellule « égoïste » qui se développerait au détriment de l'homéostasie nécessaire à l'individu qu'elle compose. Le THG serait donc un mécanisme qui permettrait l'évolution de la cellule tumorale au détriment de l'individu. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au transfert de gènes chez l'humain. Nous avons vérifié que le THG entre cellules humaines était possible et qu'il pouvait favoriser la prolifération anormale de cellules dans un environnement tumoral et en particulier dans le cas du cancer du col de l'utérus associé aux papillomavirus humains.

Revue de la Littérature

Revue de la littérature

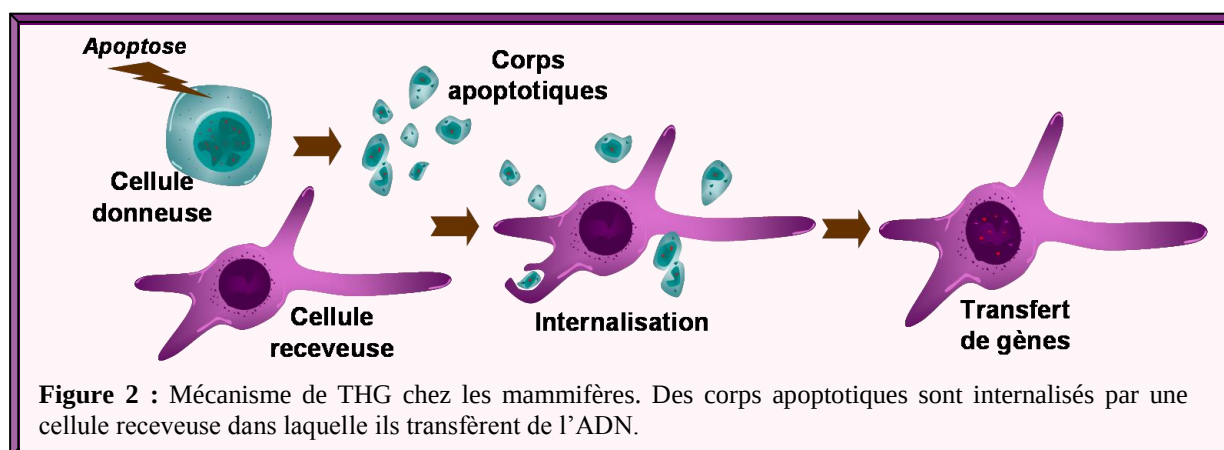
Cette revue de la littérature est une synthèse des travaux réalisés sur le THG chez les mammifères ainsi que sur la transformation par THG. Cependant, les mécanismes impliqués dans la transformation par THG restent très peu décrits. C'est pourquoi une partie de cette revue discute des mécanismes et des molécules potentiellement impliqués dans le phénomène de transfert. Nous nous sommes particulièrement intéressés au vecteur d'ADN dans le THG, c'est à dire le corps apoptotique, afin de comprendre comment une cellule morte peut transmettre de l'ADN et par quels mécanismes elle est internalisée par la cellule receveuse. La protéine p53, qui est étroitement liée à la conservation du gène transféré et au mécanisme de transformation par THG, ainsi que son rôle dans la transformation tumorale ont été développés.

I) Transfert horizontal de gènes chez les mammifères

Le transfert horizontal de gènes est actuellement très peu décrit. Au moment de la rédaction de ce manuscrit, seule une douzaine d'articles traitent de ce sujet. Néanmoins, quelques caractéristiques du mécanisme sont exposées dans la littérature.

1-1) Modèles cellulaires du THG

Le THG chez les mammifères peut s'apparenter à la transformation bactérienne car il conduit au transfert d'ADN abrité par une cellule morte ou mourante à une cellule voisine. Cependant, ce THG se distingue de la transformation bactérienne par plusieurs aspects. Premièrement, toutes les morts cellulaires ne conduisent pas au transfert de gènes. Seule la mort cellulaire programmée également appelée apoptose (cf. chapitre 2-1) mène au transfert de gènes. Deuxièmement, l'ADN transféré n'est pas libre dans le milieu environnant la cellule receveuse mais contenu dans un corps apoptotique, ou débris cellulaire, résultant de l'apoptose. Et troisièmement, l'ADN n'est pas directement absorbé dans le cytoplasme de la cellule hôte mais transféré après internalisation du corps apoptotique. Ainsi, le THG chez les mammifères provient de l'internalisation des corps apoptotiques par une cellule receveuse (figure 2). Les différentes étapes aboutissant au transfert de gènes seront reprises en détail dans la suite de ce manuscrit.



Les modèles d'étude qui ont permis de décrire le THG sont très différents. C'est pourquoi nous avons résumé les différents traitements inducteurs de mort, ainsi que les modèles cellulaires et les conditions de coculture, utilisés dans la littérature. Ce résumé permet de voir l'ensemble des travaux sur le THG précédant les nôtres et démontre la difficulté à mettre au point un modèle de THG dans le cancer du col de l'utérus.

Le THG nécessite des cellules apoptotiques comme vecteurs d'ADN et non des cellules nécrotiques et ce, quel que soit son mode d'induction : choc osmotique, choc thermique par congélation ou par chauffage à 56°C [Holmgren 1999, Bergsmedh 2001, Bisset 2007]. L'**induction d'apoptose** la plus couramment utilisée dans les modèles de THG est l'irradiation γ à 150 Gy [Holmgren 1999, Bergsmedh 2001, Bergsmedh 2002, Bergsmedh 2006, Spetz 1999, Spetz 2002, Yan 2006, Bisset 2007]. Néanmoins, d'autres inducteurs sont utilisés tels qu'un traitement à l'étoposide à 16 $\mu\text{g/ml}$, la privation de sérum et la déplétion en nutriments [Holmgren 1999, Spetz 2002, de la Taille 1999, Bergsmedh 2001, Bergsmedh 2002, Burghoff 2008, Ehnfors 2009]. Quel que soit le traitement, la cellule apoptotique conduit à un THG à des taux comparables quoique légèrement plus faibles après une induction par l'étoposide mais sans différence significative.

Les **cellules donneuses** proviennent de différents types cellulaires et d'espèces (tableau I). Les vecteurs d'ADN les plus employés dans le THG sont des cellules apoptotiques lymphoblastoïdes humaines (BL41, IB-4, Namalwa, Raji, TK6, L929, PBMC, HuT78, 8^{E5}/LAV,...) ou porcines (LCL) infectées ou non par des virus (Epstein Barr Virus, Human Immunodeficiency Virus, Porcine Endogenous RetroVirus,...) [Holmgren 1999, Yan 2006, Spetz 1999, Bisset 2007]. Cependant, d'autres types cellulaires peuvent être utilisés comme vecteur du THG tels que des fibroblastes embryonnaires de rat, des fibroblastes de fibrosarcome de souris ou L929, des cellules dérivées d'un adénocarcinome de prostate métastatique ou LNCaP, des cellules endothéliales de veine ombilicale ou HUVEC et des

splénocytes de souris [Bergsmedh 2001, Bergsmedh 2002, Bergsmedh 2006, Ehnfors 2009, Yan 2006, de la Taille 1999, Burghoff 2008, Spetz 2002]. Certaines de ces cellules sont transfectées ou non par des gènes rapporteurs (résistance aux antibiotiques), des gènes viraux et/ou des oncogènes. Ainsi, les données de la littérature montrent que le type de cellule donneuse n'influence pas le THG mais l'infection de celle-ci par un virus semble le favoriser [Holmgren 1999].

Des cellules provenant de tissus et d'espèces variés ont servi de **cellules receveuses** dans les différents modèles de THG (tableau I). Dans la plupart des cas, ces cellules sont d'origine humaine ou murine, de type fibroblastique mais on trouve aussi des cellules endothéliales aortiques bovines ou humaines, EaHy 926, des cardiomyocytes néonataux de rat, des monocytes et des cellules dendritiques humaines, des cellules musculaires lisses humaines, des cellules de cancer de prostate ou LNCaP [Holmgren 1999, Bergsmedh 2001, Bergsmedh 2002, Bergsmedh 2006, Ehnfors 2009, Yan 2006, Spetz 1999, Bisset 2007, de la Taille 1999, Burghoff 2008]. Ces cellules sont invalidées ou non pour différents gènes potentiellement impliqués dans le mécanisme de THG.

Cellules donneuses		Cellules receveuses		Rapport donneuse(s)/receveuse(s)	Auteurs
Type	Espèce	Type	Espèce		
Différentes lignées lymphoblastoïdes infectées ou non par EBV (BL41/95; EHR-A-BL41; IB-4; Namalwa; Raji; Jijoye M13; P3H3; Rael; CBMI Ral Sto; BL41; Ramos; BL28)	Humain	Cellules endothéliales aortiques	Boeuf	5/1	Holmgren <i>et al.</i> 1999
		Fibroblastes fœtaux	Humain		
		Monocytes	Humain		
		Cellules musculaires lisses	Humain		
Fibroblastes embryonnaires	Rat	Fibroblastes embryonnaires	Souris	5/1	Bergsmedh <i>et al.</i> 2001
Fibroblastes embryonnaires	Rat	Fibroblastes embryonnaires	Souris	5/1	Bergsmedh <i>et al.</i> 2002
Fibroblastes embryonnaires	Rat	Fibroblastes embryonnaires	Souris	5/1	Bergsmedh <i>et al.</i> 2006
Fibroblastes embryonnaires	Rat	Cellules endothéliales aortiques	Boeuf	5/1	Enfhors <i>et al.</i> 2009
		Fibroblastes embryonnaires	Souris		
Cellules lymphoblastoïdes (TK6)	Humain	Fibroblastes embryonnaires	Souris	10/1	Yann <i>et al.</i> 2006
Fibroblastes de fibrosarcome (L929)	Souris				
PBMC de patients HIV +	Humain	Fibroblastes fœtaux de poumon	Humain	2/1 avec fibroblastes et cellules endothéliales	Spetz <i>et al.</i> 1999
PBMC de patients HIV -	Humain	Cellules dendritiques	Humain		
Cellules lymphoblastoïdes (HuT78FS2, HUT78)	Humain	Cellules endothéliales (EaHy 926)	Humain	5/1 avec cellules dendritiques	
Lignée lymphoblastoïde HIV + (8E5/LAV RT-)	Humain				
Cellules d'adénocarcinome de prostate (LNCaP)	Humain	Adénocarcinome de prostate (LNCaP)	Humain	1/1	de la Taille <i>et al.</i> 1999
Cellules endothéliales de veine ombilicale (HUVEC)	Humain	Cardiomyocytes néonataux	Rat	5/3	Burghoff <i>et al.</i> 2008
Cellules lymphoblastoïdes (LCL) infectées ou non par PERV	Porc	Fibroblastes (MRC-5)	Humain	4/1	Bisset <i>et al.</i> 2007
Splénocytes infectés ou non par HIV/MuLV	Souris	-	Souris	1-2.10 ⁶ /souris	Spetz <i>et al.</i> 2002

Tableau I : Différents modèles utilisés dans l'étude du THG chez les mammifères.

Tableau I : Différents modèles utilisés dans l'étude du THG chez les mammifères.

Les conditions de coculture sont aussi très diverses suivant les auteurs (tableau I). Le rapport entre le nombre de cellules apoptotiques et le nombre de cellules receveuses varie de 1 cellule apoptotique pour 1 cellule receveuse à 10 cellules apoptotiques pour 1 cellule receveuse. Le temps de coculture essentiel au THG n'a jamais été réellement déterminé. Cependant, la grande majorité des modèles d'étude comporte une durée d'incubation de 48 heures [Holmgren 2002, Bergsmedh 2001, Bergsmedh 2002, Bergsmedh 2006, Ehnfors 2009, de la Taille 1999]. Seules les équipes de Yan et Spetz utilisent des durées de coculture respectivement de 3 jours et 1 à 2 semaines [Yan 2006, Spetz 1999]. En conclusion, les modèles mis en place pour l'étude du THG sont très hétérogènes.

1-2) Transfert de gènes

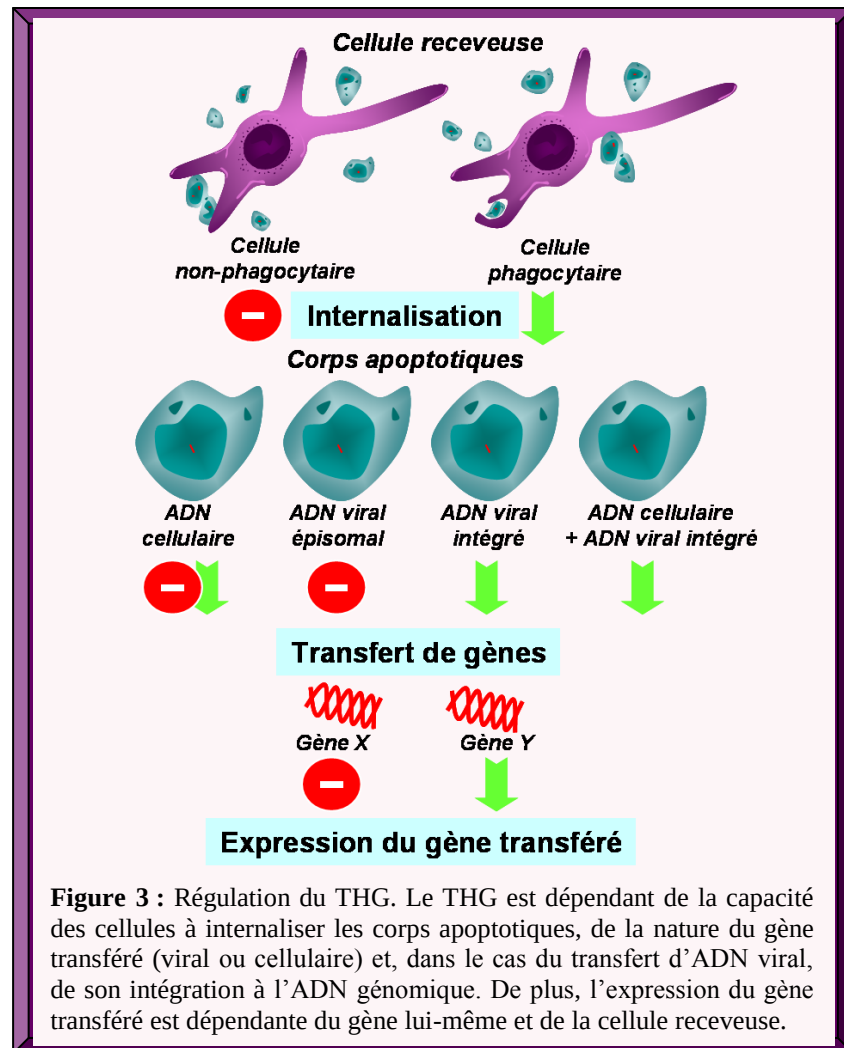
Comme les cellules utilisées, les gènes transférés sont nombreux et divers. Ainsi, les gènes transférés peuvent être d'origine cellulaire ou d'origine virale.

1-2-1) Transfert de gènes cellulaires et viraux

En 1999, de la Taille et coll. sont les premiers à révéler que les cellules tumorales issues d'un adénocarcinome de prostate ont la capacité, comme les bactéries, de transférer un gène de résistance à une drogue afin de s'adapter à un environnement sélectif [de la Taille 1999]. Concrètement, après induction de l'apoptose, des cellules LNCaP possédant un gène de résistance à l'hygromycine transfèrent ce gène à des cellules LNCaP ne le possédant pas mais possédant un gène de résistance à la néomycine. Grâce au transfert de ce gène, les cellules receveuses sont en mesure de proliférer en milieu doublement sélectif contenant les deux antibiotiques. Le gène transféré à une fréquence de 1 pour 10^5 colonies est encore exprimé plus de 10 passages après sélection. Par ailleurs, les cellules receveuses expriment le gène transféré à un taux plus faible que les cellules donneuses. Les auteurs suggèrent que, *in vivo*, le traitement d'un cancer par un inducteur d'apoptose, qui supprimerait préférentiellement un variant génétique dans une tumeur hétérogène, pourrait provoquer le développement d'un sous-type de cellules cancéreuses plus agressives, en accumulant des mutations génétiques.

A l'aide de plusieurs lignées infectées par le virus d'Epstein Barr (EBV), Holmgren et coll. ont expérimenté le transfert horizontal de gènes viraux [Holmgren 1999]. L'emploi des lignées BL41/95, EHR-A-BL41, IB-4 et Namalwa abritant des génomes d'EBV sous une

forme intégrée à l'ADN génomique, et des lignées Jijoye M13, P3H3, Rael et CBMI Ral Sto abritant des génomes d'EBV sous une forme épisomale, a révélé que les gènes viraux sont transférés et exprimés dans 1 à 5 % des cellules receveuses lorsqu'ils sont sous forme intégrée et sont non exprimés quand ils sont sous forme épisomale (figure 3). Il est concevable, mais cela reste une hypothèse, que les formes épisomales soient plus sensibles à la dégradation par les nucléases que les formes intégrées.



Plusieurs gènes d'EBV, tels que EBNA1 (Epstein Barr Nuclear Antigen 1), EBER1 et 2 (EBV-encoded RNA), sont décelés dès une semaine de coculture et sont toujours présents dans le noyau de la cellule receveuse après 3 semaines de culture, de même que les fragments génomiques transférés. Les séquences d'EBV, qui correspondent à 2 copies sur le chromosome 1 de la cellule donneuse, sont transmises à la même fréquence que les séquences d'ADN génomique représentant l'ensemble du génome cellulaire (respectivement 15% et 17%). Ces données indiquent que certains fragments, en particulier les fragments d'ADN viraux, sont préférentiellement transférés (figure 3). En outre, non seulement l'ADN viral est plus efficacement transféré, mais sa présence dans la cellule donneuse faciliterait le transfert

de l'ADN génomique. Ainsi, des cellules non infectées par EBV transfèrent de l'ADN génomique à 3% des cellules receveuses tandis que celles infectées par EBV en transfèrent 17%.

Le transfert horizontal de gènes d'EBV pourrait expliquer la présence de l'ADN d'EBV et son expression dans des cellules ne possédant pas le récepteur au complément CR2 nécessaire à l'infection par EBV. Dans la même année, Spetz et coll. ont montré que les gènes d'un autre virus, le virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1), pouvaient être transférés horizontalement d'une cellule infectée (HuT78_{SF2} et cellules mononuclées du sang périphérique issues de patients infectés) à des cellules endothéliales, des fibroblastes ou des cellules dendritiques [Spetz 1999]. Ainsi, les auteurs ont démontré que des fibroblastes ne disposant pas des récepteurs nécessaires à l'infection par le VIH abritaient, après 2 semaines de coculture, des séquences codant la protéine gag du VIH-1. Ces résultats prouvent que le THG peut aussi expliquer la présence du VIH-1 dans des cellules ne possédant pas de récepteurs nécessaires à son entrée et ainsi prendre part à la persistance du virus chez les individus infectés. En 2007, Bisset et coll. ont prouvé par ce mécanisme que le virus porcin PERV (Porcine Endogenous RetroVirus) peut être transmis à des fibroblastes humains [Bisset 2007]. Cependant, le taux de transfert dans les fibroblastes humains une semaine après la coculture est plus faible pour PERV (0,22%) que pour le VIH-1 (4%).

1-2-2) Régulation du transfert

Le mécanisme d'internalisation conduisant au THG n'a jamais été clairement caractérisé. Dans les travaux d'Holmgren, les corps apoptotiques sont « phagocytés » dès 1 heure de coculture par les fibroblastes fœtaux humains. Bien que la littérature décrive la phagocytose des corps apoptotiques (cf. partie 2-2), aucune étude ne caractérise vraiment le mécanisme d'internalisation impliqué dans le THG.

Ce mécanisme est cependant très important car, d'après les études d'Holmgren et de Spetz, la capacité « phagocytaire » ou la capacité d'internalisation de la cellule receveuse détermine le taux de THG (figure 3). Ainsi, le pourcentage de transfert d'EBNA1 est de 51% dans les monocytes humains, 20% dans les cellules endothéliales aortiques bovines, 4% dans les fibroblastes fœtaux humains et inférieur à 0,01% dans les cellules musculaires lisses humaines, sachant que de manière générale, les monocytes et les cellules endothéliales ont un pouvoir phagocytaire plus important que les fibroblastes [Holmgren 1999]. De plus, dans les travaux sur le transfert des gènes du VIH-1, les fibroblastes fœtaux de poumon humains ont

une capacité phagocytaire équivalente aux cellules dendritiques (respectivement 19 et 18 % de transfert) et supérieure aux cellules endothéliales humaines (1,3 %).

Le transfert de gènes n'est pas spécifique d'espèce car dans le modèle de Holmgren et coll., des cellules donneuses humaines peuvent transférer de l'ADN à des cellules receveuses bovines et dans le modèle de Bisset et coll. des cellules donneuses porcines peuvent transférer de l'ADN viral porcin à des cellules receveuses humaines [Holmgren 1999, Bisset 2007].

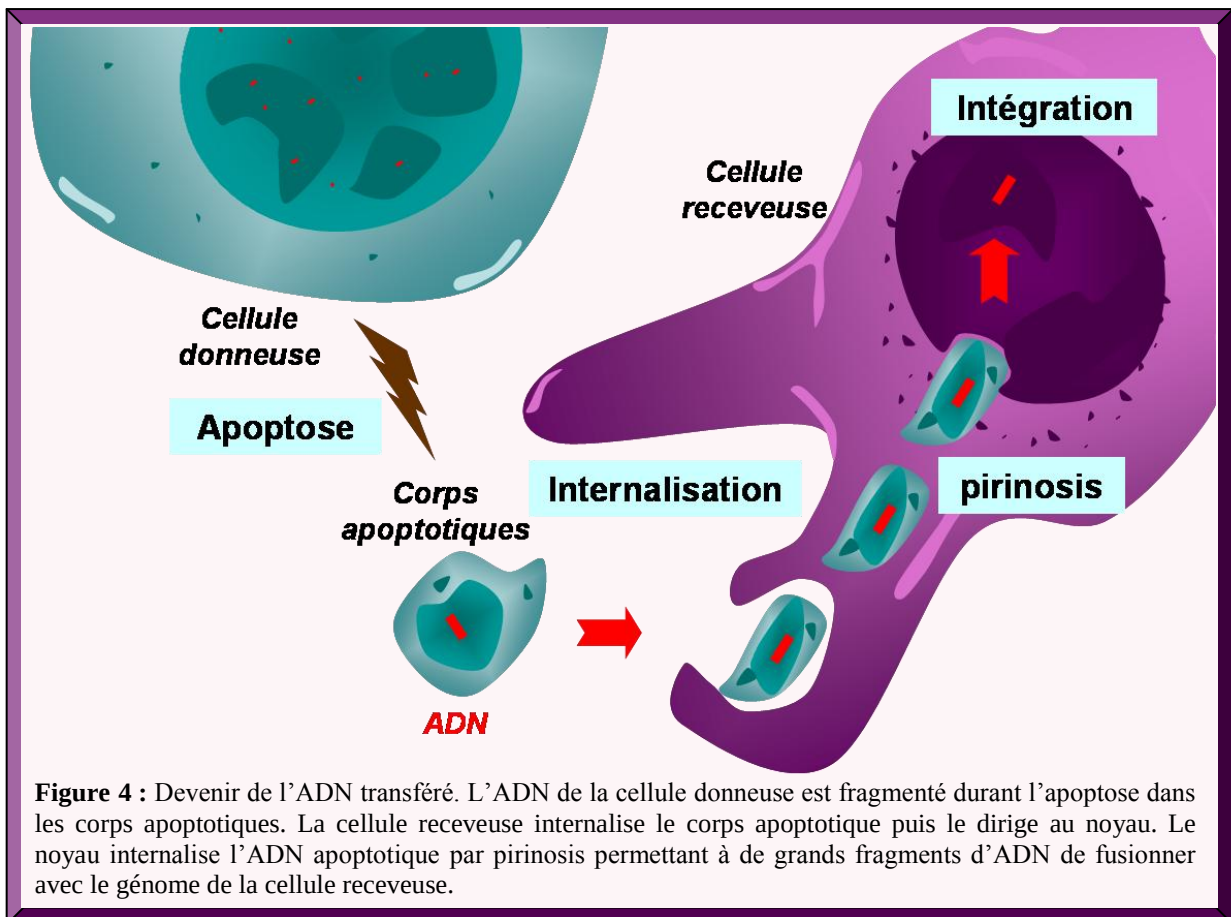
1-2-3) Expression des gènes transférés

Pour être exprimés, les gènes transférés doivent être intégrés au génome de la cellule hôte (partie 1-2-1). Plusieurs études démontrent cette intégration. Tout d'abord, lors du transfert de séquences d'EBV, les gènes transférés, tels que ceux codant EBNA, sont localisés au niveau du noyau de la cellule receveuse [Holmgren 1999]. Dans ce modèle et dans le modèle de Bergsmedh et coll., des expériences d'hybridation *in situ* ont démontré que l'ADN transféré, qui peut correspondre à des fragments de chromosome, fusionne avec les chromosomes de la cellule receveuse, démontrant son intégration [Holmgren 1999, Bergsmedh 2001, Bergsmedh 2002]. De plus, dans des résultats non publiés de l'équipe d'Holmgren, le transfert d'ADN dans le noyau de la cellule receveuse induit l'activation de Mre11, une protéine liant l'ADN double brin fragmenté, et de γ -H2AX (Histone 2AX activé), une cible de ATM (Ataxia-Telangectasia Mutated) impliquée dans la voie de réparation de l'ADN (cf. 3-2-3 et figure 4) [Holmgren 2010].

Dans ces mêmes travaux, le transfert de l'ADN du cytoplasme au noyau de la cellule hôte a été suivi par microscopie (Holmgren 2010). Le corps apoptotique présent dans le cytoplasme de la cellule receveuse est dirigé vers le noyau, le déformant. L'ADN pénètre ensuite dans le noyau par un mécanisme non déterminé, qui morphologiquement s'approche d'une « phagocytose nucléaire » et que l'auteur a nommé *pirinosis*, un acronyme des mots grecs *Pirinas* signifiant noyau et *Enosis* signifiant union. Cette fusion nucléaire expliquerait la présence de grands fragments d'ADN et/ou de chromosomes entiers.

Bien que le transfert ne soit pas assujéti à la barrière de type cellulaire et d'espèces et que les gènes transférés soient intégrés à l'ADN génomique de la cellule receveuse, l'expression de ces gènes n'est pas systématique. Elle est dépendante du gène transféré et du type de la cellule receveuse. Par exemple, dans le transfert des gènes de l'EBV, les gènes codants EBNA1, EBER1 et EBER2 transférés par des cellules lymphoïdes apoptotiques infectées par EBV sont exprimés par les fibroblastes humains receveurs alors que celui codant

EBNA2 est exprimé uniquement dans les lignées B lymphoblastoïdes [Holmgren 1999]. De même, lors du transfert de l'ADN du VIH, la protéine gag n'est pas retrouvée dans les cellules endothéliales receveuses alors qu'elle est présente dans 18 % des cellules dendritiques deux semaines après coculture [Spetz 1999]. De plus, bien que les gènes de PERV soient transférés par les cellules porcines apoptotiques, ils ne sont pas exprimés dans les fibroblastes humains receveurs [Bisset 2007].



Au sein d'un même modèle cellulaire de transfert, toutes les protéines ne sont pas synthétisées au même taux. Par exemple, après la coculture de cellules apoptotiques infectées par le VIH-1 avec des fibroblastes, la protéine p24 est détectée dans 0,3 % des fibroblastes tandis que la protéine gp 120 est présente dans 1,7 % des cas [Spetz 1999]. Enfin, il existe une variabilité du taux de transfert suivant l'individu donneur car des cellules mononuclées de sang périphérique infectées par le VIH-1 induisent une expression de la protéine gag dans les cellules receveuses variant de 6 à 51 % suivant le patient.

De surcroît, le transfert et l'expression des gènes transférés sont transitoires. Ainsi, l'ADN d'EBV transféré disparaît après 2 mois de culture, celui de PERV après 22 jours et le gène de résistance à l'hygromycine, utilisé comme gène de sélection dans le modèle cellulaire de THG de Bergsmedh et coll., après 3 à 4 semaines [Holmgren 1999, Bisset 2007, Bergsmedh 2001].

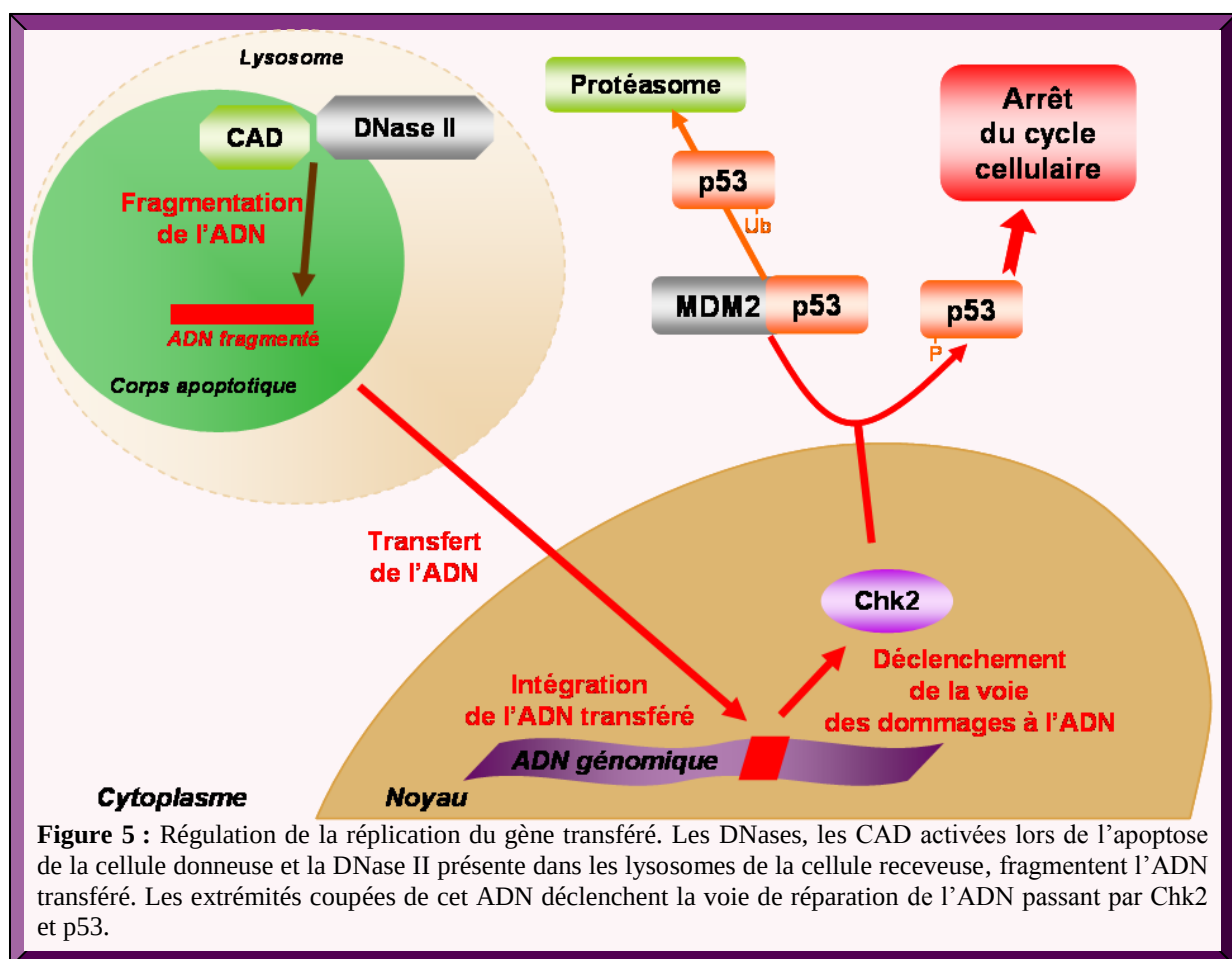
Les gènes transférés ne semblent stables qu'en présence d'une pression de sélection. Dans le cas du transfert du gène de résistance à l'hygromycine, la culture en milieu sélectif contenant cet antibiotique provoque la conservation du gène transféré ainsi que son expression.

1-2-4) Réplication des gènes transférés

Holmgren et coll. ont démontré que les gènes transférés peuvent être conservés mais ne sont pas systématiquement répliqués [Holmgren 1999]. Ceci est conforté par les travaux des équipes de Bergsmedh et de Yan qui révèlent clairement que la réplication de gènes transférés est contrôlée (figure 5) [Bergsmedh 2006, Yan 2006]. Les gènes transférés possèdent des extrémités clivées, d'une part, par les Caspase Activated DNases (CAD) activées lors de l'apoptose de la cellule donneuse et, d'autre part, par les DNases lysosomales de la cellule receveuse après internalisation des corps apoptotiques. Ces auteurs se sont attachés au rôle de ces enzymes dans la réplication de l'ADN et dans le déclenchement de la voie de réparation de l'ADN passant par la protéine p53.

La coculture de corps apoptotiques de fibroblastes de rat, abritant le gène de résistance à l'hygromycine, avec des fibroblastes murins sauvages déclenche une accumulation de p53 dans les fibroblastes receveurs qui double en 4 heures et est multipliée par 10 après 8 heures [Bergsmedh 2006]. Cette accumulation de p53 est caractéristique du déclenchement de la voie des dommages de l'ADN, induisant un arrêt du cycle cellulaire chez la cellule receveuse. Dans ce modèle, l'implication des CAD a été vérifiée grâce à la mutation d'un inhibiteur des CAD (ICAD), empêchant son clivage par la caspase 3 et donc la libération des CAD. L'inhibition de l'activité des CAD dans la cellule donneuse induit une accumulation de p53 plus tardive (après 12 heures), plus faible (diminuée 6 fois) mais toujours présente dans la cellule receveuse et ne permet pas la formation de colonies résistantes à l'hygromycine. Ces résultats suggèrent que la CAD est impliquée dans le déclenchement de ce mécanisme mais qu'elle n'est pas la seule DNase impliquée. Par ailleurs, l'inhibition des CAD diminue le taux de THG dans les cellules receveuses sauvages [Yan 2006]. De plus, lors de l'utilisation de cellules receveuses déficientes en p53 (p53^{-/-}), l'inhibition de la CAD diminue la propagation du gène de l'hygromycine dans les cellules receveuses, indiquant qu'indépendamment de leurs effets sur l'accumulation de p53, les CAD favorisent le THG. Le fait que les CAD facilitent l'entrée et l'intégration de l'ADN transféré en le fragmentant est une hypothèse intéressante qu'il reste à démontrer.

L'utilisation de la bafilomycine A1, un inhibiteur des pompes H^+ /ATPases qui bloque l'acidification des lysosomes et donc le fonctionnement de la DNase II lysosomale, dans la cellule receveuse induit aussi une accumulation de p53 plus tardive (12 heures) mais plus forte (24 fois plus élevée). L'utilisation combinée de la bafilomycine et de cellules apoptotiques CAD^{-/-} retarde davantage l'accumulation de p53 (24 heures), la diminue d'un facteur 6 mais n'empêche pas l'activation de la voie p53. L'invalidation de la DNase II (DNase II^{-/-}) dans les fibroblastes receveurs donne une meilleure réponse que l'utilisation de la drogue car le temps nécessaire à l'induction de p53 augmente à 24 heures et le taux est 4 fois plus faible. De plus, l'utilisation combinée de fibroblastes DNase II^{-/-} avec des cellules apoptotiques aux CAD inhibées bloque l'accumulation de p53. Enfin, la transfection de la DNase II dans les fibroblastes DNase II^{-/-} rétablit l'accumulation de p53. La DNase II de la cellule receveuse est donc bien impliquée dans le déclenchement de la voie de dommages à l'ADN via l'accumulation de p53.



Outre l'effet sur l'accumulation de p53, l'invalidation de la DNase II dans la cellule receveuse facilite la réplication de l'ADN transféré et ainsi la formation de colonies sur milieu sélectif contenant de l'hygromycine. Le rétablissement de la DNase II par transfection dans

les cellules invalidées inhibe la formation de colonies et induit une accumulation de p53. La méthode d'obtention des corps apoptotiques, l'irradiation gamma ou la privation de sérum, a une légère influence sur l'effet de l'invalidation de la DNase II. Une des explications possibles se rapporte à la qualité des fragments d'ADN générés, à savoir, la coupure de l'ADN double brin. Lors de la privation de sérum, les CAD forment des extrémités franches avec rupture des 2 brins comportant une extrémité 5'-phosphate et une extrémité 3'-hydroxyl qui facilite le transfert et l'intégration contrairement à la DNase II qui génère des extrémités 5'-hydroxyl et 3'-phosphate. La deuxième hypothèse est que les CAD induisant une accumulation plus tardive de p53, la probabilité de transfert est plus grande.

Chk2 (human Checkpoint kinase) est une protéine de la voie de régulation des dommages à l'ADN. Elle phosphoryle la protéine p53 sur la sérine 23 en réponse à une cassure de l'ADN double brin. Cette phosphorylation de p53 empêche sa liaison à MDM2 (Murine Double Minute) et prévient son ubiquitination et donc sa dégradation [Hirao 2000]. En conséquence, les auteurs ont recherché l'effet de l'inactivation de Chk2 sur l'internalisation des corps apoptotiques [Bergsmedh 2006]. L'invalidation de Chk2 dans les cellules receveuses permet d'une part de ne pas déclencher une accumulation de p53 qui est pourtant fonctionnelle et d'autre part la formation de colonies donc la propagation des gènes transférés (taux de transfert de $1/1.10^5$). Il est donc évident que Chk2 joue un rôle dans la propagation des gènes transférés via l'activation de p53.

1-3) Transformation par transfert d'oncogènes

1-3-1) Transfert des oncogènes

Bergsmedh et coll. sont parvenus à transférer des oncogènes cellulaires, *c-myc* (cellular-MYeloCytomatosis gene) et *H-ras*^{V12} (Harvey-RAt Sarcoma viral oncogene homolog), à l'aide de corps apoptotiques dérivés de fibroblastes embryonnaires de rat transfectés par un plasmide contenant ces deux oncogènes ainsi que le gène de résistance à l'hygromycine [Bergsmedh 2001]. Les oncogènes surexprimés sont détectés dans les cellules receveuses par « polymérase Chain reaction » (PCR) pendant 4 semaines à un taux de transfert de $1/1.10^4$ puis, comme le gène de résistance à l'hygromycine, sont perdus en absence de pression de sélection (milieu contenant de l'hygromycine). Le transfert des oncogènes aboutit à la formation de petites colonies en agar mou, une caractéristique propre

aux cellules transformées. Cependant, les cellules sont devenues sénescentes ou sont mortes durant la propagation. L'hypothèse que la réplication des oncogènes soit inhibée par la voie de p53 suite au transfert de l'ADN fragmenté a été confirmée quelques années plus tard lors du transfert des oncogènes dans des fibroblastes dépourvus de Chk2 [Bergsmedh 2006]. En effet, la coculture des corps apoptotiques contenant *c-myc* et *H-ras*^{V12} avec des fibroblastes Chk2^{-/-} conduit au transfert et à la propagation des oncogènes. Cependant, bien que les oncogènes soient présents dans les fibroblastes receveurs, ces derniers ne sont pas transformés et ne forment pas de tumeurs chez la souris SCID (severe combined immunodeficiency, dépourvues de lymphocytes B et T). Une des hypothèses possibles est qu'il existe aussi une régulation passant par p19/p53 qui prévient la transformation.

1-3-2) Transformation

La coculture de corps apoptotiques abritant *c-myc* et *H-ras*^{V12} avec des fibroblastes invalidés pour p53 (p53^{-/-}) induit la formation de grosses colonies en agar mou (8/1.10⁵ après apoptose par irradiation et 7/1.10⁵ après apoptose par déplétion en nutriments) [Bergsmedh 2001]. Par ailleurs, ces fibroblastes sont capables de former des tumeurs dans des souris SCID, 3 semaines après injection, confirmant leur potentiel oncogénique. Les oncogènes transférés sont décelés dans ces tumeurs plus de 3 mois après leur formation et sont toujours capables d'induire la formation d'une tumeur, confirmant le besoin de pression de sélection (croissance *in vivo*) pour persister. L'analyse en métaphase des chromosomes des cellules tumorales de souris a montré la présence de chromosomes entiers de rat, de chromosomes hybrides rat/souris, ainsi que la présence de *c-myc* humain, confirmant que tout ou une partie des chromosomes peut être transféré.

1-3-3) Régulation de la transformation

La régulation de la transformation étant potentiellement sous le contrôle de la voie de régulation p19^{ARF}/p53, des corps apoptotiques issus de fibroblastes transfectés par *c-myc* et *H-ras*^{V12} ont été cultivés avec des fibroblastes murins déficients en p19^{ARF} (p19^{ARF}^{-/-}) [Bergsmedh 2002]. Cette coculture n'a pas abouti à la formation de clones en agar mou, ni à la formation de tumeurs chez la souris SCID. Les auteurs ont conclu que p19^{ARF} n'est pas impliquée dans le contrôle de la transformation par THG.

La protéine p21 étant une des cibles de p53, Bergsmedh et coll. ont étudié l'effet de son inactivation dans les cellules receveuses [Bergsmedh 2002]. L'invalidation du gène de p21 dans les fibroblastes receveurs permet aux oncogènes *c-myc* et *H-ras*^{V12} d'être transférés dans 90 % des cellules p21^{-/-} qui sont alors capables de former des colonies en agar mou à un taux légèrement plus important que lors de l'invalidation de p53 (55/1.10⁵ contre 42/1.10⁵ pour p53^{-/-}). Lorsqu'ils sont cultivés *in vitro*, ces fibroblastes murins perdent, comme dans les autres modèles de transfert de gènes, les oncogènes transférés après 3 à 4 semaines de culture. Après injection chez la souris SCID, ces fibroblastes sont capables de former des tumeurs palpables dès 4 jours et atteignant 2 cm de diamètre après 22 jours. Ainsi, il apparaît que la voie p53/p21 contrôle la régulation de la transformation par THG (figure 6).

Afin de contourner la voie de régulation de la transformation par THG impliquant p53, Ehnfors et coll. ont alors transfecté conjointement aux oncogènes *c-myc* et *H-ras*, le gène codant l'antigène T de SV40 (SV40LT) [Ehnfors 2009]. Cette protéine est capable de se lier à p53 et pRb et d'induire leur dégradation par le protéasome inhibant d'une part la transactivation de p21 et d'autre part la libération du facteur de transcription E2F, aboutissant à une progression du cycle cellulaire (figure 6). Les fibroblastes murins sauvages (sans gène invalidé) cultivés avec des corps apoptotiques *c-myc/H-ras*^{V12}/SV40LT prolifèrent sous forme de colonies en agar mou et expriment SV40LT. L'injection de ces fibroblastes dans des souris induit la formation de tumeurs positives pour SV40 confirmant ainsi que l'inactivation de la voie p53, entre autres, régule négativement la transformation après THG. La voie de régulation du transfert de gène est représentée dans la figure 6.

1-4) THG *in vivo*

L'injection de 5.10^5 fibroblastes transformés par transfert de *c-myc/H-ras*^{V12}/SV40LT dans des souris SCID provoque non seulement la formation d'une tumeur positive pour SV40LT mais aussi le transfert de SV40LT *in vivo* aux cellules endothéliales environnant les cellules transplantées. Après analyse des gènes transférés, les auteurs retrouvent tout ou une partie des chromosomes de fibroblastes transférés qui fusionnent ou non avec les chromosomes des cellules environnantes. Les cellules endothéliales abritant SV40LT n'induisent pas de tumeurs après réimplantation contrairement aux fibroblastes transformés. Cependant, ces cellules endothéliales forment des petits kystes faiblement irrigués lorsqu'elles sont cultivées en matrigel à l'inverse des cellules endothéliales normales. De plus, l'addition de FGF-2 (Fibroblast Growth Factor), un facteur de croissance connu pour favoriser la formation de nouveaux vaisseaux, aux cultures en matrigel entraîne la formation de gros vaisseaux sanguins contenant des érythrocytes, témoins de la connexion au système sanguin de l'hôte. En conclusion, les cellules endothéliales cibles du THG ont non seulement la capacité de former de nouveaux vaisseaux sanguins mais deviennent aussi immortelles.

Cette étude n'est pas la seule à révéler que le THG peut être efficace *in vivo*. Deux jours après leur transplantation cardiaque chez le rat, les cellules HUVEC positives pour la GFP (Green fluorescent protein) meurent par apoptose favorisant le transfert horizontal du gène codant la GFP dans les cardiomyocytes environnant les cellules transplantées [Burghoff

2008]. Le transfert du gène codant la GFP aux cellules endothéliales est confirmé par la morphologie et le phénotype cardiomyocytes des cellules GFP+, 7 jours après la transplantation. De plus, ces cellules qui ne sont pas d'origine humaine, proviennent du rat hôte et sont mononuclées réfutant la possibilité d'une fusion nucléaire. Cependant, 3 semaines après transplantation, les cellules GFP disparaissent comme dans les modèles d'étude *in vitro* démontrant une nouvelle fois que si le gène transféré n'est pas nécessaire, il est perdu.

Le THG *in vivo* a été mis à profit pour l'élaboration de vaccins anti-VIH-1 [Spetz 2002]. Des splénocytes infectés par le VIH-1 (VIH-1/MulV) ont été injectés par voie intrapéritonéale à des souris après induction d'apoptose. Cette injection ne provoque pas le développement du virus mais induit une réaction immunitaire. La réactivité contre les protéines du VIH sont variables (réactivité plus importante contre Nef après injection de cellules apoptotiques qu'après injection de cellules vivantes et inversement pour p24). De plus, les cellules apoptotiques entraînent une forte réactivité (plus forte que les cellules vivantes) contre la protéine d'enveloppe gp41 B/LAI, qui est l'épitope le plus conservé, et une réaction croisée avec deux autres épitopes (A UG031 et C BR25). L'injection des cellules apoptotiques provoque une immunisation, sans détecter la présence du virus, ce qui prouve que l'ADN viral ne provient pas d'une infection. Il a été transféré horizontalement et exprimé par la cellule receveuse. Ce modèle démontre l'efficacité du THG *in vivo*.

II) Cellule apoptotique vecteur d'ADN

Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre, le mécanisme qui permet normalement l'élimination et la dégradation de cellules apoptotiques, de façon surprenante, permet aussi le THG. Dans ce chapitre nous reprenons deux points essentiels pour mieux comprendre le THG : la formation du corps apoptotique contenant de l'ADN génomique fragmenté et l'élimination de ce corps apoptotique par les cellules environnantes qu'elles soient spécialisées ou non dans la phagocytose.

2-1) Formation des corps apoptotiques

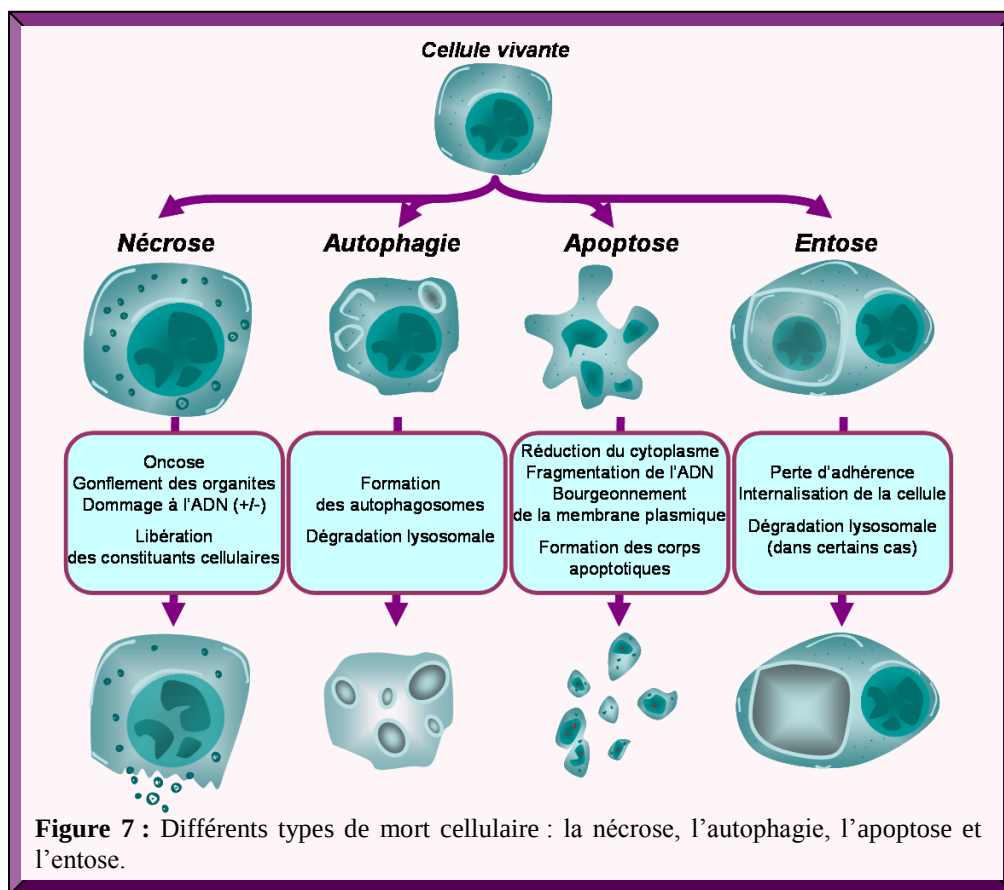
2-1-1) Mort cellulaire programmée ou apoptose

Les corps apoptotiques, vecteurs d'ADN dans le THG, sont des fragments cellulaires provenant de la mort cellulaire programmée ou apoptose. Il existe plusieurs types de mort cellulaire. On distingue principalement la nécrose, l'autophagie et l'apoptose [Edinger 2004].

La nécrose a pendant longtemps été considérée comme une mort passive provoquée par différents stress comme des changements physicochimiques (chaleur, congélation, choc osmotique,...) [Fink 2005]. A l'heure actuelle, un type de nécrose, parfois nommée nécroptosis, est aussi considérée comme une mort cellulaire programmée (Figure 7) [Vandenabeele 2010]. La nécrose se caractérise par la rupture de la membrane plasmique suivie de l'entrée d'eau et d'électrolytes qui aboutissent au gonflement du cytoplasme, à la dilatation des organites intracellulaires (mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi) et à la dégradation du noyau. Après destruction de la cellule, le contenu intracellulaire est libéré dans le milieu extérieur induisant une réaction inflammatoire chez l'individu.

L'autophagie, qui signifie « se manger soi-même » est une mort cellulaire alternative qui participe plus au recyclage des constituants cellulaires qu'à leur destruction (figure 7) [Kourtis 2009, Kroemer 2005a]. Brièvement, le processus autophagique est une autodigestion de la cellule. Des fragments de membrane, dénommés phagophores, séquestrent les constituants du cytoplasme de façon aléatoire et forment des autophagosomes qui matureront après fusion avec des lysosomes. Les hydrolases lysosomiales de l'autophagolysosome ainsi formé, dégradent les organites cellulaires séquestrés dans le phagolysosome. Certains résidus cellulaires peuvent être réutilisés pour la synthèse de molécules nécessaires aux cellules.

L'apoptose est la mort cellulaire la mieux documentée à ce jour. Elle se différencie de la nécrose par le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique et donc du contenu cellulaire (figure 7) [Uren 1996]. Au cours de l'apoptose, les cellules subissent des changements morphologiques et biochimiques conduisant à la formation de corps apoptotiques (cf. partie 3-1-2 à 3-1-5). L'apoptose a un rôle essentiel dans le développement et dans l'homéostasie cellulaire. Un des exemples de son implication dans le développement le plus couramment évoqué est l'élimination des espaces interdigitaux lors de la formation des doigts chez l'embryon [Wood 2000]. Chez l'adulte, elle participe au renouvellement tissulaire et à l'homéostasie tissulaire [Jacobson 1997]. Des anomalies dans la régulation de l'apoptose contribuent à divers états pathologiques, parmi lesquels la maladie d'Alzheimer (excès d'apoptose de certaines cellules du système nerveux central) ou certains cancers (défaut d'apoptose) en permettant la croissance de cellules anormales, favorisant le processus de carcinogenèse (cf. partie 2-3-1) [Mattson 2004].



Lorsque les cellules perdent leur adhérence à la matrice extracellulaire, elles meurent par un processus apoptotique dénommé anoïkis. Une autre mort cellulaire, non-apoptotique, l'entose, est aussi observée chez les cellules épithéliales tumorales après perte de l'adhérence à la matrice (figure 7) [Overholtzer 2007]. Les cellules détachées peuvent être reconnues et internalisées vivantes par les cellules environnantes. La cellule internalisée a alors plusieurs

destinées : elle peut être relâchée directement ou après une division cellulaire ou elle peut mourir après dégradation par les enzymes lysosomales de la cellule receveuse [Overholtzer 2008]. Ce mécanisme aboutissant à une structure « cell-in-cell » a de nombreux points communs avec l'internalisation des corps apoptotiques.

2-1-2) Induction et effecteurs de l'apoptose

Deux grandes voies d'activation pouvant interagir entre elles permettent le déclenchement de l'apoptose et induisent les mêmes modifications morphologiques chez la cellule mourante. Ces 2 voies sont décrites classiquement comme la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort et la voie intrinsèque ou voie mitochondriale (figure 8) [Kroemer 1995].

La voie apoptotique extrinsèque est activée après liaison d'un ligand à un récepteur de mort (DR : Death Receptor) [Nagata 1997]. Ces protéines transmembranaires font toutes partie de la famille des récepteurs du TNF (Tumor Necrosis Factor) et comptent 6 membres. On distingue le TNF-R1 (DR1), Fas (DR2), TRAMP (TNF Receptor-related Apoptosis-Mediating Protein, DR3), TRAIL-R1 (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand, DR4), TRAIL-R2 (DR5) et DR6. Les ligands les plus connus impliqués dans la mort cellulaire sont le TNF- α qui se lie au TNF-R1, FasL (Fas ligand) qui comme son nom l'indique est le ligand de Fas et TRAIL qui se fixe à DR4 et DR5 [Igney 2002]. Après fixation du ligand, le récepteur s'active par trimérisation et recrute alors des protéines adaptatrices par reconnaissance de leur domaine de mort respectif (FADD : Fas Associated Death Domain, pour DR2, DR4 et DR5 ; TRADD pour DR1). Les molécules adaptatrices, qui possèdent aussi un domaine effecteur de mort (DED : Death effector Domain), recrutent les procaspases-8 ou -10, pour former le DISC (Death Including Signaling Complex) impliqué dans la propagation du signal (cf partie 2-1-4) [Ozoren 2002]. Il existe des régulateurs pouvant inhiber la propagation du signal par le DISC dont la protéine cFILP, une isoforme de la procaspase-8 ne possédant pas de site protéolytique, qui inhibe donc cette caspase par compétition [Kavuri 2011].

L'initiation de la voie apoptotique intrinsèque est dépendante de protéines de la famille Bcl-2 et de p53. Elle conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, accompagnée d'une chute du potentiel membranaire mitochondrial. Ceci aboutit à la libération dans le cytoplasme de molécules apoptogènes contenues dans l'espace intermembranaire [Green 2004, Zhivotovsky 1998]. La première de ces protéines apoptogènes est le cytochrome c qui après avoir été libéré va former l'apoptosome, avec de l'ATP, la protéine Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor-1) et la procaspase-9. L'apoptosome va permettre

l'activation de la caspase-9 initiateur et l'exécution de l'apoptose [Li 1997]. Les protéines Smac/DIABLO aussi libérées à partir de l'espace intermembranaire bloquent les IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) des protéines capables d'inhiber les caspases [Shiozaki 2003]. Enfin, les deux dernières protéines libérées dans le cytoplasme, l'AIF (apoptosis-inducing factor) et l'endonucléase G, vont être transloquées dans le noyau et induire une apoptose indépendante des caspases [Kalinowska 2005, Vahsen 2006, Susin 1999]. La dépolarisation mitochondriale est régulée par les membres de la famille Bcl-2 qui comportent des protéines pro-apoptotiques (dont Bax, Bak et Bid) et des protéines anti-apoptotiques (dont Bcl-2 et Bcl-xL). Ces deux voies apoptotiques sont reliées par la protéine pro-apoptotique Bid. En effet, la caspase-8, activée par la voie apoptotique extrinsèque, clive Bid en t-Bid (truncated Bid) qui est relocalisée à la mitochondrie aboutissant à la libération de cytochrome c [Li 1998].

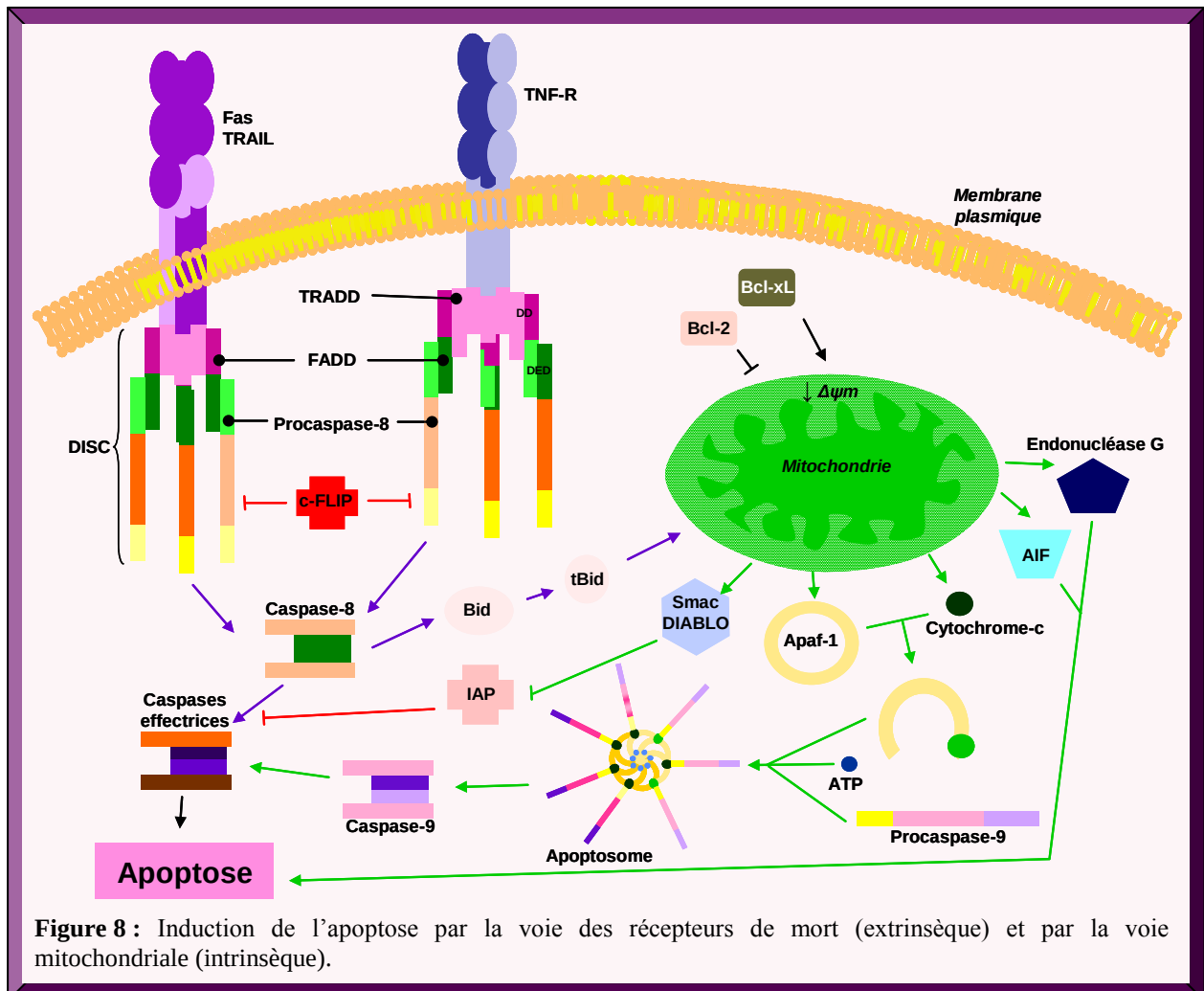
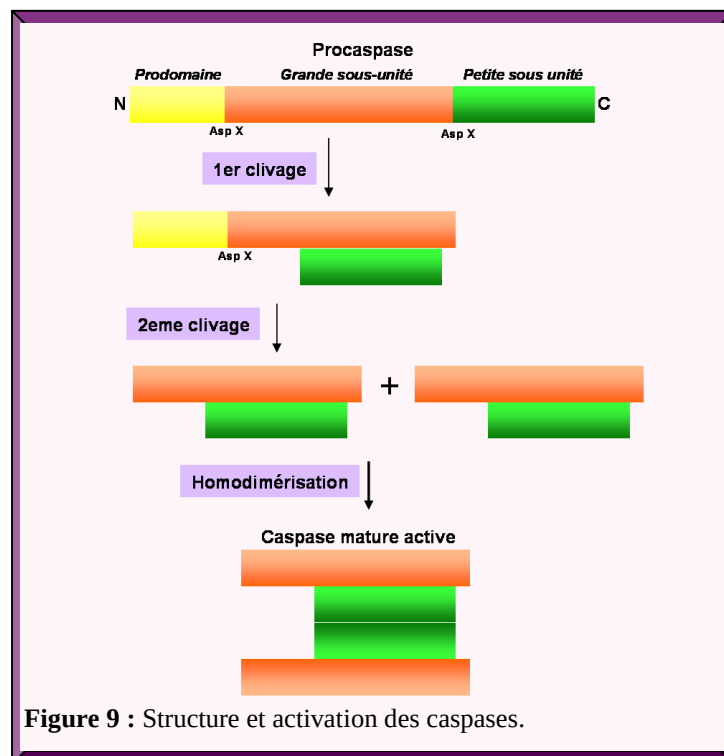


Figure 8 : Induction de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort (extrinsèque) et par la voie mitochondriale (intrinsèque).

Chacune des voies d'activation propage le signal apoptotique aux caspases. Elles sont les principales protéases impliquées dans la mort par apoptose et sont regroupées au sein d'une même famille dont le nom CASPASE signifie Cystein ASpartic Acid ProteASE [Alnemri 1996]. Ces enzymes sont des protéases à cystéine qui clivent spécifiquement leurs

substrats protéiques après un résidu acide aspartique. Il existe 14 caspases identifiées chez les mammifères et 8 d'entre elles jouent un rôle dans l'apoptose. Les autres sont des caspases dites inflammatoires impliquées dans des processus de maturation et de différenciation [Tschopp 2003]. Les caspases apoptotiques sont divisées en 2 groupes : les caspases initiatrices (caspases-2, -8, -9 et -10) qui interviennent lors de l'activation que ce soit par la voie extrinsèque (caspases-8 et -10) ou par la voie intrinsèque (caspases-2 et -9) et les caspases effectrices (caspases-3, -6, -7) qui sont elles-mêmes activées par les caspases initiatrices [Rupinder 2007].



Les caspases non actives, appelées procaspases, ont une structure commune comportant un prodomaine (clivé lors de l'activation), une petite sous unité (après clivage) et une grande sous unité (contenant le site actif) (pour revue [Korzeniewska-Dyl 2007]). Les caspases initiatrices comportent aussi un domaine CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) et celles spécifiques de la voie extrinsèque un domaine effecteur de mort ou DED (Death Effector Domain) (figure 9). Le DED permettra aux caspases-8 et 10 d'interagir avec les récepteurs de mort *via* les molécules adaptatrices FADD (Fas Associated Death Domain) ou TRADD (TNF R1-Associated Death Domain) et le domaine CARD formera les interactions entre Apaf-1 et la procaspase-9. La conversion des procaspases en caspases est réalisée par deux clivages successifs soit par les caspases elles-mêmes (auto-activation) soit par d'autres caspases (trans-activation). Le premier clivage sépare la petite sous unité du reste de la molécule et le deuxième clive le prodomaine (figure 9). Les caspases

doivent être sous forme d'homodimères pour être activées induisant un changement de conformation pour former le site de fixation du substrat et libérer le site actif. Les caspases ont plus d'une centaine de protéines cibles dont certaines sont impliquées dans la morphologie cellulaire (caténines, kératines, lamines,...), dans le contrôle du cycle cellulaire (p21) et dans la réparation de l'ADN (PARP).

2-1-3) Formation des corps apoptotiques

L'apoptose aboutit à de nombreux changements de la cellule : les pseudopodes se rétractent, le volume cellulaire diminue (picnose), la chromatine se condense et l'ADN se fragmente (karyorrhexis). A l'inverse, les organites cytoplasmiques subissent très peu, voire pas de modifications. De même, la membrane plasmique reste intacte jusqu'à la fin du processus apoptotique [Kroemer 1995]. Le bourgeonnement de la membrane plasmique et la condensation cellulaire aboutissent à la formation de fragments de cellule, nommés corps apoptotiques, qui contiennent une partie du cytosol et/ou un fragment d'ADN.

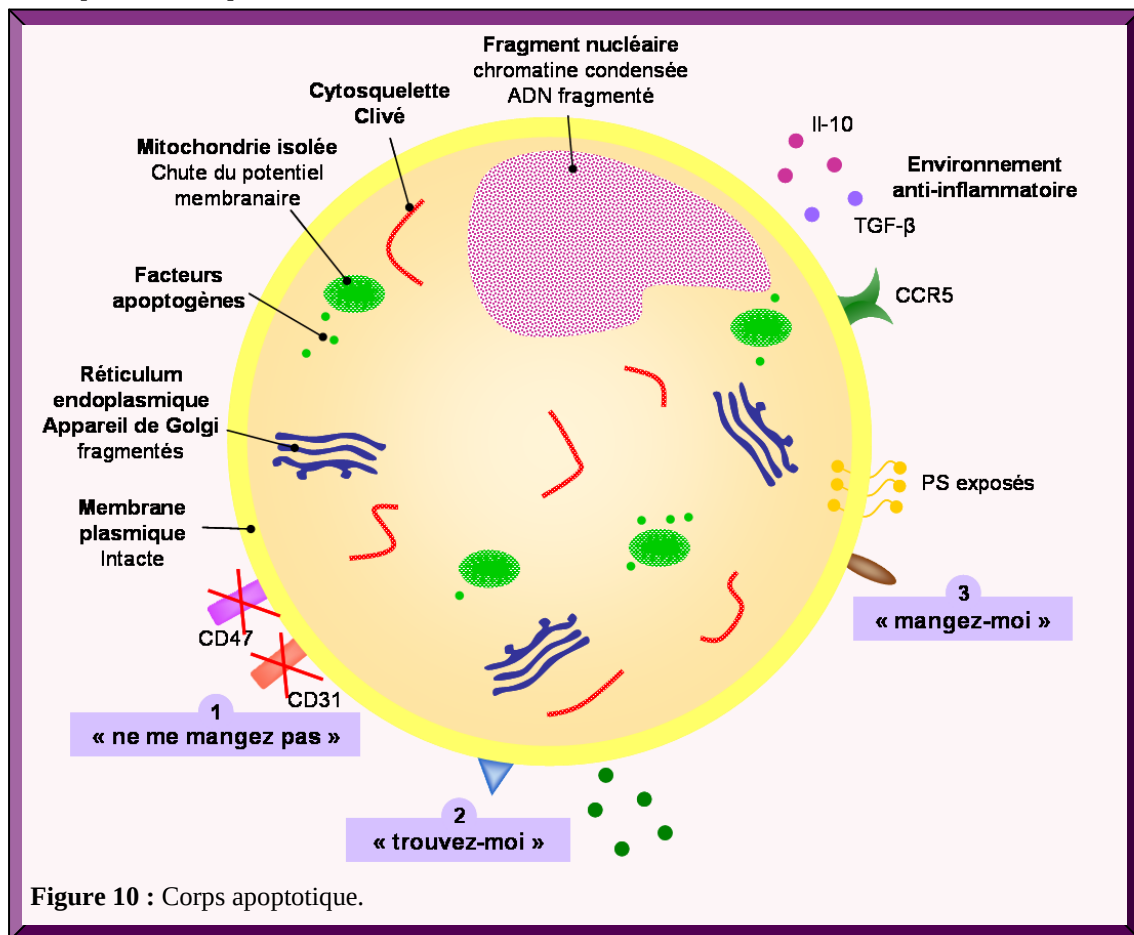
La perte de la morphologie cellulaire est due au clivage des protéines constituant le cytosquelette par les caspases (pour revue [Taylor 2008] et [He 2009]). Ainsi, l'actine elle-même est clivée ainsi que les protéines liées telles que les spectrines, l' α -actinine, la gelsoline et la filamine [Mollinedo 2003]. De même, les microtubules sont démantelés après clivage des tubulines et des protéines associées telles que Tau, les dynéines et la protéine p150^{Glued} ainsi que les filaments intermédiaires, la vimentine dans les cellules d'origine mésenchymateuse et les kératines dans les cellules épithéliales [Moss 2006]. Cependant, l'apparition de bourgeonnements membranaires nécessitant des filaments d'actine intacts, le démantèlement du cytosquelette doit être synchronisé. C'est la protéine ROCK1 (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1), un effecteur de la petite GTPase Rho (GTPase), qui synchronise ce démantèlement [Sebbagh 2001]. Les caspases activées suppriment l'extrémité C-terminale de ROCK 1 qui induit alors la phosphorylation de la myosine [Mills 1998]. Ainsi la contraction des faisceaux d'actine pousse le cytosol dans les régions de la cellule où le cytosquelette est affaibli créant des bourgeonnements. Les liaisons des cellules à la matrice extracellulaire et les liaisons entre cellules sont perdues après clivage des protéines intervenant dans l'adhérence, telles que p130 et la tensine, et des protéines d'interaction cellule-cellule, telles que la β -caténine (ne pouvant plus se lier à α -caténine), la γ -caténine, les cadhérines et les protéines associées aux desmosomes [Kim 2004b, Kook 2003].

Au niveau du noyau, les lamines et d'autres protéines de l'enveloppe nucléaire sont clivées par les caspases entraînant l'effondrement de la cage nucléaire. Cependant, le clivage des lamines n'est pas suffisant pour la fragmentation nucléaire [Croft 2005]. C'est la destruction conjointe des lamines et des mailles d'actine entourant le noyau qui aboutit à sa fragmentation. Par la suite, ce sont les microtubules qui dispersent les fragments nucléaires dans les bourgeonnements membranaires. Une des caractéristiques biochimiques majeures de l'apoptose est la dégradation de l'ADN par une endonucléase, appelée CAD/DFF40 (Caspase activated DNase/DNA Fragmentation Factor) [Nagata 2005]. L'activation de ces endonucléases se produit par la libération après clivage de leur inhibiteur (ICAD/DFF45 : inhibiteurs of CAD) par la caspase-3 [Enari 1998]. L'ADN génomique est clivé entre les nucléosomes ce qui génère des fragments d'ADN dont la taille est un multiple de 180 paires de bases, donnant un profil caractéristique de migration de l'ADN des cellules en apoptose dit « en barreaux d'échelle ». CAD ne lie que l'ADN double brin, préférentiellement dans des régions riches en A/T, fonctionne à pH neutre et génère des fragments d'ADN abritant des extrémités 5'-phosphate et 3'-hydroxyl [Nagata 2003]. Le clivage de la sérine/thréonine kinase DNA-PK (DNA-Activated Protein Kinase) par la caspase 3 participe aussi à la fragmentation de l'ADN [Mandal 1999]. Cependant, l'apoptose peut s'effectuer en absence de fragmentation d'ADN [Kroemer 2005]. La caspase 3 qui clive MST1 (Mammalian Sterile-20-like kinase 1) est responsable de la condensation de la chromatine car la protéine MST1 clivée est transloquée dans noyau où elle va phosphoryler l'histone 2B (H2B) entraînant la compaction de l'ADN [Ura 2001]. Enfin, de nombreux facteurs de transcription dont AP-2 α (Activating enhancer-binding Protein 2 α), BTF3 (Basic Transcription Factor 3), NFATC (Nuclear Factor of Activated T-Cells), NF κ B (Nuclear Factor-kappa B) et SP1 (Specificity Protein 1), des facteurs de traduction tels que eIFs (Eukaryotic translation Initiation Factor 1) et des protéines ribosomales comme RPP0 (Ribosomal Protein Predicted 0) et p70S6K (p70-ribosomal S6 kinase), peuvent être clivés par les caspases diminuant la transcription, la traduction et la synthèse de protéines [Luthi 2007].

Les organites cellulaires subissent aussi des changements. L'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique sont fragmentés et distribués par les microtubules dans les corps apoptotiques. La fragmentation de l'appareil de Golgi semble liée au clivage de plusieurs protéines, GRASP65 (Golgi ReAssembly Stacking Protein), impliquées dans sa formation, golgin-160, p115, p150, CD-IC (Cytoplasmic Dynein Intermediate Chain), la syntaxine-5 et la giantine [Lane 2002, Frank 2001]. Les mitochondries ont le potentiel membranaire qui chute, libérant les facteurs apoptogènes dans le cytosol. Ces organites qui sont organisés en réseau

interconnecté, sont dissociés et dispersés dans la cellule. Cette fragmentation n'est pas due aux caspases mais implique les protéines libérées dans le cytosol par la mitochondrie telles que Bax ou Bak [Adrain 2001].

Bien qu'elle reste intacte, la membrane plasmique subit des modifications biochimiques dont la plus importante est l'externalisation des résidus phosphatidylsérines. Ces phospholipides, normalement confinés dans le feuillet interne de la membrane plasmique, sont transloqués dans le feuillet externe de la membrane plasmique. Cette translocation impliquerait l'activation d'une scramblase responsable du basculement des phospholipides de la bicouche membranaire et l'inactivation d'une translocase qui retient normalement les aminophospholipides sur la surface interne de la membrane [Bratton 1997, Gleiss 2002]. ABC1 (ATP-Binding Cassette Transporter), impliqué dans le renouvellement des lipides de la membrane plasmique permet aussi l'exposition des phosphatidylsérines dépendante du calcium [Hamon 2000].



Il faut noter que la formation des corps apoptotiques n'est pas systématique mais permet aux grosses cellules d'être phagocytées. Ainsi, certaines petites cellules comme les thymocytes et les neutrophiles n'ont pas besoin d'être fragmentées pour être internalisées.

Les cellules apoptotiques subissent des changements qui permettent leur élimination par les cellules phagocytaires spécialisées. La première étape est la perte des signaux « ne me mangez pas » (don't eat me signals) exprimés par les cellules vivantes [Savill 2003, Hume 2008, Ravichandran 2007]. Ces signaux qui repoussent les cellules phagocytaires spécialisées telles que les macrophages sont constitués, entre autres, de deux protéines, les récepteurs CD31 et CD47. Lors de l'apoptose, l'expression de CD31 est inhibée et la structure de CD47 est modifiée [Vernon-Wilson 2007, Brown 2002, Oldenborg 2000]. Ainsi, les cellules phagocytaires ne sont plus repoussées. La deuxième étape est l'acquisition des signaux « trouvez-moi » (find me signals), comme la sécrétion de chimiokines qui permettent aux cellules phagocytaires professionnelles de migrer vers la cellule mourante [Truman 2008]. Enfin la dernière étape est l'acquisition des signaux « mangez-moi » (eat me signals) qui permettent aux cellules environnantes de capter et d'éliminer les cellules apoptotiques [Lauber 2003, Koizumi 2007]. Les phosphatidylsérines exposées à la surface externe de la membrane plasmique représentent le principal signal « mangez-moi ».

Au cours du processus apoptotique, les cellules sécrètent des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 (InterLeukine) et le TGF- β (Tumor Growth Factor) qui vont créer un microenvironnement immunosuppresseur en inhibant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α ou IL-1 β) par les cellules phagocytaires spécialisées et en neutralisant les facteurs pro-inflammatoires environnants tels que les chimiokines inflammatoires CCL3 et CCL5 par fixation à leurs récepteurs CCR5 [Gao 1998], [Chen 2001, Fadok 1998b, McDonald 1999, Ariel 2006].

2-2) Devenir des corps apoptotiques

2-2-1) Clairance des corps apoptotiques

Il existe deux voies principales d'élimination des corps apoptotiques : i) une élimination par desquamation comme dans le cas des cellules apoptotiques épithéliales de la peau et de l'intestin grêle, ii) une élimination par internalisation par des cellules phagocytaires spécialisées comme les macrophages ou les cellules dendritiques [Potten 1992, Erwig 2008].

In vivo, la clairance rapide des cellules apoptotiques par les macrophages est un processus physiologique fondamental dans l'homéostasie des tissus. En effet, outre les molécules anti-inflammatoires sécrétées par les cellules apoptotiques, la formation de corps

apoptotiques avec une membrane intacte prévient la libération des constituants intracellulaires et donc la réaction inflammatoire. De plus, des études démontrent que la régulation de la réponse inflammatoire par les cellules apoptotiques est exercée conjointement avec leur liaison aux macrophages, indépendamment de leur internalisation ultérieure [Cvetanovic 2004, Kim 2004a]. En effet, le contact des cellules apoptotiques avec les macrophages (ou l'incubation de macrophages avec des phosphatidylsérines) supprime la production de cytokines pro-inflammatoires et favorise la libération de cytokines anti-inflammatoires [Kim 2004]. Par la suite, la phagocytose des corps apoptotiques, extrêmement rapide par les macrophages, empêche la libération de protéases et d'autres médiateurs inflammatoires par les cellules apoptotiques ainsi que la nécrose secondaire de ces cellules, autre événement pro-inflammatoire [Savill 1993, Savill 1998, Kono 2008, Matzinger 2002]. Ce mécanisme d'élimination rapide ne provoque pas l'initiation d'une réponse immunitaire et par conséquent évite la survenue de pathologies auto-immunes [Nagata 2010].

2-2-2) Mécanisme de reconnaissance par les phagocytes

Les macrophages semblent être les principales et les plus efficaces des cellules phagocytaires dans l'élimination des cellules apoptotiques [Fadok 1998c, Wermeling 2007]. Ils expriment un grand nombre de récepteurs membranaires impliqués dans la clairance des cellules apoptotiques. La stimulation de ces récepteurs aboutit à la libération de facteurs solubles, comme les cytokines IL-10 ou TGF- β par les macrophages. Cependant, certaines sous-populations de cellules dendritiques sont aussi impliquées dans la capture des cellules apoptotiques comme démontré dans le processus d'élimination de cellules épithéliales intestinales après desquamation [Huang 2000, Krispin 2006]. Les mécanismes de clairance cellulaire impliquent des interactions récepteur-ligand. Le nombre de signaux de reconnaissance, de co-facteurs et de récepteurs impliqués dans le processus de phagocytose est très important et peut avoir un rôle aussi bien dans la reconnaissance et la fixation de la cellule cible que dans d'autres événements subséquents de l'internalisation [Hoffmann 2001]. Il existe différents types de molécules de reconnaissance ou signaux « mangez-moi » dont des sucres, des lipides, des protéines et des acides nucléiques.

- La phosphatidylsérine et ses récepteurs

La phosphatidylsérine est l'un des signaux le mieux étudié et le plus connu dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques par les macrophages [Fadok 1998a, Hoffmann 2001]. Le rôle des phosphatidylsérines en tant que signal de reconnaissance pour l'internalisation par les macrophages a été démontré avec les érythrocytes et a été mis en évidence par de nombreuses techniques. Par exemple, le masquage des phosphatidylsérines par l'annexine V, qui se lie spécifiquement aux phosphatidylsérines, le traitement par le DFMO (DiFluoroMéthylOrnithine) empêchant l'expression des phosphatidylsérines à la surface des cellules apoptotiques et l'utilisation de liposomes contenant de la phosphatidyl-L-sérine inhibant d'éventuels récepteurs par compétition ont été utilisés [McEvoy 1986, Krahling 1999, Fadok 2001].

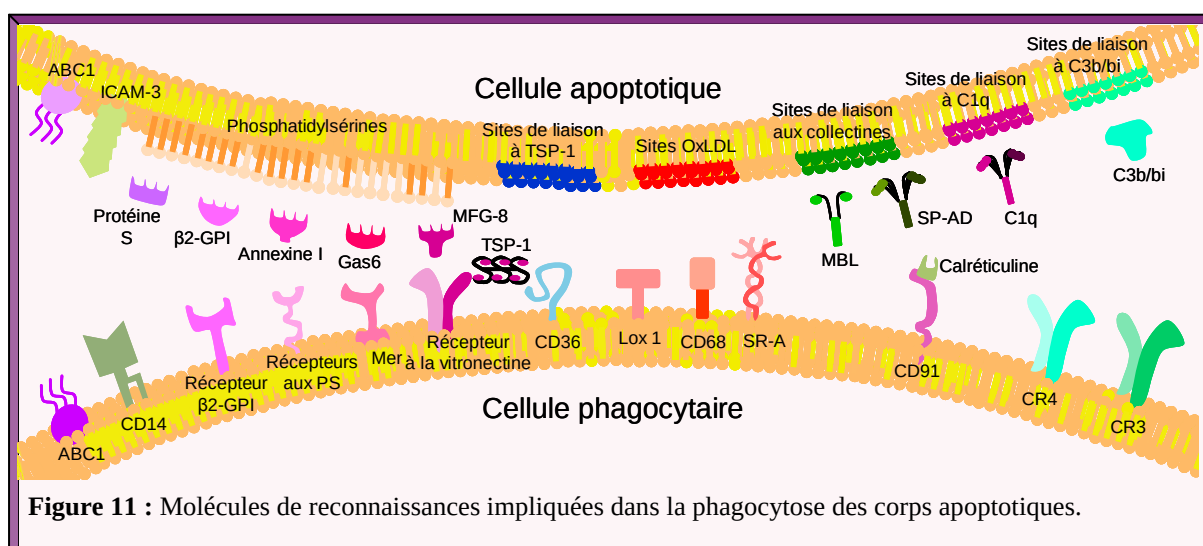
Des publications divergentes ont discuté de la participation et de l'importance d'un récepteur aux phosphatidylsérines, PSR (PhosphatidylSérines Receptor) dans la clairance des cellules apoptotiques. Une première étude a identifié le PSR comme une protéine de reconnaissance spécifique médiant la phagocytose des cellules apoptotiques via les phosphatidylsérines [Fadok 2000]. Cependant d'autres études, utilisant des souris invalidées pour le gène codant ce PSR, ont conclu que l'internalisation des cellules apoptotiques était normale chez ces souris [Bose 2004]. Récemment, plusieurs nouveaux candidats pour les PSR ont été rapportés incluant BAI-1 (Brain specific Angiogenesis Inhibitor-1), la stabiline-2, TIM-1 (T cell Immunoglobulin-and-mucin-domain Molecule 1) et TIM-4.

BAI-1 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G [Bjarnadottir 2004]. Ce récepteur forme un complexe trimérique avec Elmo (Engulfment and cell Motility) et Dock180 (Dedicator Of CytoKinesis) et active la voie Rac (Rat sarcoma homolog A related C3 botulinum toxin substrat) [Park 2007]. Sa fonction naturelle est inconnue mais la perte de son expression dans les glioblastomes semble promouvoir leur agressivité tandis que sa surexpression inhibe la néovascularisation et la formation des glioblastomes [Nishimori 1997, Kang 2006]. Cependant, la stimulation de la voie ELMO/Dock180/Rac, connue pour son rôle de régulation du cytosquelette recrute directement le complexe Rac-FEM favorisant l'internalisation des cellules apoptotiques [Park 2007].

La stabiline-2 est un récepteur qui possède de nombreuses fonctions. Elle a été décrite comme un récepteur à l'acide hyaluronique, puis comme un récepteur « scavenger » (capable de se lier aux bactéries) et enfin, comme un récepteur aux phosphatidylsérines, exprimé entre

autres par les macrophages, permettant une internalisation rapide (environ 5 minutes) des cellules apoptotiques [Park 2008c, Park 2008b, Park 2008a].

La famille des gènes TIM comporte 3 membres chez l'Homme : TIM-1, TIM-3 et TIM-4 [Park 2009a, Savill 2007]. Les protéines TIM jouent un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires [Freeman 2010]. La protéine transmembranaire appelée Tim4 renforce la capacité des fibroblastes à internaliser des cellules apoptotiques [Miyanishi 2007a]. Des expériences fonctionnelles menées *in vitro* et *in vivo* montrent le rôle de ces récepteurs dans la clairance des cellules apoptotiques. L'inhibition de l'un de ces récepteurs entraîne une diminution de la liaison et de l'internalisation des cellules apoptotiques *in vitro* [Park 2007, Park 2009b, Kobayashi 2007]. Cette diminution est partielle ce qui suggère une redondance dans la fonction des récepteurs. *In vivo*, l'injection de BAI1 solubles ou d'anticorps bloquants, anti-TIM-4 dans le péritoine diminue l'internalisation des cellules apoptotiques par les macrophages et stimule la production d'auto-anticorps [Park 2007, Park 2009a].



- Les autres molécules de reconnaissance et leurs récepteurs

La phosphatidylsérine est le signal de reconnaissance le plus documenté mais il n'est pas le seul possible. D'autres molécules participent à la reconnaissance et à l'adhérence des cellules apoptotiques aux phagocytes comme ABC 1 et I-CAM 3 (Intercellular Adhesion Molecule). Les protéines ABC 1 interagissent entre elles et participent à la transduction du signal permettant l'internalisation des cellules apoptotiques [Moynault 1998]. Le récepteur de la protéine d'adhérence I-CAM 3 est le CD14 dont la liaison entraîne une réponse inflammatoire.

De plus, certains sites, incluant les sites oxLDL (oxidized Low-Density Lipoprotein particules), les sites liant les protéines du complément, les sites liant les collectines et les sites

liant la thrombospondine (TSP-1), sont reconnus comme des signaux « mangez-moi ». Ces sites sont soit directement reconnus par un récepteur, soit ils lient des molécules de liaison elles-mêmes reconnues par des récepteurs. Les sites oxLDL sont reconnus par des récepteurs de la famille des scavenger tels que SR-A (Scavenger Receptor of class A), LOX1 (lectin-like oxLDL-receptor 1), CD68 (macrosialin, un récepteur scavenger de classe D) et CD36 (un récepteur scavenger de classe B). Le CD36 possède une grande variété de ligands et participe aussi à la reconnaissance des sites liant la thrombospondine en coopérant avec la TSP-1 et le récepteur de la vitronectine (intégrine $\alpha_v\beta_3$) dans la reconnaissance des cellules apoptotiques [Febbraio 2001, Savill 1992, Fadok 1992]. Il sert aussi de co-facteur au cours de la clairance des corps apoptotiques dépendant des phosphatidylsérines [Fadok 1998]. D'autres intégrines, les récepteurs CR3 (intégrine $\alpha_m\beta_2$) et CR4 (intégrine $\alpha_x\beta_2$), lient les facteurs du complément C1q et C3b/bi reconnaissant les sites liant les facteurs du complément [Mevorach 1998]. CR3 semble être impliqué dans la formation des expansions membranaires nécessaires à la phagocytose en favorisant la contraction des chaînes de myosine et la polymérisation de l'actine [Swanson 2008]. Les protéines du surfactant SP-A et SP-D (Surfactant Proteins A, D) ainsi que MBL (Mannose Binding Lectine) lient les sucres des sites de liaison aux collectines au récepteur CD91 complexé à la calréticuline [Savill 1992, Stuart 2005, Vandivier 2002, Duus 2010].

Certaines molécules de liaison comme le MFG-E8 (Milk Fat Globuline EGF factor 8), Gas 6 (Growth Arrest Specific 6), l'annexine I, la β_2 -glycoprotéine I et la protéine S se lient aux phosphatidylsérines et à leurs récepteurs respectifs. Le MFG-8, connu sous le nom de lactadhérine, est une glycoprotéine principalement associée aux cellules épithéliales mammaires. Cependant, MFG-E8 est sécrétée par certaines catégories de macrophages et de cellules dendritiques immatures [Hanayama 2002]. MGF-8 sert de pont entre les phosphatidylsérines et les récepteurs à la vitronectine à travers leur motif RGDS. Suite à la liaison de MFG-8, la voie d'internalisation dépendante de Rac1/DOCK180 est activée [Hanayama 2002]. Gas 6 est une protéine qui favorise la prolifération et la survie des cellules musculaires lisses vasculaires. Elle se lie au récepteur tyrosine kinase de Mer [Wu 2005, Ishimoto 2000]. L'annexine I, protéine inductible par les glucocorticoïdes est un médiateur anti-inflammatoire exprimé à la surface de certaines cellules apoptotiques [Arur 2003]. La génération de cellules annexine I -/- a confirmé l'importance fonctionnelle de cette protéine dans la résolution de l'inflammation et dans la clairance des bactéries [Hannon 2003]. La β_2 -glycoprotéine I ou apolipoprotéine H, est une glycoprotéine sérique ayant une forte affinité pour les phospholipides anioniques, qui inhibe la coagulation et favorise les liaisons antigène-

anticorps. La protéine S est une protéine sérique qui est aussi connue pour lier les récepteurs de la famille des protéines kinases [Anderson 2003].

Au total, une variété de récepteurs et de molécules est impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques. La plupart des récepteurs mis en évidence *in vitro*, révèle moins d'importance *in vivo* [Henson 2001b]. La raison de la multiplicité des récepteurs est due, d'une part aux différents types de tissus et de cellules spécifiques engagées dans l'internalisation, et d'autre part à leur fonction. Certains récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques, d'autres dans le réarrangement du cytosquelette nécessaires à l'internalisation et peuvent donner lieu à des réponses soit pro- soit anti-inflammatoires [Henson 2001a, Stuart 2005].

2-2-3) Internalisation et dégradation des cellules apoptotiques

Après la reconnaissance des cellules apoptotiques, différentes voies assurant le remodelage du cytosquelette sont activées et permettent l'internalisation des cellules apoptotiques par les cellules spécialisées (figure 12).

La première voie implique le récepteur scavenger LRP1 (Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1), une protéine adaptatrice GULP (enGULfment Adaptor PTB domain containing Protein) et les transporteurs ABC A1 et A7. LRP1 qui lie la calréticuline interagit directement avec une forme homodimerisée de GULP induisant l'activation de Rac 1 qui est une petite GTPase nécessaire à l'organisation temporelle et spatiale du cytosquelette d'actine. ABC A1 et ABC A7 sont impliqués dans cette voie mais leur rôle exact reste inconnu [Kinchin 2007].

La seconde voie est la voie dépendante du trimère Elmo/CrkII (Chicken tumour virus no. 10 Regulator of Kinase II)/Dock180 jouant un rôle dans le réarrangement du cytosquelette nécessaire à l'internalisation. Ces protéines fonctionnent ensemble pour activer la protéine Rac 1. Le mécanisme d'activation de Elmo/Dock180 est complexe, néanmoins il semble que CrkII recrute Elmo-Dock180 à la membrane [Kinchin 2007b]. Elmo peut être activé par une deuxième petite GTPase, la protéine RhoG, qui interagit avec Trio et dont la forme liée au GDP interagit avec Elmo. Elmo/Dock180 semble être un lien entre Rho-G, Rac 1 et une autre petite GTPase, Arf6 (ADP-Ribosylation Factor 6) [Ravichandran 2007]. La protéine Rac1 va induire la polymérisation de l'actine dépendant du complexe Arp2/3 (Actin-Related Proteins), activé par WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) et WAVE (WASP-family VEprolin-

homologous protein), et la déstabilisation des filaments d'actine *via* Pak1 (p21-Activated protein Kinase). Ceci permet le remodelage du cytosquelette d'actine et aboutit à la formation d'expansions membranaires qui entourent l'élément phagocyté et se referment en formant le phagosome. [Swanson 2008].

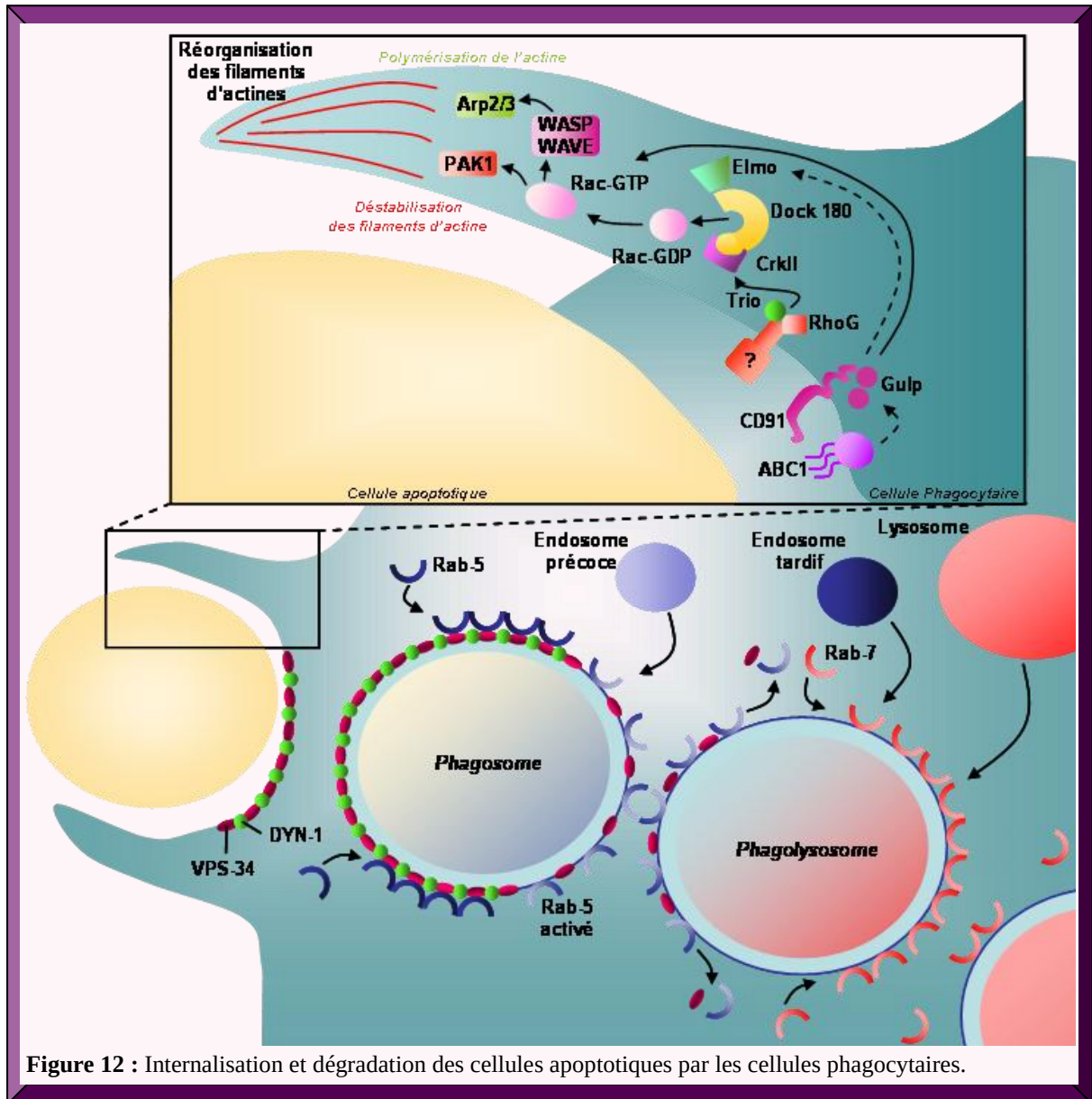


Figure 12 : Internalisation et dégradation des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires.

De grosses GTPases, les dynamines, qui pilotent le trafic des vésicules intracellulaires, jouent un rôle fondamental (en particulier DYN-1) dans l'acheminement des endosomes et des lysosomes vers le phagosome. Dyn-1 et la protéine VPS-34 (Vacuolar Protein Sorting 34), une phosphatidylinositol-3 kinase de classe III, sont des régulateurs essentiels de la maturation des phagosomes, car ils contrôlent aussi bien le recrutement que l'activité de nombreuses cibles impliquées dans la maturation du phagosome [Henry 2004, Rogers 2007, Kinchen 2008].

La maturation des phagosomes implique un remodelage de la membrane phagosomale et la fusion avec des organites intracellulaires incluant les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes (figure 12). De nombreuses molécules incluant PIP3 (Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphate), les petites GTPases RAB (Rab5 et Rab7) et l'ATPase de type V sont impliquées dans ce processus [Rink 2005]. La protéine Rab 5 facilite la fusion du phagosome avec les endosomes précoces, et Rab 7, la fusion avec les endosomes tardifs et les lysosomes. Quant à l'ATPase de type V, elle catalyse l'acidification de la lumière du phagosome ($\text{pH} < 5$) permettant l'activation d'hydrolases acides qui dégradent activement les protéines, les acides nucléiques et les lipides contenus dans le phagosome [He 2009].

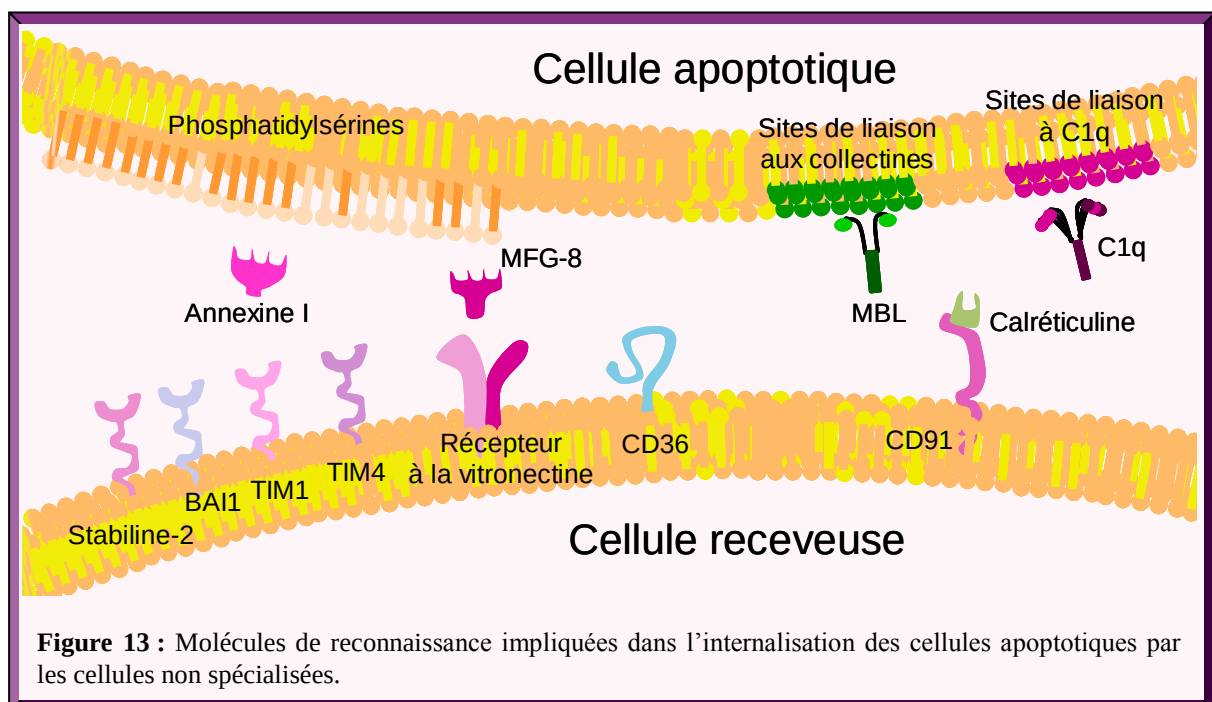
La dégradation des cellules apoptotiques commence avant l'internalisation grâce au processus apoptotique lui-même et continue après internalisation dans le phagolysosome. L'ADN partiellement digéré est dégradé en nucléotides par les nucléases lysosomales comme la DNase II α [Evans 2003, Shpak 2008, He 2009]. La DNase II génère des fragments d'ADN aux extrémités 5'-hydroxyl et 3'-phosphate à l'inverse de la CAD [Nagata 2003].

2-2-4) Mécanisme d'internalisation par les cellules non spécialisées

Les macrophages et les cellules dendritiques ne sont toutefois pas les seules cellules capables de phagocyter les cellules apoptotiques. En effet, d'autres types cellulaires ont la capacité de participer à l'élimination des cellules apoptotiques. Parmi les cellules phagocytaires non professionnelles, nous pouvons citer, par exemple, les cellules épithéliales pigmentaires de la rétine ou les cellules épithéliales mammaires [Erwig 2008]. Cependant, il existe des différences entre la clairance des cellules apoptotiques par des cellules spécialisées et par les cellules non spécialisées. La comparaison a été faite entre des macrophages et la lignée BHK (baby hamster kidney) qui est une lignée de cellules fibroblastiques ou des cellules épithéliales de la rétine [Parnaik 2000]. L'internalisation des cellules apoptotiques par les macrophages est très rapide et dure de 1 à 2 minutes alors que l'internalisation par les cellules BHK se déroule après plusieurs heures de contact. De plus, la dégradation des cellules apoptotiques internalisées dure 25 minutes à 1h45 maximum dans les cellules spécialisées contre plus de 2 heures dans BHK. Les différences observées peuvent avoir 2 explications.

Les cellules apoptotiques qui se dégradent au cours du temps, présentent de nouvelles molécules de reconnaissance lorsqu'elles sont en apoptose tardive. Les cellules non spécialisées peuvent alors reconnaître les signaux d'apoptose tardive et phagocyter ces

cellules apoptotiques. Cette hypothèse concorde avec le rôle physiologique de la phagocytose des cellules apoptotiques par des cellules non spécialisées qui n'a normalement lieu que lorsque les cellules phagocytaires ne sont pas suffisantes pour éliminer toutes les cellules apoptotiques présentes. En effet, l'incubation de cellules apoptotiques à un stade avancé de l'apoptose avec des BHK induit une internalisation plus rapide. De plus, les cellules internalisantes n'étant pas spécialisées dans la phagocytose, leur mécanisme d'internalisation serait plus long à mettre en place que chez les cellules phagocytaires professionnelles. Bien que la première explication ait été confirmée par l'équipe de Parnaik, la deuxième reste possible.



Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins hépatiques sont aussi capables d'internaliser des cellules apoptotiques [Dini 1995]. *In vitro*, après 15 minutes d'incubation des cellules apoptotiques avec des cellules endothéliales, 20 à 25% d'entre-elles ont adhéré. Ce pourcentage augmente à 30% après 1 heure de coculture. Le mécanisme de reconnaissance des cellules apoptotiques par les cellules endothéliales semble passer par les récepteurs spécifiques des glucides dont certains récepteurs scavenger, car l'incubation avec un cocktail de sucres (galactose, N-acetylglucosamine et mannose) induit 50% d'inhibition de l'adhérence. A l'inverse, l'adhérence peut être augmentée après une stimulation des cellules endothéliales par l'interleukine 1. Enfin, après 1 heure d'incubation, la majorité des cellules apoptotiques est observée dans le cytoplasme des cellules endothéliales au niveau des phagosomes [Dini 1995]. Les fibroblastes semblent utiliser les mêmes récepteurs pour internaliser des neutrophiles apoptotiques [Hall 1994]. En effet, l'internalisation des cellules

apoptotiques par les fibroblastes est un mécanisme impliquant des ions bivalents (inhibée par l'EDTA) et qui passe par deux types de récepteurs, des récepteurs aux sucres spécifiques (inhibition par le mannose et le fucose mais pas d'inhibition par le glucose, le N-acétylglucosamine et le galactose) et par le récepteur à la vitronectine (inhibition par le peptide RGDS). De plus, le taux d'internalisation est dépendant de la cellule non spécialisée puisque après 1 heure d'incubation avec des cellules apoptotiques, les fibroblastes en internalisent de 40 à 50% comparativement aux cellules endothéliales et aux cellules épithéliales qui en internalisent moins de 10% [Hall 1994]. Cependant, l'internalisation de cellules apoptotiques est possible par des cellules épithéliales mammaires aussi bien *in vitro* que *in vivo* [Monks 2005]. Les cellules épithéliales mammaires expriment différents récepteurs impliqués dans la phagocytose : le CD36, le récepteur à la vitronectine, le complexe calréticuline/CD91 et le PSR, mais ne les expriment pas tous (négatives pour les SR-A et CD14). Tous ces récepteurs semblent être impliqués dans la phagocytose des cellules apoptotiques car l'utilisation d'anticorps dirigés contre chacun de ces récepteurs diminue l'internalisation des cellules apoptotiques [Monks 2005]. Il semble que l'internalisation passe aussi par le récepteur à la vitronectine car l'ajout de MFG-E8 dans la coculture augmente la phagocytose des cellules apoptotiques. De plus, après phagocytose, ces cellules épithéliales mammaires, secrètent du TGF- β et inhibent le TNF α environnant comme les macrophages en présence de cellules apoptotiques [Monks 2005]. Enfin, deux autres études ont montré que la surexpression d'un récepteur aux phosphatidylsérines (BAI1, Stabiline-2, TIM1/4) dans des fibroblastes entraîne une augmentation de la liaison et de l'internalisation des cellules apoptotiques [Savill 2007, Kang 2006]. De plus l'annexine I est nécessaire à une internalisation efficace par les phagocytes non professionnels [Hannon 2003]. Les récepteurs et les molécules intervenant dans l'internalisation des cellules apoptotiques par les cellules non spécialisées sont représentés figure 13.

Certaines molécules impliquées dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par les cellules non spécialisées sont communes aux cellules professionnelles. Bien que les mêmes récepteurs soient activés, il est possible que le signal en aval ne soit pas le même. En effet, certains signaux induits par la liaison avec les cellules apoptotiques sont communs aux cellules spécialisées et non spécialisées (diminution de l'expression de ERK1/2, de p90^{RSK} et de NF- κ B et augmentation de l'expression de p38 et JNK1/2), alors que d'autres divergent (activation de AKT chez les macrophages et inhibition de AKT chez les cellules épithéliales) [Patel 2010]. Il apparaît donc que la signalisation liée à la reconnaissance de la cellule apoptotique soit conservée à l'inverse de la signalisation dépendante d'AKT, qui par ailleurs

n'a pas le même rôle dans les macrophages et dans les cellules épithéliales dans lesquelles la phagocytose est respectivement dépendante et indépendante d'AKT. Enfin, la réponse induite par des cellules nécrotiques et apoptotiques (augmentation de AKT, diminution de GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 beta et de BAD) est similaire dans les macrophages alors qu'elle est opposée dans les cellules épithéliales (apoptose : augmentation de GSK3 β et de Bad, diminution de AKT) [Patel 2010].

Bien que la phagocytose soit le mécanisme le plus couramment décrit dans l'internalisation des corps apoptotiques par les cellules spécialisées ou non, on ne peut pas exclure que d'autres mécanismes d'internalisation participent à l'élimination des cellules apoptotiques, en particulier pour les cellules phagocytaires non spécialisées. Ces autres mécanismes d'entrée dans la cellule, ou endocytose, peuvent être la macropinocytose, l'endocytose impliquant les molécules de clathrine ou les molécules de cavéoline et plusieurs formes d'endocytose moins courantes n'impliquant ni la clathrine ni la cavéoline (figure 14) [Conner 2003].

La macropinocytose qui permet l'internalisation du milieu extracellulaire est caractérisée par l'évagination de la membrane plasmique impliquant les GTPases Rho et Rac et le cytosquelette d'actine [Swanson 2008]. Ces évaginations se referment et forment des vésicules qui sont internalisées dans le cytoplasme et fusionnent avec les endosomes précoces et tardifs puis avec un lysosome afin d'être dégradées comme lors du processus de phagocytose [Mayor 2007, Swanson 2008]. La caractéristique essentielle différenciant la macropinocytose de la phagocytose est la formation des invaginations membranaires. En effet lors de la phagocytose, ces invaginations sont étroitement liées à la cellule apoptotique à l'inverse de celles formées lors de la macropinocytose [Swanson 2008]. La macropinocytose participe à la clairance des corps apoptotiques par reconnaissance par le récepteur CD91 couplé à la calréticuline *via* les molécules de liaison C1q et MBL [Ogden 2001].

L'endocytose à clathrine, comme son nom l'indique, implique la formation de vésicules recouvertes de molécules de clathrine [Brodsky 2001]. Les molécules de clathrine sont recrutées à la membrane plasmique grâce aux protéines AP (Adaptator Protein) qui sous forme déphosphorylées, permettent l'appariement de clathrines et leur polymérisation en une cage de structure polyédrale. Les protéines du cytosquelette, telles que l'actine et la dynéine sont impliquées dans ce type d'endocytose [Kaksonen 2006]. La vésicule formée fusionne avec un endosome précoce dans lequel une partie de la vésicule est recyclée, l'autre partie est adressée à l'endosome tardif afin d'y être dégradée [Mallet 2000]. En général, les vésicules

internalisées par ce mécanisme sont de petit diamètre (environ 120nm), toutefois dans certains cas elles peuvent atteindre une taille de 5µm [Conner 2003a, Piehl 2007].

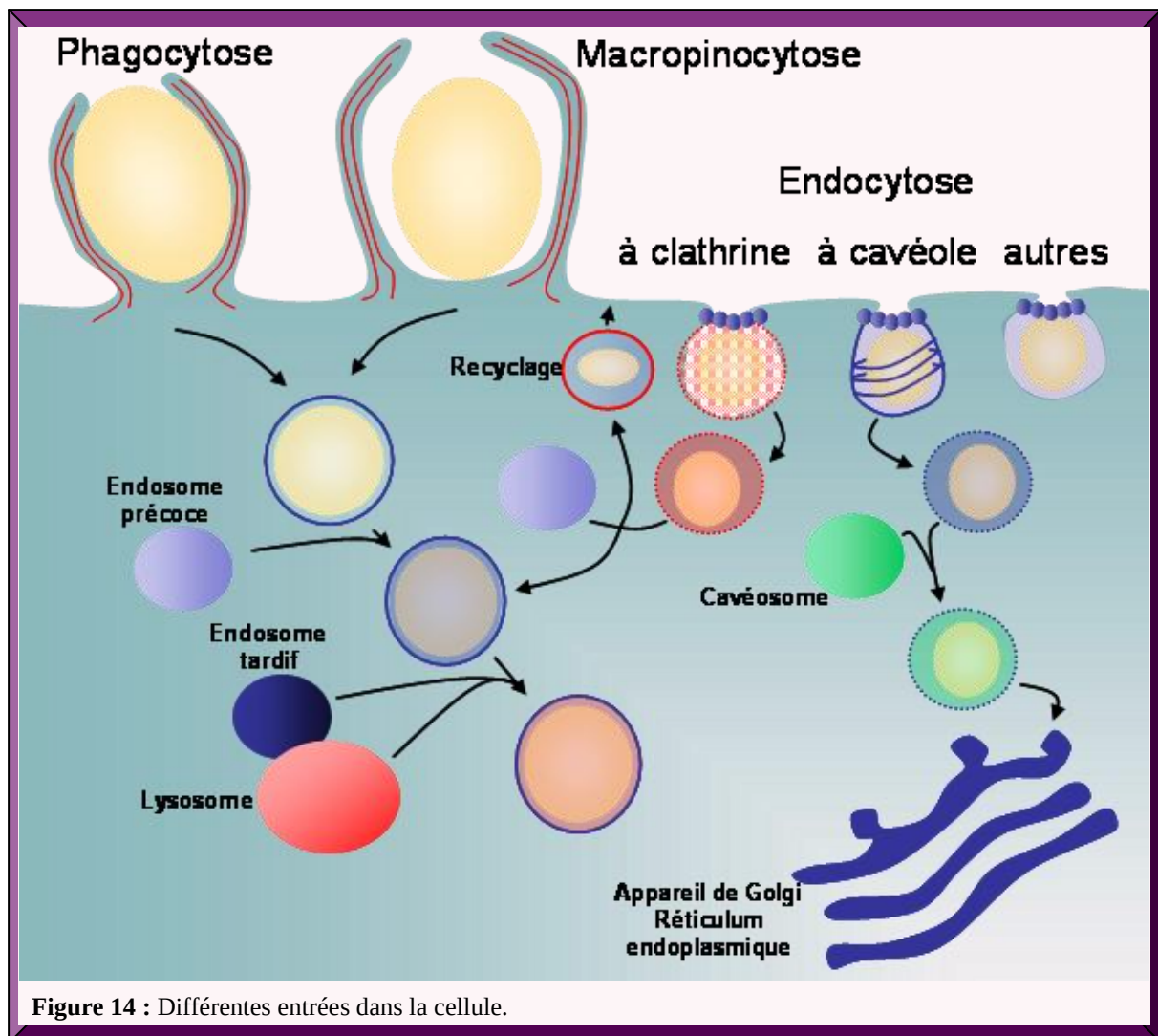


Figure 14 : Différentes entrées dans la cellule.

L'endocytose impliquant des cavéoles est formée par la liaison de molécules cargo au sein des radeaux lipidiques. De nombreuses protéines kinases ainsi que les protéines du cytosquelette telles que l'actine et la dynamine II participent à la formation des vacuoles [Conner 2003]. Les cavéolines sont recrutées au niveau de la membrane de la vacuole. Contrairement aux autres formes d'endocytose, ces vacuoles fusionnent avec un compartiment nommé cavéosome à pH neutre et non avec des endosomes à pH acide. Les vésicules sont ensuite adressées à l'appareil de Golgi ou au réticulum endoplasmique [Nabi 2003]. Comme l'endocytose à clathrine, l'endocytose à cavéole permet l'internalisation de petits éléments d'environ 60nm.

Tous les mécanismes d'internalisation décrits de ce chapitre sont potentiellement impliqués dans le THG. La littérature ne décrivant jamais le processus d'internalisation

impliqué dans le THG, une partie des travaux menés dans cette thèse vise à identifier quel(s) mécanisme(s) d'internalisation aboutit à la transformation par THG.

2-3) Observation de l'internalisation des cellules apoptotiques : utilisation d'un système référencé en position

2-3-1) Système référencé en position

Pour suivre l'internalisation de particules ou de cellules apoptotiques deux procédés sont majoritairement utilisés : la vidéomicroscopie en chambre thermostatée et le repositionnement sur le site d'observation à chaque temps à l'aide d'une platine motorisée. Cependant ces deux systèmes comportent des inconvénients. La vidéomicroscopie nécessite la monopolisation d'un appareil volumineux non disponible durant toute la durée de l'expérience. Lors d'un repositionnement, le référentiel de position étant inclus à la platine motorisée, le repositionnement des supports de culture sur la platine, peut fausser les observations à l'échelle cellulaire ou subcellulaire.

L'équipe de Patrick Sandoz, du département d'optique de l'Institut FEMTO-ST (LOPMD : équipe « Nanométrie et Microsystèmes pour les Sciences du Vivant ») a mis au point un procédé tout à fait original qui consiste à intégrer un référentiel de position, une mire pseudopériodique (figure 15A), gravée à la surface d'une lamelle couvre-objet [Sandoz 2002, Sandoz 2007]. Le codage de la mire est basé sur deux systèmes de codage :

- un codage binaire, représenté par la présence ou l'absence de points gravés qui, une fois décrypté, permet d'obtenir la position absolue c'est-à-dire le numéro de la colonne et de la ligne (figure 15B),

- un codage continu grâce à la distance constante entre les points qui peut être représenté par une sinusoïde d'une période de 4 micromètres. Cette propriété permet le calcul de phase par la transformée de Fourier traduite par deux équations complexes qui donne une précision de repositionnement de 10 nm (figure 15C).

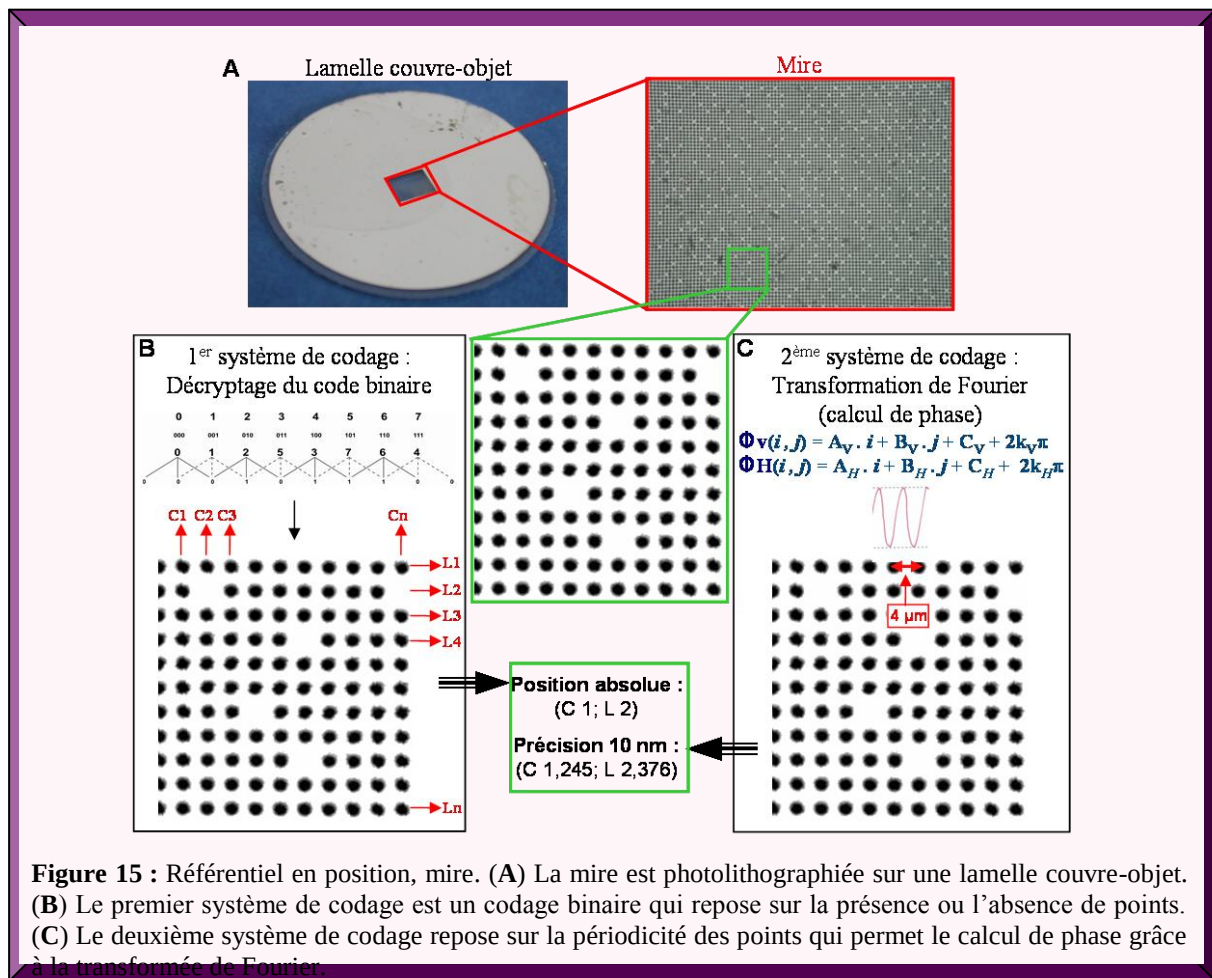


Figure 15 : Référentiel en position, mire. (A) La mire est photolithographiée sur une lamelle couvre-objet. (B) Le premier système de codage est un codage binaire qui repose sur la présence ou l'absence de points. (C) Le deuxième système de codage repose sur la périodicité des points qui permet le calcul de phase grâce à la transformée de Fourier.

2-3-2) Fabrication de la mire

Une mire est fabriquée par photolithographie, un processus couramment utilisé en microfabrication (figure 16). La photographie nécessite un masque qui est une lame de verre sur laquelle est reproduit la mire. Ce masque permet de photolithographier une lamelle de verre recouverte d'une couche de 700 nm de résine, la TI09XR. Cette résine, déposée de façon homogène sur la lamelle de verre grâce à la vitesse de rotation d'une tournette (4000 rotations par minute), est un substrat sensible aux rayonnements UV. Le masque permet de laisser passer ou non une dose de 45 mJ/cm² sur cette couche. La lamelle de verre est ensuite traitée par chauffage (1 minute à 130°C). Cette étape rend la résine préalablement exposée aux UV inerte et par conséquent insensible aux UV et aux lavages ultérieurs permettant normalement son élimination. La lamelle est alors exposée à une nouvelle irradiation UV de 190 mJ/cm² en absence de masque. Ainsi les zones inertes, exposées aux premières irradiations UV, ne subissent pas de changements contrairement à celles nouvellement exposées. La lamelle est ensuite immergée dans un développeur, le MF-26A pendant 35

secondes, ce qui permet l'élimination de la résine photoexposée (à la 2^{ème} exposition). Seules les zones inertes restent adhérentes à la lamelle ce qui correspond au négatif des motifs de la mire. La lamelle est alors métallisée (recouverte d'une fine couche de métal de 0 à 100 nm) par évaporation d'aluminium dans une chambre vide. Le métal se dépose de façon homogène aussi bien directement sur la lamelle de verre que sur le substrat inerte. Le motif de la mire est obtenu en positif après la dissolution de la résine inerte dans un solvant, l'acétone, couplée à des ultrasons afin d'améliorer l'élimination de la résine. La mire est ainsi gravée sur la lamelle et prête à être utilisée.

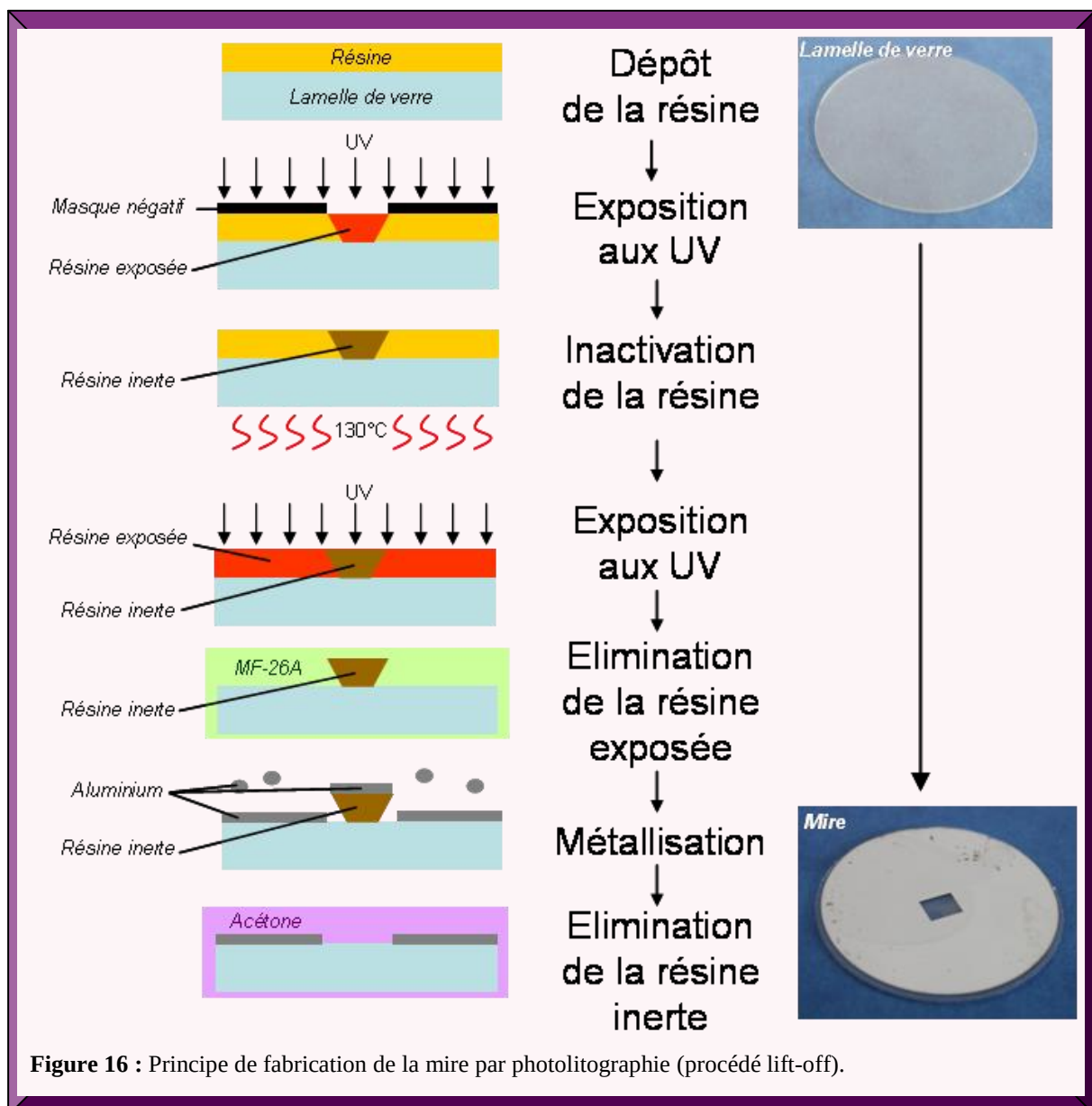


Figure 16 : Principe de fabrication de la mire par photolithographie (procédé lift-off).

III) Transformation cellulaire

Nous avons vu dans le premier chapitre que le transfert horizontal d'oncogènes induit la transformation de cellules receveuses invalidées pour la protéine p53. Dans ce contexte, il est nécessaire de comprendre quels sont les rôles des oncogènes dans la transformation tumorale classique, en général et dans le cas du cancer du col de l'utérus en particulier, et comment la protéine p53 permet de protéger la cellule de cette transformation.

3-1) Transformation tumorale

La transformation tumorale est un processus complexe se déroulant en plusieurs étapes qui impliquent l'activation de proto-oncogènes (gènes qui après des modifications favorisent la transformation) mais aussi l'inactivation d'anti-oncogènes (gènes normalement impliqués dans la protection de la cellule contre la transformation cellulaire).

3-1-1) Cas général : transfert vertical d'oncogènes

L'homéostasie tissulaire, provient de l'équilibre entre de multiples processus cellulaires tels que la prolifération, la mort, la différenciation, la sénescence ou l'angiogenèse. La formation d'une masse tumorale résulte de la perte de cet équilibre qui est due à la mutation d'un ou plusieurs gènes impliqués dans l'un de ces processus vitaux (pour revue [Hanahan 2000]).

La formation d'un cancer est un processus multi-étapes incluant l'initiation, la promotion puis la progression tumorale (Figure 17) [Vogelstein 2004]. Certains facteurs intrinsèques (susceptibilité héritée) et extrinsèques (agents mutagènes) peuvent favoriser l'initiation tumorale. Des agents mutagènes divers (physiques, cliniques, viraux) sont responsables de la mutation de la cellule d'origine. La promotion consiste en la perte des mécanismes de contrôle de la prolifération de la cellule initiée, tels que les points de contrôle du cycle cellulaire, permettant une prolifération aberrante mais aussi l'inhibition de la sénescence et de l'apoptose des cellules prémalignes. La promotion est entre autre supportée par les cellules stromales qui fournissent les éléments nutritifs et les facteurs de croissance nécessaires à une prolifération accélérée. Ces cellules stromales participent aussi à la progression tumorale en favorisant l'angiogenèse et en facilitant l'invasion des cellules

tumorales. En effet, l'angiogenèse et l'invasion mais aussi la perte de la différenciation et de l'adhérence sont des avantages qu'acquièrent les cellules tumorales lors de mutations supplémentaires durant la progression. Ainsi, une cellule devient tumorale après l'acquisition d'au moins sept mutations indépendantes.

Les mutations ne sont pas les seuls événements qui permettent aux cellules d'inactiver ou d'activer des gènes ou des protéines nécessaires à leur progression en cellule tumorale. Les facteurs épigénétiques qui altèrent la structure de la chromatine, peuvent jouer un rôle clé dans le devenir de la cellule [Balmain 2003]. Ainsi, le cancer peut être considéré à la fois comme une maladie génétique et comme une maladie épigénétique.

Seul 1% des gènes humains sont « tumoraux » après mutation et dans 90% des cas ces mutations ont lieu dans des cellules somatiques. Les mutations qui touchent les cellules germinales, comme BRCA1 et BRCA2 entraînent des prédispositions au cancer chez la descendance de l'individu. Ces mutations sont à l'origine de certaines leucémies, lymphomes et tumeurs mésoenchymateuses. Les modifications génétiques somatiques peuvent être dues à la délétion d'un gène, d'une partie ou d'un chromosome entier, à une recombinaison chromosomique, à l'amplification d'un gène et à une mutation ponctuelle [Balmain 2003].

Deux événements épigénétiques sont associés au cancer, la méthylation des îlots CpG dans les promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs en particulier par ajout de groupements méthyl sur les cytosines par les DNA méthyl transférase, empêchant la transcription des gènes et la (des)acétylation des histones par les HDAC (Histone Deacetylase) et les HAT (Histone Acetyl Transferase) qui changent la conformation de la chromatine et donc la transcription des gènes [Kanwal 2010].

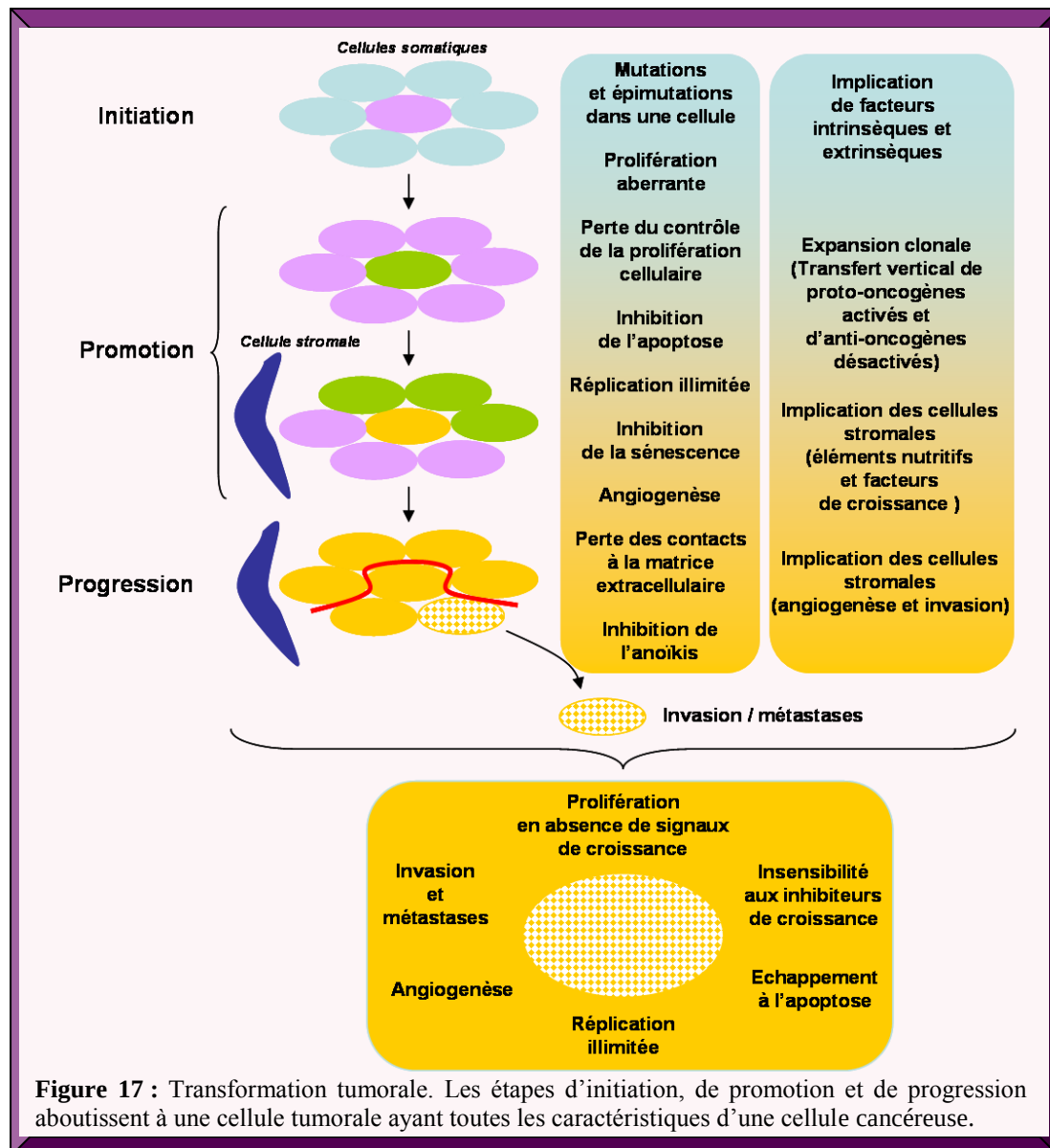
Lors de l'initiation, la première mutation peut avoir lieu dans un proto-oncogène ou un gène suppresseur de tumeur [Futreal 2004]. Il existe 6 grandes classes de proto-oncogènes (dont dérivent les oncogènes) potentiellement impliqués dans le processus de carcinogenèse : les facteurs de croissance (Sis), les récepteurs à activité tyrosine kinase (par exemple HER1/Erb B1, HER2/Erb B2 et Kit), les protéines liant le GTP (Ras), les protéines à activité tyrosine kinase (Src, Abl), les protéines nucléaires (Jun, Fos, Erb A, Myc, Myb) et les protéines impliquées dans l'apoptose (Bcl2, Fas) [Broach 1997, von Lintig 2000, Whitehead 2005, Maeno 2006].

Les anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs, sont entre autres, des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. Il existe 3 classes de gènes suppresseurs de tumeurs : les « gatekeeper » qui inhibent la croissance cellulaire ou induisent la mort

cellulaire, les « caretakers » assurant le maintien de l'intégrité du génome qui sont impliqués dans le contrôle de la réplication et dans la réparation à l'ADN et les « landscapers » qui participent aux interactions de l'épithélium avec le mésenchyme [Kinzler 1997, Kinzler 1998]. Le premier gène suppresseur découvert est le gène de susceptibilité au rétinoblastome (Rb) et celui dont l'action est majoritairement inhibée dans les cancers est le gène TP53. Les modifications génétiques et épigénétiques peuvent directement modifier ces protéines ou leur expression mais peuvent aussi être dirigées contre les protéines en amont ou en aval de celles-ci comme la cycline D, CDK4 (cyclin-dependent kinase) ou p16 pour la voie pRB et ARF (Alternative Reading Frame), MDM2 (murine double minute) ou p21 pour la voie p53. D'autres anti-oncogènes peuvent être mutés tels que APC (Adenomatous Polyposis Coli gene) dans les adénocarcinomes coliques, gastriques et pancréatiques, le facteur de transcription WT-1 (Wilms' Tumour gene 1 protein) dans certaines tumeurs rénales ou encore NF-1 (NeuroFibromatosis Type 1) impliqué dans l'activation de Ras.

La combinaison de mutations ou d'épimutations dans ces deux classes de gènes, lors des divisions successives, ou expansion clonale, conduit au développement d'une cellule cancéreuse (figure 16) [Tomlinson 1996]. La théorie de l'évolution clonale est un ancien concept selon lequel la pression de sélection du micro-environnement favorise la croissance des clones cellulaires ayant acquis des mutations qui favorisent leur prolifération et leur survie [Nowell 1976]. Suivant cette théorie, toutes les cellules d'une masse tumorale sont génétiquement identiques et la malignité est due à une série linéaire d'événements. Ainsi, la formation d'une tumeur résulte du transfert de mutations ou d'épimutations d'une cellule mère précancéreuse à ses cellules filles qui acquièrent elles-mêmes des mutations supplémentaires, les rendant cancéreuses. Ainsi, la formation d'un cancer est due au transfert vertical d'oncogènes.

Cependant, la division des cellules étant nécessaire pour que ces changements génétiques et épigénétiques induisent un cancer, un grand nombre des cellules adultes non répliquatives, comme les cellules nerveuses, n'y sont pas sensibles [Futreal 2004]. De plus, la progression tumorale est beaucoup plus complexe que la théorie clonale car les cellules environnant la tumeur vont aussi participer à la transformation tumorale [Rangarajan 2004].



Six changements majeurs caractérisent la transformation tumorale : la capacité à proliférer en absence de signaux mitogènes exogènes, l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance, la résistance à la mort cellulaire programmée, la réplication illimitée (immortalité), l'angiogenèse et la capacité à envahir les tissus environnants et éventuellement le potentiel métastatique (figure 17) [Hanahan 2000]. Ces caractéristiques typiques des cellules cancéreuses semblent apparaître suivant une séquence potentielle. La prolifération en absence de facteurs de croissance, l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance sont acquis au début du développement tumoral de même que l'échappement à l'apoptose nécessaire à une prolifération aberrante non contrôlée et l'acquisition d'une réplication illimitée. A ce stade, les cellules sont immortalisées mais non encore transformées.

Ces cellules à prolifération accrue, ont un besoin en nutriments qui augmente et qui nécessite des mutations supplémentaires favorisant l'angiogenèse et permettant

l'échappement à la sénescence induite par une absence en nutriments. L'invasion des tissus environnants est favorisée par la perte des contacts à la matrice et permet l'échappement à la mort induite par la perte d'adhérence ou l'anoïkis. Ces cellules devenues tumorales sont alors capables d'envahir les tissus environnants puis de passer dans le système circulatoire afin de coloniser d'autres organes ou d'autres tissus et ainsi former des métastases.

Des virus peuvent participer à la transformation cellulaire par l'expression d'oncogènes viraux tels que le virus EBV (certains lymphomes et le carcinome du nasopharynx), les virus des hépatites B et C (certains carcinomes hépatocellulaires), l'HTLV-I (Human T-lymphotropic virus-I ; leucémie et lymphome à cellules T), KSHV (Kaposi's Sarcoma HerpesVirus ; Sarcome de Kaposi), le virus de Merkel (carcinome à cellules de Merkel) [Moore 2010]. Le virus simien 40 (SV40) peut aussi induire une transformation tumorale. SV40 code l'antigène T de SV40 (SV40LT) et l'antigène t de SV40 (SV40ST). Ces oncoprotéines virales sont capables de se lier à de nombreuses protéines. Cependant la capacité de SV40LT à interagir et à désactiver les protéines suppresseurs de tumeur p53 et pRB est probablement sa fonction la plus importante dans la transformation [Boehm 2005]. Quant à la protéine SV40ST, elle possède un domaine carboxy-terminal unique qui lie la sérine-thréonine phosphatase hétérotrimérique PP2A (Protein Phosphatase 2A) connue pour augmenter la prolifération cellulaire [Hahn 2002]. Les papillomavirus à haut risque sont aussi des virus transformants (cf. partie 3-1-2).

3-1-2) Cas du cancer du col : implication des HPV

Les papillomavirus humains (HPV : Human PapillomaVirus) à haut risque du genre α sont responsables de 99,7% des cancers du col de l'utérus [zur Hausen 1999, Walboomers 1999]. Ces virus qui comportent plus de 100 types sont classés selon leur potentiel oncogène induisant ou non le développement de lésions précancéreuses du col de l'utérus pouvant évoluer vers un cancer invasif [de Villiers 2004, Burk 2009, Van Doorslaer 2010, Bernard 2010]. Parmi eux, deux HPV retrouvés dans la muqueuse génitale, les HPV de type 16 et 18 sont responsables de plus de 80% des cancers invasifs du col de l'utérus en France et 70% dans le monde [Clifford 2003, Pretet 2008]. Cependant, l'infection par les HPV à haut risque est nécessaire mais pas suffisante pour induire des lésions pré-cancéreuses [zur Hausen 2000]. En effet, seules les infections persistantes conduisent à l'acquisition d'un phénotype malin après plusieurs décennies [zur Hausen 2002]. Cette persistance de l'infection est influencée par de

nombreux facteurs liés à l'hôte, à l'environnement et au virus mais pourrait être aussi favorisée par le transfert horizontal de l'ADN d'HPV dans des cellules réservoirs.

Les HPV sont de petits virus nus (de 45 à 55 nm de diamètre) dont le génome viral est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire et circulaire d'environ 8000 paires de bases codant des protéines précoces (Early), E1 à E7 non structurales et des protéines tardives (Late) L1 et L2 qui permettent l'assemblage final du virus et la stabilisation de la capside. Les protéines E1 et E2 sont impliquées dans la réplication extra-chromosomique du génome viral et E4 dans la maturation des particules virales et la désorganisation du cytosquelette [Doorbar 1986, Ustav 1991, Stubenrauch 2001]. La protéine E3 n'a pas de fonction connue. La protéine E2 est aussi un facteur de transcription qui régule la transcription des oncogènes viraux E6 et E7 [Desaintes 1996]. Il a été démontré que la majorité des cancers invasifs du col de l'utérus comporte des séquences d'ADN d'HPV-HR intégrées au génome de la cellule hôte. L'inactivation de E2 suite à l'intégration du génome d'HPV conduit à une surexpression des protéines E6 et E7 [Schwarz 1985, Romanczuk 1992, Jeon 1995]. Les protéines E6 et E7 sont des petites protéines localisées majoritairement dans le noyau de la cellule qui coopèrent dans le développement de cancers induits par les HPV (figure 18) [Nomine 2006, Katich 2001]. Elles sont capables d'induire l'immortalisation de kératinocytes primaires et participent à chaque étape de la transformation cellulaire [Hawley-Nelson 1989, Munger 1989]. La protéine E5 est elle aussi impliquée dans la carcinogenèse induite par les HPV à haut risque; elle est absente chez les HPV-BR et chez les HPV du genre bêta [Schlegel 1986].

Dans une cellule normale, les protéines à poche, p105^{Rb}, p107 et p130 inhibent l'activité transcriptionnelle des protéines E2F1 à E2F5 en liant leur domaine de transactivation [Harbour 2000]. En début de phase G1, p105^{RB} est phosphorylée par les complexes CDK4/6/cycline D, permettant la dissociation du complexe pRB-E2F. E2F libérée induit alors l'expression des gènes spécifiques de la phase S tels que ceux codant la cycline E et la cycline A [DeGregori 2006].

La prolifération cellulaire est favorisée par la protéine E7 des HPV-HR qui interagit avec les protéines à poche grâce à leur motif amino-terminal conservé LXCXE [Munger 2004]. L'interaction de la protéine E7 avec p105^{Rb} hypophosphorylée entraîne sa dégradation par le protéasome. La protéine p105^{Rb} n'interagissant plus avec les facteurs de transcription E2F, il s'en suit une entrée prématurée en phase S et la synthèse d'ADN [Munger 2004]. La protéine E7 inactive les HDAC (histones déacétylases) favorisant la transcription par E2F et s'associe à

p300/CBP (CREB binding protein) et p/CAF (facteur associé à p300/CBP), qui participent à l'activation transcriptionnelle médiée par E2F [Frolov 2004, Brehm 1999].

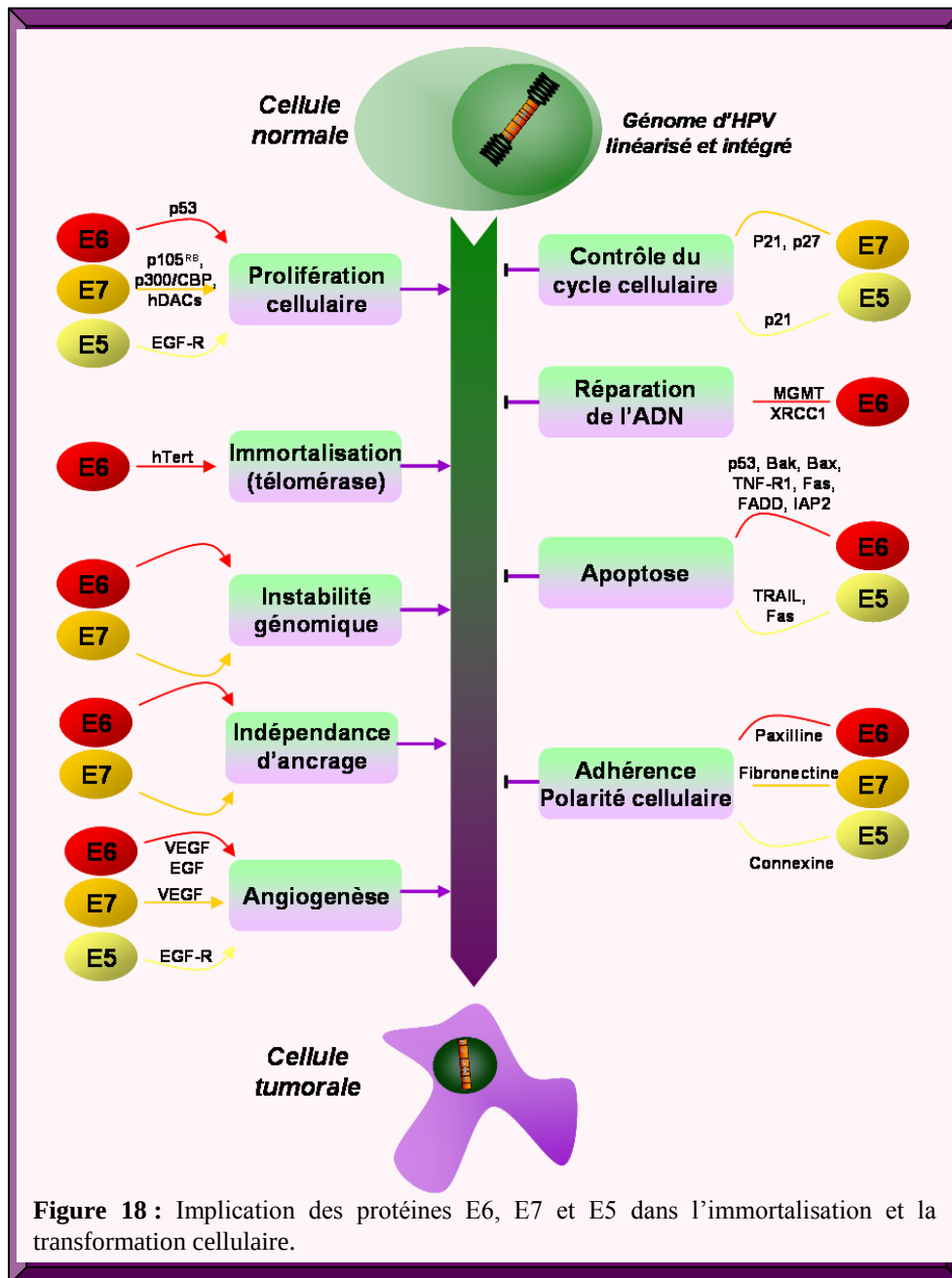


Figure 18 : Implication des protéines E6, E7 et E5 dans l'immortalisation et la transformation cellulaire.

La protéine E7 se lie aussi par son domaine carboxyterminal aux inhibiteurs des CDK, les protéines p21^{Cip1} et p27^{Kip1}. p21 et p27 ne sont alors plus capables de bloquer l'activité de CDK2 qui forme un complexe avec les cyclines E et A favorisant l'entrée et la progression en phase S [Deshpande 2005]. La conséquence d'une prolifération aberrante comme celle induite par E7 est une augmentation du taux de p53 aboutissant à l'apoptose de la cellule [Demers 1994]. Cependant lors de l'infection par les HPV à haut risque la protéine E6 est capable de contourner ce mécanisme de défense en interférant avec les fonctions de p53.

La protéine E6 facilite la dégradation de l'anti-oncogène p53 par le protéasome via l'ubiquitine ligase cellulaire E6AP (E6 Associated Protein) en formant un complexe trimérique avec ces protéines [Huibregtse 1991, Scheffner 1993]. E6 est aussi capable d'inhiber directement l'activité transcriptionnelle de la protéine p53 en se liant à son domaine de liaison à l'ADN [Lechner 1994]. L'interaction de la protéine E6 avec les protéines p300/CBP bloque leur capacité à acétyler p53 diminuant alors sa stabilité [Zimmermann 2000]. La fonction de la protéine E6 renforce donc l'effet de la protéine E7, en inhibant l'arrêt de cycle et l'apoptose dépendante de p53. La protéine E6 bloque aussi la voie apoptotique des récepteurs de mort de plusieurs façons. Elle lie le récepteur de mort TNF-R1, empêchant la formation du complexe d'initiation et ainsi la transduction du signal [Filippova 2002]. De plus, il a été montré que E6 est capable d'interagir avec la protéine adaptatrice FADD et la caspase 8 impliquée dans la transduction du signal activé par les récepteurs Fas et TRAIL [Filippova 2004, Garnett 2006b]. Outre l'inactivation de la protéine p53, plusieurs interactions impliquant E6 conduisent à une inhibition de l'apoptose mitochondriale. E6 est capable d'entraîner la dégradation de la protéine pro-apoptotique Bak, d'inhiber la transcription de Bax et d'augmenter l'expression des protéines inhibitrices de l'apoptose, IAP2 et la survivine [Garnett 2006a].

L'immortalisation est permise grâce à la participation de la protéine E6 qui active la transcription de la sous-unité catalytique de la télomérase hTERT (human telomerase reverse transcriptase) [Van Ranst 1992]. E6 s'associe avec E6AP et interagit avec Myc pour moduler l'activité du facteur de transcription NFX1-91 (Nuclear Factor X box-binding protein 1-91) et des activateurs, Myc-Max, SP1 et les histone acétyltransférases qui lient le promoteur de TERT [Howie 2009]. E6 lie aussi directement le facteur de transcription NFX123 pour augmenter le taux de TERT par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels [Katzenellenbogen 2007]). Cette étape d'activation de la télomérase ainsi que l'inactivation de pRB par E7 rendent la cellule immortelle.

L'instabilité génétique nécessaire à la transformation cellulaire complète est favorisée par E6 et E7. La protéine E6 des HPV-HR peut lier et déstabiliser la MGMT (O(6)-MéthylGuanine MéthylTransférase) et la protéine XRCC1 (X-ray Repair Complementing defective repair in Chinese hamster Cells 1), deux enzymes impliquées respectivement dans la réparation de l'ADN par excision de base, et dans la réparation des cassures simple brin. L'inhibition de réparation de l'ADN va favoriser l'instabilité génomique. De plus, le nombre accru de cassures double brin faciliterait l'intégration du génome d'HPV observée lors de la

progression tumorale [Munger 2004]. La protéine E7 induit la dégradation de la claspine, un régulateur clé de la voie de dommage à l'ADN passant par ATR et Chk1 [Spardy 2009]. Elle serait directement à l'origine de la duplication anormale des centrosomes à l'origine d'anomalies du nombre de chromosomes [Duensing 2000, Duensing 2002]. Cette activité de E7 est dépendante de la forte activité de la CDK2 [Duensing 2006].

Dans la progression tumorale, une cellule immortelle doit acquérir la capacité de croître en l'absence d'ancrage à la matrice extracellulaire. Des expériences *in vitro* ont démontré que des cellules rétrotransfectées par E6 sont capables de croître d'une manière indépendante de l'ancrage [Hoover 2007]. L'expression d'E7 ajoutée à celle d'E6 accroît l'efficacité de la croissance indépendante d'ancrage. Des kératinocytes immortalisés par la transfection de h-tert développent la capacité de se développer sans ancrage à une matrice après rétrotransfection de E6 et E7 d'HPV16 [Narisawa-Saito 2008]. Des épimutations de gènes suppresseurs de tumeurs, comme CADM1 (Cell Adhesion Molecule 1) également appelé TSLC1 (Tumor Suppressor in Lung Cancer-1) et dont l'expression est inhibée par méthylation de son promoteur, participent aussi à l'acquisition d'indépendance d'ancrage [Overmeer 2010].

L'angiogenèse, indispensable à l'expansion des cellules tumorales est favorisée par des facteurs angiogéniques comme le VEGF (vascular endothelium growth factor). La protéine E6 d'HPV 16 transactive directement le promoteur du VEGF [Lopez-Ocejo 2000]. En réponse, le VEGF transactive le promoteur de E6, de l'EGF-R et de l'IGF-2 (Insulin-like Growth Factor 2) [Mathur 2005]. De plus, la surexpression de VEGF inhibe l'expression de la protéine anti-proliférative IGF-BP3 (IGF-Binding Protein 3). Il a été démontré dans notre laboratoire que *i)* l'inhibition de la protéine E6 d'HPV 18 par un siRNA entraîne une inhibition de l'expression du VEGF et *ii)* l'inhibition de p53 entraîne une augmentation du VEGF. Ceci suggère que l'action de la protéine E6 sur le VEGF peut être à la fois directe et indirecte *via* l'inhibition de l'un des répresseurs du VEGF, p53 [Clere 2007]. Une étude récente a démontré que l'inhibition de E6 ou E7, après transfection par des plasmides codant des shRNA ciblant l'ARNm de E6 ou E7, diminue le taux d'ARNm codant le VEGF ainsi que son expression [Chen 2011]. L'inhibition de E6, E7 et du VEGF par le même processus inhibe la migration, l'invasion et l'adhérence des cellules HeLa *in vitro*. De plus, l'injection de cellules HeLa transfectées chez la souris SCID induit la formation de tumeurs beaucoup plus petites que celles formées par les cellules HeLa sauvages.

La protéine E6 cible les protéines à domaine PDZ conduisant à leur dégradation [Thomas 2002]. Les protéines à domaine PDZ sont impliquées dans plusieurs fonctions dont la formation de canaux ioniques, la signalisation et l'adhérence cellulaire. Globalement, en induisant la dégradation des protéines à domaine PDZ, la protéine E6 entraîne une perte de la polarité cellulaire et la rupture des jonctions adhérentes pour favoriser la dissémination métastatique. E7 participe à la mobilité cellulaire en interagissant avec les intégrines, certains récepteurs membranaires et le cytosquelette [Rey 2000b, Rey 2000a].

Dans une cellule normale, la perte des contacts cellulaires avec la matrice extracellulaire entraîne la mort de la cellule par anoïkis. E6 interagit avec la protéine d'adhésion focale, la paxilline qui est une protéine cytoplasmique impliquée dans l'organisation de l'actine et la fixation des cellules à la matrice extracellulaire par des protéines d'adhésion focale comme la vinculine [Wood 1994]. La paxilline transduit les signaux de la membrane plasmique au point de contact focaux et au cytosquelette d'actine. Il en résulte une désorganisation du cytosquelette d'actine, ce qui suggère que cette interaction peut jouer un rôle vital dans la tumorigenèse. Les taux d'expression de la paxilline et de la FAK (Focal Adhesion Kinase) sont augmentés dans les lignées cellulaires de carcinome du col de l'utérus et dans les cellules immortalisées par les HPV à haut risque [McCormack 1997]. E6 interagit avec la fibuline-1, une protéine de la matrice extracellulaire liant le calcium, impliquée dans la transformation cellulaire et l'invasion tumorale [Vande Pol 1998, Du 2002].

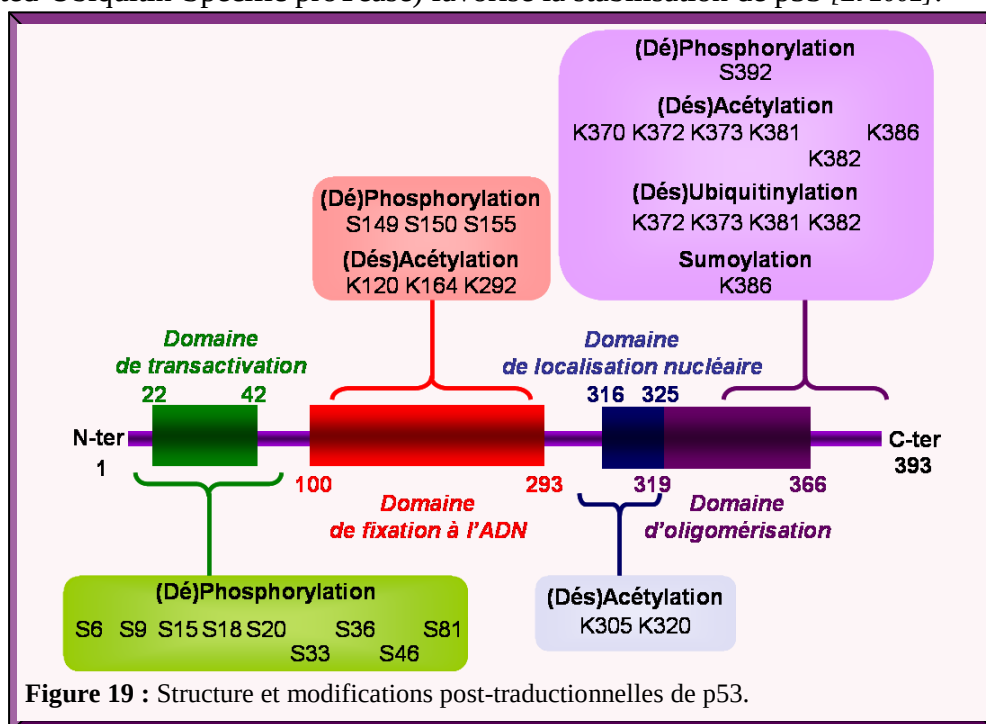
Les propriétés transformantes de la protéine E5 sont principalement liées à sa capacité de perturber la voie de dégradation du récepteur à l'EGF. La protéine E5 d'HPV 16 interagit d'une part avec le récepteur à l'EGF pour retarder son endocytose, et d'autre part avec une ubiquitine ligase cellulaire, c-Cbl, afin de limiter la dégradation du récepteur à EGF et augmenter son recyclage à la membrane plasmique [Zhang 2005]. La protéine E5 inhibe la voie extrinsèque de l'apoptose en ciblant les récepteurs de TRAIL et Fas [Kabsch 2002]. Par ailleurs, E5 est aussi capable d'entraîner une diminution de l'expression de la connexine 43, inhibant la communication intercellulaire [Kivi 2008].

3-2) p53 une barrière au développement tumoral

3-2-1) Structure et régulation de p53

La protéine p53, est une protéine suppresseur de tumeur, codée par le gène TP53, présentée comme la protéine gardienne du génome. Ce facteur de transcription découvert en 1979 est impliqué dans de nombreux processus tels que le contrôle du cycle cellulaire et de l'intégrité du génome, la sénescence, l'apoptose ou encore la différenciation cellulaire [DeLeo 1979, Green 2009, Vousden 2009]. C'est une protéine de 53 kDa (393 acides aminés) constituée de plusieurs domaines : un domaine de transactivation (acides aminés 22 à 42), un domaine de fixation à l'ADN (acides aminés 100 à 293), un domaine de localisation nucléaire (acides aminés 316 à 325) et un domaine d'oligomérisation (acides aminés 319 à 366).

Dans une cellule normale, la protéine p53 est maintenue à un taux faible grâce à son adressage au protéasome. La principale protéine participant au maintien du taux de p53 est la protéine MDM2, une ligase E3, qui ubiquitinye les résidus lysine carboxyterminaux 372, 373, 381 et 382 de p53 en collaboration avec la protéine MDM4 [Perry 2010]. Cette ubiquitinylation de p53 entraîne sa dégradation par le protéasome. La protéine MDM2, qui se fixe directement à p53, a un double rôle dans sa dégradation grâce à son domaine de localisation cytoplasmique qui permet de rediriger p53 au cytoplasme. D'autres ubiquitines ligases, Pirh2 (P53-Induced-RING-H2) et COP1 (Constitutive Photomorphogenic 1), induisent sa dégradation par le protéasome [Leng 2003]. Ces 3 ubiquitines ligases sont transactivées par p53 formant ainsi une boucle de régulation négative empêchant l'accumulation de p53 dans la cellule [Vousden 2002]. A l'inverse, la désubiquitination de p53 par HAUST (Herpesvirus-Associated-Ubiquitin-Specific proTease) favorise la stabilisation de p53 [Li 2002].



La protéine p53 est une protéine hautement régulée dont chaque domaine peut subir des modifications post-traductionnelles autres que l'ubiquitination, favorisant ou inhibant l'activité de p53 (pour revue [Kruse 2009]). Les différentes modifications post-traductionnelles possibles sont la phosphorylation, la méthylation, la sumoylation, et l'acétylation.

Les phosphorylations touchant les résidus sérine 6, 9, 15, 18, 20, 36, 46, 81 du domaine N-terminal de transactivation favorisent l'activité transcriptionnelle de p53 et empêchent son interaction avec des protéines, dont MDM2. La fixation de MDM2 au domaine N-terminal de p53 inhibe son activité transcriptionnelle. La déphosphorylation de résidus sérine 33 et 46 constitutivement phosphorylés réduit l'activité de p53. L'activité transcriptionnelle de p53 est aussi modulée par la phosphorylation du résidu sérine 392 du domaine C-terminal, qui favorise la stabilité de la forme active de p53 (tétramère) et par conséquent son activité transcriptionnelle, et par l'acétylation des résidus lysine 370, 372, 373, 381 et 386. A l'opposé, la désacétylation de la lysine 382 réduit l'activité de p53. Par ailleurs, la sumoylation du résidu lysine 386 augmente la transactivation de p53. D'autres modifications post-traductionnelles dans le domaine C-terminal peuvent inhiber la liaison de p53 à l'ADN. Le domaine de liaison à l'ADN peut aussi subir des changements tels que la (dé)phosphorylation de résidus sérine 149, 150, 155, la (des)acétylation de résidus lysines 120, 164, 292 et l'ADP-(dé)ribosylation de résidus acide glutamique et acide aspartique, inhibant ou activant l'activité transcriptionnelle de p53. Les lysines 305 et 320 constituant le domaine de tétramérisation peuvent être acétylées empêchant la formation du tétramère actif.

La régulation de l'activité de p53 peut se faire aussi au niveau transcriptionnel. Il existe plusieurs variants (promoteur alternatif) et isoformes (épissage alternatif) de p53 produisant des effets différents [Bourdon 2005]. Par exemple, l'isoforme $\Delta 133p53$ se comporte comme un dominant négatif de p53 et inhibe l'apoptose dépendante de p53. Le variant p53 β amplifie la transcription des gènes cibles de p53 mais possède une plus grande affinité pour le promoteur de Bax que pour celui de MDM2, à l'inverse de p53, favorisant la voie apoptotique. Le profil d'expression des variants et des isoformes de p53 est très différent suivant les tissus rendant certaines populations cellulaires moins sensibles à l'apoptose dépendante de p53. Par exemple dans les tumeurs, l'expression de ces variants et isoformes est variable rendant difficile la détermination d'un lien entre le statut de p53 et la sensibilité des cancers humains aux chimiothérapies [Bourdon 2005].

Le gène TP53 est altéré dans de nombreux cancers humains touchant entre autres, le cerveau, les voies aérodigestives supérieures, l'estomac, l'utérus, les ovaires, la vessie, le colon, les cellules lymphoïdes [Lane 1992]. Chez l'Homme, 50 % des tumeurs abritent une p53 mutée [Soussi 2003]. L'inactivation de p53 est un facteur prédisposant à l'émergence des cancers et est essentielle à la transformation tumorale [Donehower 1992, Mowat 1985].

La majorité des mutations de p53 touche les résidus constituant le domaine de liaison à l'ADN, empêchant la transactivation des gènes cibles [Soussi 2007]. Les résidus arginine en position 175, 248 et 273 et la sérine en position 245 sont souvent mutés dans les cancers colorectaux, et représentent plus de 20 % des mutations totales rapportées dans les cancers humains. Elles peuvent être classées en deux groupes, l'un affectant directement le site de liaison à l'ADN comme la mutation de l'arginine 273, l'autre modifiant la conformation de la protéine, déstabilisant le domaine de fixation à l'ADN, comme la mutation de l'arginine 175 [Wiman 2010].

Dans certaines tumeurs, l'inhibition de la voie p53 quand celle-ci est sauvage peut avoir lieu suite à la mutation de molécules en amont de p53 [Fuster 2007]. C'est le cas lors des délétions du gène p14^{ARF}, de l'amplification du gène MDM-2 ou de la mutation de ATM. Dans d'autres tumeurs abritant une p53 sauvage des mutations sont présentes sur les effecteurs en aval de p53 tels que PTEN, Fas, Bax, Bcl-2 ou Apaf-1 [Gentile 2001, Waite 2002]. Comme nous l'avons vu précédemment dans les cancers du col de l'utérus, la p53 est sauvage mais c'est une cible privilégiée de la protéine virale E6 des HPV à haut risque (cf. chapitre 3.1.3).

3-2-2) Induction de la voie p53

De nombreux stress cellulaires comme les lésions de l'ADN, les anomalies du fuseau mitotique, l'hypoxie, l'activation d'oncogènes, le raccourcissement des télomères, la déplétion en facteurs de croissance et en ribonucléotides, ou les chocs thermiques entraînent l'activation de la voie p53 (figure 20). Parmi ceux-ci, les dommages à l'ADN et le stress oncogénique sont impliqués dans la régulation du transfert horizontal d'oncogènes (cf partie 1-3). C'est pourquoi nous détaillerons, en particulier ces deux stress activant la voie p53.

En réponse à des lésions de l'ADN, la voie p53 est activée par les membres de la famille des kinases apparentées aux kinases dépendantes des phosphatidyl-inositols (phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases ou PIKKs) dont les DNA-PK (DNA-dependent

protein kinase), ATM (Ataxia-Telangectasia Mutated) et ATR (ATM-Rad3-related) [Canman 1998]. Les radiations UV activent la voie ATR et sa protéine effectrice Chk1 (Human Checkpoint Kinase 1) alors que les cassures double brin de l'ADN dues par exemple aux radiations- γ activent la voie ATM et sa protéine effectrice Chk2. L'ADN fragmenté par les CAD et les DNases lors du transfert horizontal de gènes active cette même voie ATM/Chk2.

Les cassures double brin sont reconnues par les complexes multifonctionnels MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) qui s'accumulent sur le site des dommages et recrutent les kinases ATM et les DNA-PK [Moreno-Herrero 2005]. ATM phosphorylée phosphoryle à son tour une série de cibles en aval, parmi lesquelles, l'extrémité C-terminale de l'histone H2AX (H2AX), la kinase Chk2 et p53. ATM phosphoryle la sérine 15 de p53 facilitant son interaction avec les co-activateurs p300/CBP, augmentant son activité transcriptionnelle. La protéine ATM peut aussi, en phosphorylant directement MDM2, empêcher l'exportation nucléaire de p53 et sa dégradation dans le cytoplasme [Unger 1999b].

La forme phosphorylée de H2AX, appelée γ -H2AX, qui apparaît quelques secondes après les cassures double brin, permet le recrutement du complexe remodelant la chromatine au niveau des cassures [Rogakou 1998]. Ce complexe permet de décondenser la chromatine et facilite l'accès des protéines de réparation de l'ADN. La protéine Chk2 induit un arrêt dans la progression du cycle cellulaire passant par les protéines CDC25 (Cell Division Cycle 25) et par la phosphorylation de la sérine 20 de p53 inhibant son interaction avec MDM2 [Alarcon-Vargas 2002]. Ceci permet à la cellule de réparer l'ADN endommagé ou le cas échéant d'induire l'apoptose [Melchionna 2000].

Hormis les sérines 15 et 20 de p53, cinq autres résidus sérine et deux résidus thréonine du domaine N-terminal, ainsi que deux résidus sérine du domaine C-terminal peuvent être phosphorylés par d'autres kinases induites par des dommages à l'ADN comme les DNA-PK et les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Les MAPK augmentent la stabilité et l'activité apoptotique de p53 en phosphorylant les résidus sérine 15, 33, 46 ou 392. De plus, p38 augmente par phosphorylation la dégradation de MDM2 [Bulavin 1999].

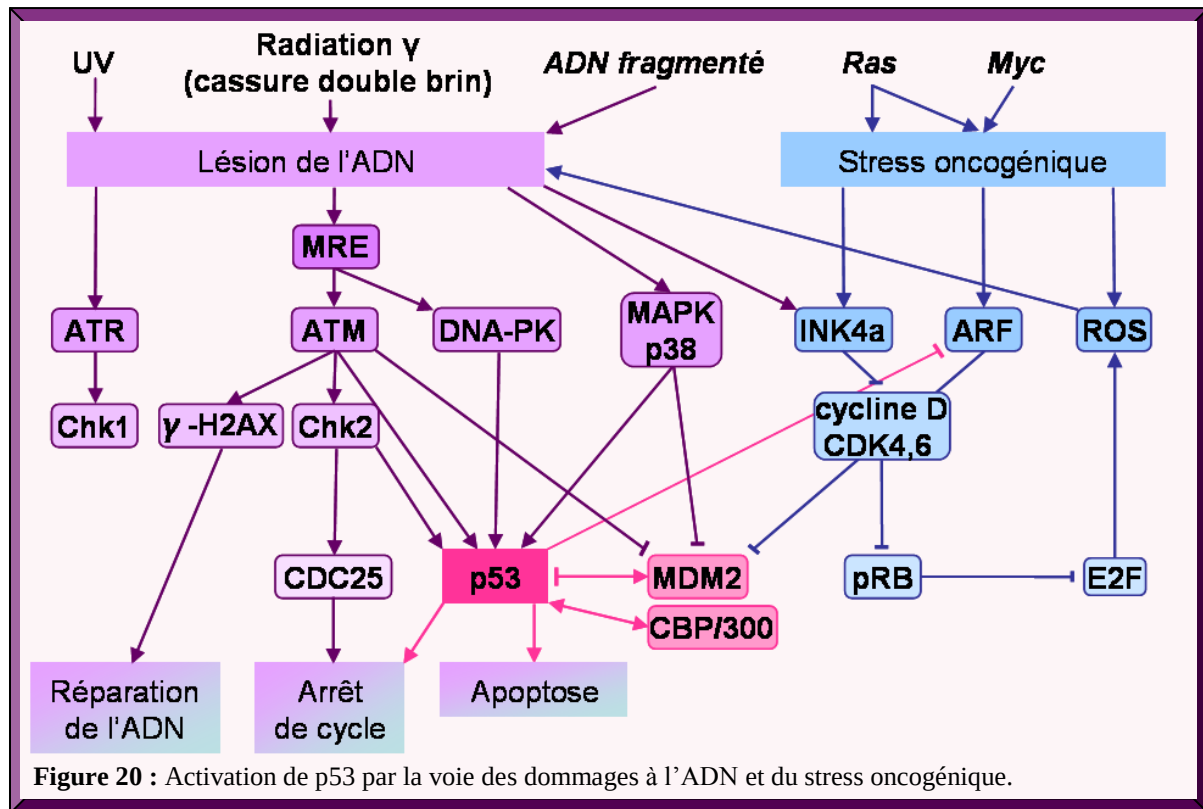


Figure 20 : Activation de p53 par la voie des dommages à l'ADN et du stress oncogénique.

Un stress oncogénique, tel que la surexpression ou l'expression continue d'oncogènes, induit l'activation de la protéine ARF ($p14^{\text{ARF}}$ chez l'Homme et $p19^{\text{ARF}}$ chez la souris) et de la protéine INK4a (Inhibitor of cycline dependent Kinase, également appelée $p16^{\text{INK4A}}$). L'expression continue de Ras, mais aussi une cassure de l'ADN double brin provoquent une augmentation de l'expression de la protéine $p16^{\text{INK4A}}$ qui inhibe alors la phosphorylation de la protéine pRb en liant le complexe cycline D/CDK4,6 [Dimri 2000].

La protéine ARF, dont l'expression est induite par la surexpression de Myc ou l'expression continue de Ras, inhibe l'activité ubiquitine ligase de la protéine MDM2 en se liant à cette dernière et en la séquestrant dans le nucléole. Elle empêche ainsi l'exportation dans le cytoplasme de p53, son ubiquitination et donc sa dégradation [Honda 1999, Weber 1999, Tao 1999]. En retour, p53 inhibe la transcription de $p14^{\text{ARF}}$ [Robertson 1998].

L'activation de p53 par des oncogènes peut aussi avoir lieu indépendamment de $p16^{\text{INK4A}}$ et $p14^{\text{ARF}}$, via la production de ROS (Reactive Oxygen Species). La production de ROS, stimulée par l'oncogène Myc, induit des lésions de l'ADN qui entraînent l'activation de p53 [Vafa 2002].

En parallèle de son rôle dans l'activation des réponses cellulaires à un stress oncogénique, la protéine $p14^{\text{ARF}}$ est impliquée dans la connexion entre la voie pRb et p53. Ainsi la libération de E2F par pRb active la transcription de $p14^{\text{ARF}}$ permettant une activation de p53 [Sherr 2000].

3-2-3) Voie p53 dans l'arrêt de cycle, la réparation, la sénescence et l'apoptose

Une fois activée, p53 va induire sélectivement l'expression de gènes régulateurs du cycle cellulaire ou de gènes activant l'apoptose (figure 21). Plusieurs paramètres déterminent la voie qui va être déclenchée dont la concentration de p53 intracellulaire [Chen 1996]. Ainsi, une faible augmentation de la quantité de p53 favorise la liaison de cette dernière à des promoteurs de forte affinité régulant principalement des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Une plus forte concentration de p53, faisant suite à un stress cellulaire important, permet sa liaison à des promoteurs de plus faible affinité comme ceux responsables de la régulation des gènes pro-apoptotiques. De plus, les modifications post-traductionnelles de p53 modulent la spécificité de sa liaison aux promoteurs des gènes cibles [Aylon 2007]. Pour exemple, la phosphorylation de la sérine 46 de p53 favorise son interaction avec le promoteur du gène pro-apoptotique p53AIP1 (P53-regulated Apoptosis-Inducing Protein 1) [Oda 2000b]. L'interaction de p53 avec d'autres protéines influence aussi les gènes activés. Ainsi, les protéines MDM2, E2F1 et p300/CBP augmentent la transactivation des gènes cibles de p53 sans distinction alors que d'autres protéines telles que ASPP1 (Apoptosis Stimulating Protein of p53 1), ASPP2, iASPP (inhibitory member of the ASPP family), JMY (Junction-Mediating and -regulatorY protein), p63 et p73, régulent spécifiquement ceux liés à l'apoptose [Slee 2004]. Enfin, la présence de facteurs de survie et/ou de mort module les gènes activés par p53 [Oren 2003].

L'activation de p53 favorise donc, soit un arrêt du cycle cellulaire suivi d'une réparation des dommages à l'ADN et/ou de la sénescence de la cellule, soit l'apoptose de celle-ci (figure 21).

L'arrêt du cycle cellulaire dépendant de p53 passe par l'activation de p21^{WAF1/CIP1}, de 14-3-3- σ ou de Gadd45 (Growth Arrest and DNA Damage 45). La protéine p21^{WAF1/CIP1} surexprimée fixe et inactive les complexes cycline D/CDK4,6 et cycline E/CDK2, normalement responsables de la phosphorylation de la protéine p105^{Rb}. L'accumulation de la forme hypophosphorylée de p105^{Rb} conduit à la séquestration des facteurs de transcription E2F, bloquant ainsi l'expression de leurs gènes cibles, avec pour conséquence l'inhibition de la transition G1/S. La p53 active la protéine 14-3-3 σ qui se lie à la phosphatase CDC25C phosphorylée induisant son exportation et sa séquestration dans le cytoplasme et donc inhibant son activité nécessaire à l'activation de la CDK1 qui permet la transition G2/M

[Lopez-Girona 1999]. La protéine 14-3-3 σ séquestre aussi dans le cytoplasme la cycline B et la CDK1 dont l'expression peut être réprimée par p53 [Flatt 2000]. La surveillance de la phase G2 par la protéine p53 s'exerce aussi *via* les protéines p21^{WAF1/CIP1} et GADD45 qui inhibent directement CDK1 [Bunz 1998, Vairapandi 2002].

L'arrêt du cycle cellulaire permet à l'histone γ -H2AX de conduire les réparations de l'ADN passant par les protéines NHEJ (Non-Homologous End Joining) et HR (Homologous Recombinaison). γ -H2AX organise l'accumulation d'une centaine de copies des différentes protéines impliquées dans la réparation de l'ADN pour former un complexe au niveau de la lésion permettant le maintien des extrémités de l'ADN fragmenté pendant la réparation.

La voie de réparation passant par NHEJ implique le recrutement des protéines Ku 70 et Ku 80, sous-unités régulatrices de la DNA-PK. Ce complexe recrute la nucléase Artemis et la ligase IV/XRCC4 nécessaires à la réparation [Ahnesorg 2006, Capp 2006]. Le processus de réparation de l'ADN est terminé par la ligase XLF (XRCC4-Like Factor).

La voie de réparation passant par la protéine HR, implique la protection des extrémités 3' de l'ADN fragmenté par la protéine RPA (Replication Protein A) couplée aux protéines RAD52 et RAD51 qui recrute la séquence homologue de la séquence à réparer [Van Dyck 1999]. Le complexe MRN et la protéine RAD54 sont alors recrutés pour réparer l'ADN à l'aide de cette séquence homologue [Petalcorin 2007]. Lorsque l'ADN ne peut pas être réparé ou lorsque la reprise de la prolifération est impossible comme en absence de facteurs de croissance la cellule entre en sénescence répllicative.

Les cellules sénescents sont caractérisées par une taille agrandie, une morphologie aplatie, l'incapacité de synthétiser de l'ADN, et l'expression de biomarqueurs comme la β -galactosidase. Le stress oncogénique comme l'expression continue de l'oncogène Ras est capable d'induire la sénescence de cellules en partie par l'activation de la voie Raf-MEK-ERK (ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases) mais aussi de la voie JNK-p38 en altérant le taux de ROS intracellulaire [Ueda 2002].

Plusieurs marqueurs moléculaires de la sénescence, tels que p21, PML (ProMyelocytic Leukemia), PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1), et DEC1 (Deleted in Esophageal Cancer 1) sont des molécules en aval de p53 capables d'induire un arrêt de cycle irréversible. PML est une composante essentielle du complexe PML-NB (PML-Nuclear Body), qui constitue une zone d'ancrage pour les protéines régulatrices telles que p53. Bien que sept isoformes de PML existent, seule la PML-IV est capable de réguler l'activité de p53 et d'induire la sénescence [Bischof 2002].

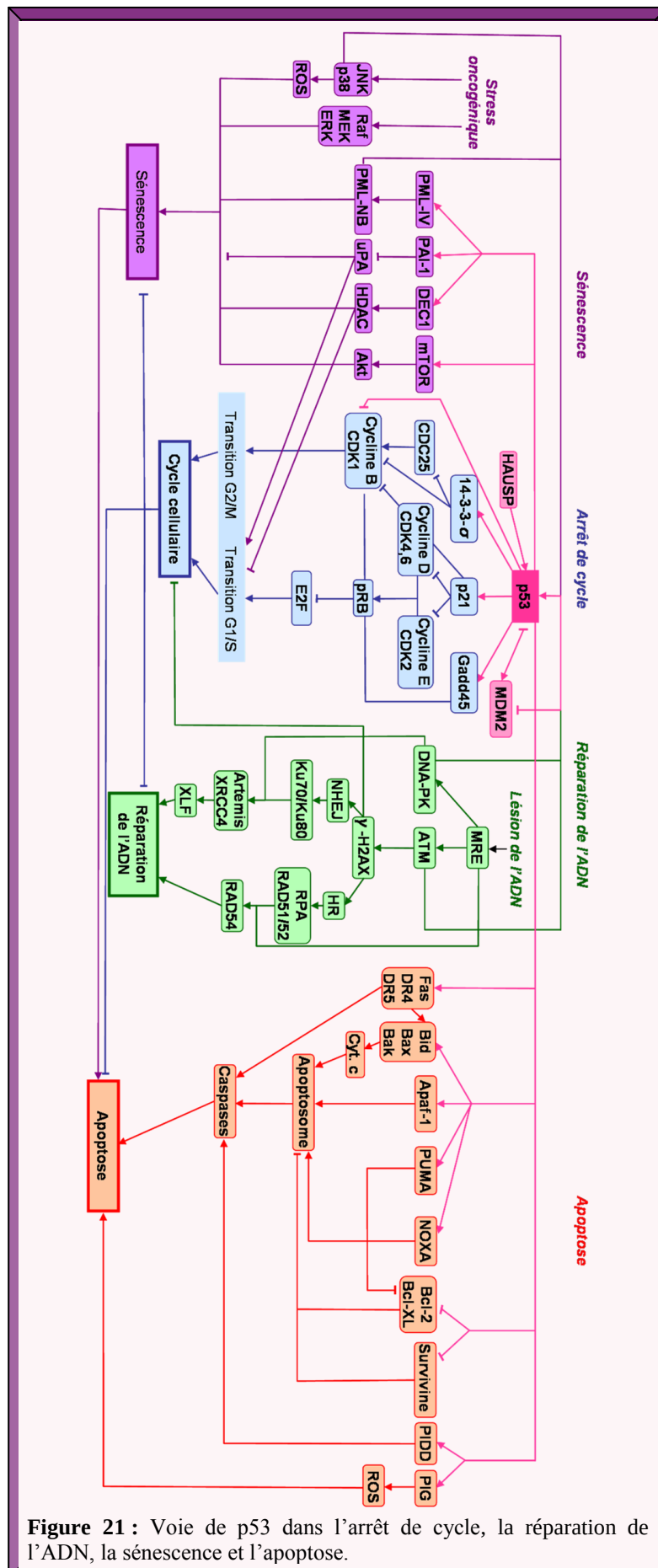


Figure 21 : Voie de p53 dans l'arrêt de cycle, la réparation de l'ADN, la sénescence et l'apoptose.

p53 peut induire la sénescence de la cellule *via* mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) par activation de la voie Akt/PKB (Ak mouse strain Transforming protein/Protein Kinase B) [Korotchkina 2010].

L'apoptose passant par l'activation de p53 peut faire suite à une longue période de sénescence ou un stress cellulaire important.

L'activité transcriptionnelle de la protéine p53 conduit à l'activation de gènes codant des protéines intervenant dans la transduction du signal apoptotique au niveau membranaire, telles que Fas, DR4, DR5. De plus, la surexpression de p53 améliore le taux de Fas à la surface cellulaire, en favorisant son trafic en provenance de l'appareil de Golgi [Wu 1997]. DR5 est directement activé par p53 qui se fixe à son domaine de mort [Bennett 1998]. p53 augmente aussi la transcription de gènes pro-apoptotiques impliqués dans la voie apoptotique mitochondriale, tels que Bid, Bax, Apaf-1, PUMA, et NOXA, et diminue celle de gènes anti-apoptotiques dont Bcl-2, Bcl-xL, la survivine [Oda 2000a, Nakano 2001]. La transactivation du gène d'Apaf-1 par p53 favorise la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases [Robles 2001]. La protéine PUMA se localise au niveau de la mitochondrie où elle neutralise Bcl-2 [Liu 2003]. Elle interagit aussi avec Bcl-xL alors lié à p53 dans le cytosol. p53 libérée favorise alors l'oligomérisation de la protéine Bax [Chipuk 2005]. NOXA se localise aussi dans le compartiment mitochondrial où elle active les pores de transition de perméabilité [Seo 2003]. La régulation négative de la survivine favorise la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases [Okada 2004]. p53 active aussi des gènes codant des protéines cytoplasmiques comme PIDD (P53 Induced protein with a Death Domain) qui déclenche l'apoptose par activation de la caspase-2 et PIG (P53-Inducing Genes) qui entraîne la production de ROS [Tinel 2004, Terui 2003].

Indépendamment de son rôle transcriptionnel, p53 se localise rapidement à la mitochondrie dès l'initiation du processus apoptotique dépendant de p53 [Marchenko 2000, Mihara 2003]. La translocation de p53 au niveau de la mitochondrie est favorisée par l'ubiquitination par MDM2, puis une fois transloquée, par la déubiquitination par la protéine mitochondriale HAUSP [Marchenko 2007]. A ce niveau, p53 forme des complexes avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2 par son domaine de liaison à l'ADN libérant les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak séquestrées par les protéines anti-apoptotiques [Mihara 2003]. Les protéines Bax et Bak peuvent alors induire la libération du cytochrome c après la perméabilisation de la mitochondrie. p53 interagit aussi directement avec Bak, la libérant de

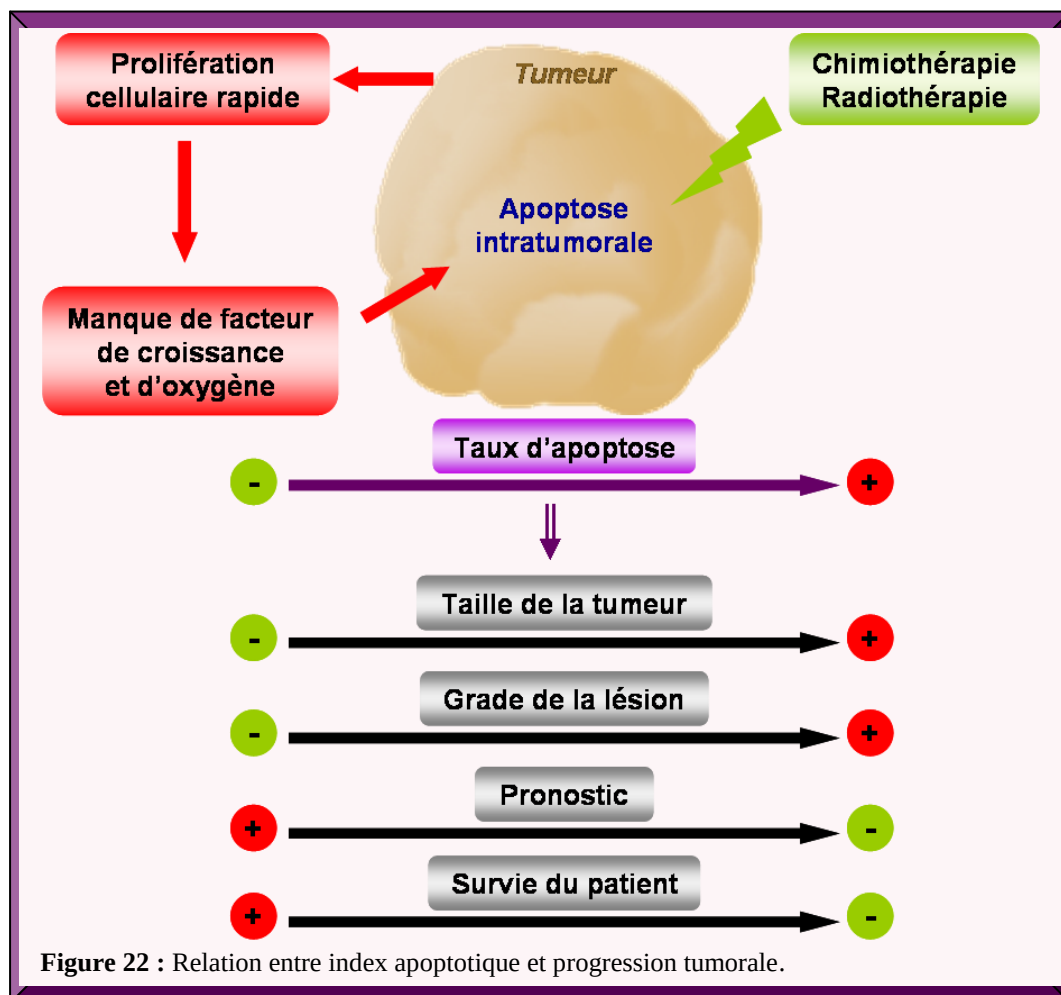
sa liaison à la protéine anti-apoptotique Mcl-1. Bak libérée est transloquée au niveau de la mitochondrie où elle s'ancre et s'oligomérisse [Leu 2004, Chipuk 2004].

L'induction de l'apoptose dépendante de p53 ne passe pas uniquement par l'activation/inactivation directe des protéines pro/anti-apoptotiques mais peut être aussi amplifiée par des altérations du cytosquelette. En effet, p53 transactive le facteur EF-1 α (Elongation Factor-1) et inhibe la protéine MAP4 (Microtubule Associated Protein 4) impliquée dans la stabilisation des microtubules [Murphy 1996, Kato 1997]. Les voies de signalisation et de transduction des signaux extracellulaires sont aussi modulées par p53 qui bloque les signaux de survie de la voie de l'IGF1 en activant l'IGF-BP3 (IGF-Binding Protein-3), une protéine séquestrant l'IGF-1, et en réprimant l'expression du récepteur à l'IGF1 [Buckbinder 1995]. Par ailleurs, p53 stimule l'expression d'inhibiteurs de l'angiogenèse comme la thrombospondine 1. Ce phénomène est amplifié par la répression du VEGF et la dégradation de HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha), un régulateur positif du VEGF [Ravi 2000]. Elle peut aussi réguler des gènes comme ceux codant la thrombospondine impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse [Han 2003, Linderholm 2004].

3-3) Apoptose intratumorale

Dans le chapitre 3-1-1, les caractéristiques des cellules transformées ont été mises en exergue et en particulier l'échappement à l'apoptose qui est fréquemment dû à des mutations ou épimutations des protéines de la voie p53. Cependant, il a été observé qu'une quantité massive de cellules tumorales meurt au sein des tumeurs malignes. Le mécanisme qui est responsable de la mort d'un pourcentage relativement important d'entre elles est l'apoptose [Kerr 1972, Wyllie 1980, Lowe 2001]. La présence de ces cellules apoptotiques peut être directement liée à la forte prolifération cellulaire. En effet, les cellules se multipliant très rapidement, les éléments nécessaires à leur croissance, comme l'oxygène et les facteurs de croissance deviennent limitants, provoquant la mort d'une partie d'entre-elles. De nombreuses études ont corrélié le taux de prolifération et le taux d'apoptose dans les tumeurs. Liu et coll. ont d'ailleurs observé, dans les cancers de l'ovaire, qu'un taux élevé d'apoptose intratumorale associé à une forte prolifération cellulaire était caractéristique des tumeurs les plus agressives [Liu 2002].

Le lien entre index apoptotique et mauvais pronostic a été montré dans de nombreux cancers incluant des cancers de l'œsophage, de l'ovaire, de la vessie, de la langue mais aussi des lymphomes gastro-intestinaux, des carcinomes rénaux et le lymphome non-Hodgkinien [Ohashi 1997, Liu 2002, Du 1996, Tannapfel 1997, Todd 1996, Lipponen 1994b, Lipponen 1994a, Leonicini 1993]. Cela semble être aussi le cas dans le cancer du col de l'utérus dans lequel le taux d'apoptose est corrélé avec la taille de la tumeur et l'avancée des carcinomes [Tsang 1999a, Tsang 1999b]. Une autre étude a aussi démontré qu'un faible mais détectable taux d'apoptose est retrouvé dans les lésions intra-épithéliales de haut grade du col de l'utérus contrairement à l'épithélium sain ou les lésions de bas grade [Isacson 1996]. De plus, l'index apoptotique augmente avec le grade de la lésion et l'activité proliférative. Levine *et al.* ont démontré qu'un fort index apoptotique était un facteur de mauvais pronostic d'évolution des carcinomes du col de l'utérus [Levine 1995].



Bien qu'il soit prématuré d'attribuer un rôle au THG dans la corrélation observée entre le taux d'apoptose et les caractéristiques tumorales, ces données nous indiquent que l'apoptose intratumorale naturelle existe. Par conséquent le THG est possible au sein des

tumeurs. De plus les traitements de chimio- et/ou radiothérapies induisent une apoptose intratumorale favorisant vraisemblablement la probabilité d'un transfert horizontal de gènes.

Travaux Personnels

Contexte et objectifs

Le transfert horizontal de gènes (THG) entre cellules de mammifères est décrit en majorité par l'équipe de Lars Holmgren (pour revue [Holmgren 2010]). Ce transfert s'effectue entre une cellule apoptotique donneuse et une cellule receveuse l'ayant internalisée qu'elle soit spécialisée ou non dans la phagocytose. Les gènes transférés peuvent être d'origine cellulaire ou virale et conférer un avantage sélectif à la cellule hôte [Holmgren 1999, Spetz 1999, Bergsmedh 2001]. La duplication du gène transféré est sous le contrôle d'une voie de régulation passant par la protéine p53. Cette voie de régulation est déclenchée par l'ADN transféré qui est fragmenté par les CAD (Caspase Activated DNases) présentes dans la cellule apoptotique et les DNases présentes dans les lysosomes. L'ADN fragmenté de la cellule donneuse active la voie de réparation de l'ADN de la cellule receveuse passant par ATM, Chk2, p53 et p21 et induit leur sénescence [Bergsmedh 2002, Bergsmedh 2006]. Lorsque le gène transféré est un oncogène, le transfert peut aboutir à la transformation de la cellule receveuse. Cependant, un mécanisme de régulation passant aussi par p53/p21 mais indépendant du déclenchement de la voie de réparation de l'ADN permet le contrôle de la transformation. Ainsi le transfert de *c-myc* et *H-ras* permet la transformation des cellules receveuses uniquement si celles-ci sont dépourvues de p53 alors que l'invalidation de Chk2 est inefficace [Bergsmedh 2001, Bergsmedh 2006].

Dans ce contexte, nous avons voulu savoir si les oncogènes d'HPV à haut risque oncogénique, connus pour être en partie responsables de la transformation cellulaire dans le modèle du cancer du col de l'utérus, pouvaient transformer des cellules receveuses saines par THG. De plus, étant donné que l'un de ces oncogènes, E6, est capable d'induire la dégradation de p53, notre modèle était potentiellement capable d'aboutir à la transformation de cellules receveuses possédant une p53 sauvage. Une réponse partielle a été obtenue en 2009 après la publication des données sur SV40. L'équipe de Lars Holmgren a démontré que le transfert du gène codant l'antigène T de SV40, conjointement aux transferts des oncogènes *c-myc* et *H-ras*, permet la transformation de cellules receveuses exprimant p53 [Ehnfors 2009]. Ainsi, l'induction de la dégradation de p53 et pRb par l'antigène T de SV40 est comparable à celle induite, respectivement, par E6 et E7 des HPV à haut risque dans le cancer du col de l'utérus.

Ces découvertes sont tout à fait innovantes. Cependant, les cellules donneuses utilisées par l'équipe suédoise lors de la transformation par transfert horizontal de gènes, sont des

cellules qui ont été transfectées par un plasmide contenant les oncogènes à transférer. Bien que l'ADN doit nécessairement être intégré au génome de la cellule hôte pour être transféré (Holmgren 1999), nous ne pouvons pas exclure que de telles modifications génétiques puissent faciliter le transfert de gènes. Notre modèle d'étude utilise des cellules donneuses dérivées de cancer du col de l'utérus naturellement transformées et naturellement infectées par HPV. C'est pourquoi ces travaux permettront de répondre à deux questions essentielles. Premièrement, est-ce que la transformation par THG est applicable au modèle du cancer du col de l'utérus et deuxièmement, est-ce que le THG est possible en dehors de toute manipulation génétique, en particulier lié à l'expression de gène de sélection (gènes de résistance aux antibiotiques par exemple). Les réponses à ces questions permettront non seulement de mieux comprendre le développement tumoral associé aux HPV mais aussi de déduire des hypothèses concernant les observations physiopathologiques telles que la corrélation positive entre le taux d'apoptose dans les tumeurs et la progression tumorale ou encore la présence d'HPV dans des cellules ne possédant pas les récepteurs nécessaires à leur entrée.

Plusieurs publications ont démontré que le transfert de gènes *in vitro* est observable *in vivo* [Burghoff 2008, Ehnfors 2009]. Dans ces conditions, il est raisonnable de se demander si des traitements de chimio/radiothérapies, induisant l'apoptose des cellules tumorales, peuvent influencer le THG. Dans de nombreux cancers, dont le cancer du col de l'utérus, des patientes déclarées en rémission après avoir été traitées par divers traitements inducteurs d'apoptose récidivent des mois voire des années après, sur un même site ou à distance. Bien qu'aucune preuve ne lie ces récurrences au THG, il pourrait être intéressant de combiner les traitements classiques à un traitement empêchant le transfert horizontal de gènes. C'est dans ce but qu'il est nécessaire de connaître le mécanisme de THG et de savoir en particulier ce qui diffère entre le mécanisme d'internalisation des corps apoptotiques par des cellules phagocytaires spécialisées permettant leur élimination et celui induisant un THG. C'est pourquoi nous avons aussi étudié le mécanisme d'internalisation impliqué dans notre modèle de THG ainsi que le devenir des cellules apoptotiques après leur internalisation.

Afin de suivre l'internalisation des corps apoptotiques en temps réel, nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe de Patrick Sandoz, du laboratoire d'optique de l'institut FEMTO-ST de Besançon, qui a mis au point des lames de microscope avec un système de repositionnement intégré ou mire. Ensemble, nous avons adapté leur microsystème à son utilisation sur un microscope confocal afin de visualiser des préparations

biologiques. Le repositionnement à l'aide de la mire permet des observations séquentielles d'une même zone avec une excellente précision.

Matériel & Méthodes

Matériel & méthodes

L'objectif de ce matériel et méthodes n'est pas de reprendre en détail chaque expérience réalisée durant ces travaux de thèse mais de présenter schématiquement l'ensemble des manipulations : de l'induction de l'apoptose des cellules tumorales à la caractérisation des fibroblastes transformés. Les détails de chaque manipulation sont inclus dans l'article correspondant ou dans les résultats supplémentaires.

I) Schéma général

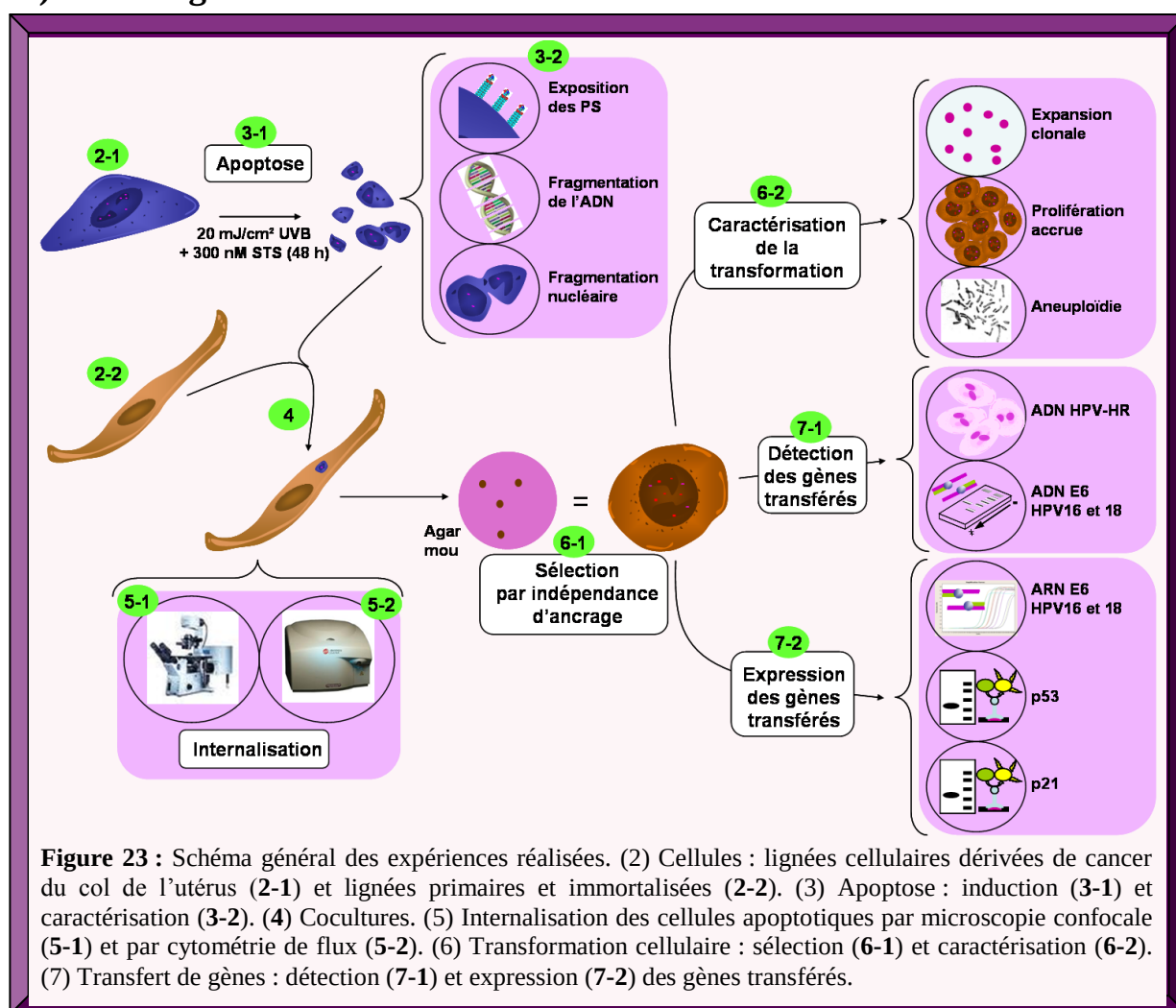


Figure 23 : Schéma général des expériences réalisées. (2) Cellules : lignées cellulaires dérivées de cancer du col de l'utérus (2-1) et lignées primaires et immortalisées (2-2). (3) Apoptose : induction (3-1) et caractérisation (3-2). (4) Cocultures. (5) Internalisation des cellules apoptotiques par microscopie confocale (5-1) et par cytométrie de flux (5-2). (6) Transformation cellulaire : sélection (6-1) et caractérisation (6-2). (7) Transfert de gènes : détection (7-1) et expression (7-2) des gènes transférés.

II) Cellules

2-1) Lignées cellulaires dérivées de cancer du col de l'utérus

Trois lignées dérivées de cancer du col de l'utérus provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC) ont été utilisées pour ce travail. Les deux premières lignées HeLa et Ca Ski dérivent respectivement d'un adénocarcinome et d'un carcinome épidermoïde du col de l'utérus, possèdent une protéine p53 sauvage (p53^{wt}) et abritent des HPV oncogènes dont l'ADN est intégré à l'ADN chromosomique. La lignée **HeLa** abritant plusieurs dizaines de copies d'HPV18 est cultivée en milieu EMEM supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF). La lignée **Ca Ski** abritant plusieurs centaines de copies de HPV16 est, quant à elle, cultivée en milieu RPMI 1640 10% SVF. La troisième lignée cellulaire, **C-33 A**, est dérivée d'un carcinome épidermoïde, surexprime une protéine p53 mutée (p53^{mt}) mais ne contient pas d'HPV. Les cellules C-33 A sont cultivées comme les cellules HeLa. Ces lignées sont utilisées comme cellules donneuses après induction d'apoptose mais servent aussi de témoin de la transformation cellulaire et de l'infection par HPV.

2-2) Cellules primaires et immortalisées

Des **fibroblastes primaires humains (FPH)**, ont été fournis gracieusement par Gwenaël Rolin du Laboratoire d'Ingénierie et de Biologie Cutanées du Pr. P. Humbert. Les FPH ont été extraits à partir de fragments de peau obtenue après abdominoplastie. Ce laboratoire nous a également fourni des **kératinocytes primaires humains (KPH)** à partir des mêmes échantillons de peau. Les FPH et les KPH extraits de résidus chirurgicaux ne sont pas soumis à la validation d'un comité d'éthique et au consentement du patient conformément à la loi L.1245-2 du code de la santé publique appliquée en France. En outre, le laboratoire du Pr. Humbert possède les documents manuscrits certifiant la non-opposition des patients à l'utilisation de ses résidus opératoires à la recherche médicale en conformité avec la loi L.1211-2.

Une lignée fibroblastique immortalisée issue d'un embryon de souris, **NIH/3T3**, provenant de l'ATCC a aussi été utilisée dans ce travail. Ces 3 types cellulaires ont servi de cellules receveuses mais servent également de témoin négatif de la transformation cellulaire et de l'infection par HPV. Les fibroblastes humains et murins sont cultivés en milieu DMEM

10% SVF et les kératinocytes primaires en milieu spécifique supplémenté, Keratinocyte Growth Medium 2 (Promocell).

III) Apoptose

3-1) Induction de l'apoptose

Pour induire l'apoptose, les cellules ont été traitées avec 300 nM de staurosporine (STS) pendant 48 heures, en milieu de culture complet, et/ou d'une irradiation aux UVB allant de 10 mJ/cm² à 40 mJ/cm² [Bernard 2001]. Lors des expériences de coculture et de transformation, le traitement optimum utilisé était **300 nM de STS pendant 48 heures** précédé d'une irradiation **UV de 20 mJ/cm²**.

3-2) Caractérisation de l'apoptose

Trois techniques ont permis de vérifier le pourcentage d'apoptose induite par ces traitements : un marquage à l'**annexine V** (annexin V-FITC apoptosis detection kit I, Becton Dickinson), à l'**iodure de propidium**, et au **DAPI** (4',6'-diamidino-2-phénylindole). L'annexine V se lie spécifiquement aux phosphatidylsérines et permet de déterminer le pourcentage de cellules possédant des phosphatidylsérines membranaires exposées à l'extérieur des membranes plasmiques. Cette exposition est l'un des premiers changements morphologiques induit lors de l'apoptose. Le marquage est réalisé suivant les recommandations du fournisseur et l'analyse est effectuée sur 2.10⁴ événements par cytométrie de flux (cytomics FC500 flow cytometer, Beckman Coulter). L'iodure de propidium est un intercalant de l'ADN qui permet de déterminer la quantité d'ADN par cellule, traduisant la fragmentation cellulaire en fin d'apoptose (cellules en Sub-G1). Les cellules sont marquées, après fixation 24 heures à 4°C par de l'éthanol glacial à 70%, par une solution d'iodure de propidium à 0,1 mg/ml, RNaseA DNase-free à 20 µg/ml. Vingt mille événements sont analysés en cytométrie de flux. La dernière technique utilisée est le marquage de l'ADN nucléaire au DAPI qui permet de visualiser la fragmentation nucléaire en microscopie à fluorescence. Après fixation au paraformaldéhyde 3,7% à 4°C pendant 20 minutes et perméabilisation au triton X100 0,1% à température ambiante pendant 10 minutes, les cellules sont marquées par une solution de DAPI à 300 nM à température ambiante

pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite montées entre lame et lamelle et observées en microscopie à fluorescence (Olympus FluoView 1000 fluorescent microscope).

L'absence de cellules capables de proliférer dans les suspensions de cellules apoptotiques a été vérifiée par deux tests de prolifération. Le premier est un **test au MTT** (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) réalisé suivant les recommandations du fournisseur (Cell Proliferation Kit I MTT test, Roche). Les cellules proliférantes dégradent le MTT en un composé coloré, les cristaux de formazan violet, dont la concentration est mesurée au spectrofluorimètre (scanning multi-well spectrofluorimeter EnVision® 2102 Multilabel Reader, Perkin Elmer). L'absence de cellules capables de proliférer a aussi été vérifiée par **remise en culture** des suspensions de cellules apoptotiques pendant 28 jours.

IV) Coculture

Les FPH, les KPH et les NIH/3T3 ont étéensemencés la veille des cocultures à la concentration souhaitée. Les cellules apoptotiques ont été ajoutées à différents ratios après marquage ou non au CFDA, SE (5-(and 6-)-carboxyfluoresceine diacetate succinimidyl ester) : de 1 cellule apoptotique pour 10 cellules receveuses à 50 cellules apoptotiques pour 1 cellule receveuse. Les durées de coculture varient aussi suivant la manipulation : de 30 minutes à 48 heures. Pour la transformation des cellules receveuses par les cellules apoptotiques, le ratio utilisé était de **10 cellules apoptotiques pour 1 cellule receveuse** et la durée de coculture de **48 heures**.

V) Internalisation des cellules apoptotiques

5-1) Microscopie confocale

Deux combinaisons de marqueurs ont été utilisées pour suivre l'internalisation de cellules apoptotiques. Dans le premier marquage, aspécifique, les cellules apoptotiques sont marquées au **CFDA, SE** à 1 µg/ml dilué dans du milieu DMEM 2% SVF avant la coculture. Le CFDA, SE fixe les groupements amines des protéines membranaires et intracellulaires et a la propriété de ne pas être transféré après marquage. Après coculture, fixation au formaldéhyde et perméabilisation au Triton X100 comme précédemment, les cellules

receveuses sont visualisées après une incubation de 30 minutes à 4°C avec de la **phalloïdine-TRITC** ((tetramethylrhodamine-isothiocyanate)-conjugated phalloidin) diluée au 1/200^{ème}, qui se fixe aux filaments d'actine.

Le deuxième marquage, spécifique des filaments intermédiaires de chaque type cellulaire, est réalisé sur des cocultures de cellules apoptotiques avec des fibroblastes. Un anticorps polyclonal anti-**vimentine** de lapin (clone SP20; GeneTex) utilisé au 1/100^{ème} et un anticorps monoclonal anti-**cytokératine** de souris (clone AE1/AE3, Dakocytomation) utilisé au 1/50^{ème}, permettent de différencier, respectivement, les fibroblastes des cellules épithéliales. Les anticorps secondaires utilisés sont un anti-lapin couplé à la rhodamine (Rhodamine (TRITC)-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch) et un anti-souris couplé à la cyanine 2 (CYTM2-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG, Jackson ImmunoResearch).

Dans les deux cas les noyaux des cellules receveuses et l'ADN des cellules apoptotiques sont marqués au **DAPI** comme décrit précédemment. Les cocultures sont observées en microscopie confocale à fluorescence (Olympus FluoView 1000 fluorescent microscope).

5-2) Cytométrie de flux

L'internalisation des cellules apoptotiques a aussi été suivie par cytométrie en flux. Les cellules apoptotiques sont marquées au **CFDA, SE** comme décrit pour la microscopie. Les cellules receveuses sont différenciées des cellules apoptotiques par leur **taille**. Ainsi, les événements de petite taille (<13 µm), positifs pour le CFDA, SE correspondent aux cellules apoptotiques, les événements de grande taille (>13 µm), négatifs pour le CFDA, SE correspondent aux fibroblastes et les événements de grande taille et positifs pour le CFDA, SE correspondent aux fibroblastes ayant internalisé une ou plusieurs cellules apoptotiques.

5-3) Utilisation de la mire microscopie confocal

Pour suivre l'internalisation des cellules apoptotiques en temps réel, nous avons utilisé un système référencé en position ou mire. La mise au point, permettant son utilisation avec des cultures cellulaires et réalisée en collaboration avec l'équipe de P. Sandoz, est détaillée dans la partie « Mise au point et utilisations de la mire ».

VI) Transformation cellulaire

6-1) Sélection des cellules transformées

La transformation des cellules receveuses est déterminée par un test en **agar mou**. Les cellules sontensemencées en plaque 24 puits sur une couche de milieu semi-solide (RPMI, 10% FBS, 0,5% agar) dans une couche de milieu semi-solide (DMEM, 10% FBS, 0,35% agar) à raison de 8.10^3 à 3.10^5 cellules/ml. Après 21 jours de culture, la présence de clones caractéristiques de l'indépendance d'ancrage propre aux cellules transformées est vérifiée sous microscope inversé. Les cellules apoptotiques ensemencées seules en agar mou ne forment pas de clones permettant de s'assurer que les clones poussant après coculture n'étaient pas dus à des cellules cancéreuses résiduelles.

Deux lignées de fibroblastes transformés ont été établies en récupérant l'ensemble des clones poussant sur un milieu semi-solide. Ainsi la lignée **FH** a été dérivée après transformation de fibroblastes primaires humains par des cellules apoptotiques HeLa et la lignée **FC** après transformation de fibroblastes primaires humains par des cellules apoptotiques Ca Ski.

Le phénotype fibroblastique des lignées FH et FC a été vérifié par immunomarquage avec des anticorps reconnaissant les filaments intermédiaires spécifiques des cellules épithéliales (cytokératine) et des fibroblastes (vimentine) comme décrit dans la partie 5-1.

6-2) Caractérisation des cellules transformées

La transformation des fibroblastes a été confirmée par plusieurs expériences reflétant les propriétés des cellules transformées : la **formation de clones** en culture en faible densité (dilution limite), une **prolifération accrue** (test MTT et courbe de prolifération), une **aneuploïdie** (iodure de propidium). Pour la technique de dilution limite, les cellules sont ensemencées en plaque 6 puits à raison de 500 cellules par puits et cultivées en milieu complet pendant 21 jours. Les colonies obtenues sont colorées par une solution de cristal violet 0,1%, éthanol 5% et photographiées sous microscope. La prolifération des cellules est suivie pendant 10 jours par numération au cytomètre Cell Lab Quanta™ SC et pendant 5 jours par un test au MTT comme décrit précédemment. Pour mesurer la ploïdie des cellules

transformées, 1.10^6 cellules sont fixées à l'éthanol glacial à 70% pendant 24 heures puis marquées à l'iodure de propidium. Le cytomètre de flux FC500 flow cytometer (Beckman Coulter), a permis l'analyse de 2.10^4 événements et la détermination de la moyenne d'intensité de fluorescence du pic G0/G1 correspondant à 48 chromosomes. La fluorescence étant proportionnelle à l'ADN contenu par chaque cellule, il est possible de déterminer la quantité d'ADN total en la comparant avec celles des fibroblastes primaires à ploïdie normale.

VII) Transfert de gènes

7-1) Détection des gènes transférés

Deux techniques ont été utilisées pour suivre le transfert des gènes d'HPV. L'**hybridation *in situ*** utilisant un cocktail de sondes spécifiques des **HPV à haut risque** permet de détecter et de localiser au niveau cellulaire la présence d'ADN d'HPV 16 et 18. Pour cela, les cellules sont cultivées sur des lames de poly-L-lysine, fixées 15 minutes à température ambiante au paraformaldéhyde 3,7% et perméabilisées 10 minutes à température ambiante au PBS Tween 1%. Les étapes d'hybridation du cocktail de sondes reconnaissant les HPV à haut risque, d'hybridation de l'anticorps secondaire, de fixation du complexe enzymatique et de révélation par dégradation du substrat chromogène sont réalisées à l'aide de l'automate « BenchMark® XT Automated Slide Stainer » (Ventana Medical Systems). Une contrecoloration est réalisée à l'éosine.

La recherche de l'ADN d'HPV et en particulier d'**E6 d'HPV 16 et 18** a été réalisée par **PCR**. L'ADN total est extrait de 1.10^6 cellules en utilisant la trousse QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) conformément aux instructions du fabricant. Trois PCR ciblant les gènes d'E6 d'HPV16, d'E6 d'HPV 18 et de l'albumine, utilisant 500 nM des amorces correspondantes comme décrit précédemment (Saunier *et al.*, en attente de brevet et Laurendeau et coll., respectivement), sont réalisées avec une pré-incubation de 5 minutes à 94°C, 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'hybridation à 57°C pour l'albumine, 51°C pour E6 d'HPV 16 et 55°C pour E6 d'HPV18 pendant 30 secondes, d'élongation à 72°C pendant 20 secondes et terminées par 7 minutes d'élongation finale à 72°C. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose.

7-2) Expression des gènes transférés

Nous avons vérifié que les gènes transférés étaient transcrits en recherchant la présence des **ARNm d'E6 d'HPV 16 et 18**. Les ARN totaux sont extraits de 2.10^6 cellules en utilisant la trousse QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen). Après une digestion à la DNase I (Invitrogen), 500 ng d'ARN sont rétrotranscrits en utilisant la MMLV-Reverse Transcriptase (Invitrogen) suivant les instructions du fabricant. Vingt-cing nanogrammes d'ADNc sont préamplifiés en utilisant 45 nM d'amorces ciblant E6 d'HPV16, E6 d'HPV18 et la β -2-microglobuline humaine dans du tampon « TaqMan PreAmp Master Mix » (Applied Biosystems), comme suivant : une pré-incubation de 10 minutes à 95°C, 10 cycles d'amplification à 95°C pendant 15 secondes et à 60°C pendant 4 minutes. Les produits préamplifiés sont quantifiés, en utilisant 500 nM d'amorces (Eurogentec) et des sondes TaqMan (100 nM pour la β -2-microglobuline: 5'-FAM-cctccatgatgctgcttacatgtctcgatccc-BHQ1-3'; 250 nM pour E6 d'HPV16: 5'-FAM-aggagcgacccagaaagttaccacagtt-BHQ1-3' ou E6 d'HPV18: 5'-JOE-caacacggcgaccctacaagctacc-BHQ1-3', Eurogentec) suivant le protocole du fabricant. Les courbes standards sont obtenues par des dilutions en série 1.10^6 à 1.10^0 des plasmides pBR322-HPV16 et pBR322-HPV18 dilués dans de l'ADN de sperme de saumon à 50 ng/ μ l.

Afin de vérifier la fonctionnalité des protéines E6 codées par les gènes transférés, la détection d'une de ces protéines cibles, p53, et de p21 elle-même cible de p53 a été réalisée par western blotting. Trente microgrammes de protéines totales sont séparés par SDS-PAGE et électrotransférés sur une membrane Hybond™-P (GE Healthcare Lifesciences). Des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre p53 (clone DO-7, Becton Dickinson), p21 (clone 6B6, Becton Dickinson) et la β -actine (clone AC-15, Sigma Aldrich) sont utilisés aux dilutions 1:500, 1:500 et 1:8000, respectivement. Un anticorps secondaire couplé à la peroxydase est utilisé à une dilution de 1:10000 pour p53, 1:5000 pour p21 et 1:40000 pour la β -actine. Les immunomarquages sont analysés par chimioluminescence en utilisant un système de révélation à l'ECL (« Enhance ChimioLuminescence » Plus Reagents System, GE Healthcare Wauwatosa).

Publication n°1

Apoptotic HPV positive cancer cells exhibit transforming properties.

Emilie Gaiffe, Jean-Luc Prétet, Sophie Launay,
Elise Jacquin, Maëlle Saunier, Geneviève Hetzel, Pierre Oudet,
and Christiane Mougin.

Plos One (soumis)

Ce travail a été présenté sous forme orale à :

- IIèmes Journées Scientifiques du Groupe Francophone de Recherche sur les Papillomavirus, Malbuisson – France. 30 Septembre – 2 Octobre 2009.

E. Gaiffe, S. Launay, P. Oudet, J.L. Prétet, C. Mougin. Transfert horizontal d'oncogènes : un mécanisme alternatif de la carcinogenèse induite par les HPV.

- 3ème Forum du CGE, Strasbourg – France. 19-20 Novembre 2009.

E. Gaiffe, S. Launay, M. Saunier, P. Oudet, J.L. Prétet, C. Mougin. Une nouvelle voie de carcinogenèse : la transformation cellulaire induite par transfert horizontal d'oncogènes viraux via les corps apoptotiques.

- Réunion annuelle de la Société de Biologie de Besançon, Besançon – France. 10 Décembre 2009.

E. Gaiffe, S. Launay, M. Saunier, P. Oudet, J.L. Prétet, C. Mougin. Une nouvelle voie de carcinogenèse viro-induite ?

- Emerging Oncogenic Viruses, San Pietro In Bevagna, Manduria – Italie. 2-6 Juin 2010.

E. Gaiffe, S. Launay, M. Saunier, P. Oudet, J.L. Prétet, C. Mougin. Horizontal transfer of viral oncogenes: an alternative pathway of carcinogenesis.

Ce travail a été présenté sous forme de poster à :

- Oncotrans 2009, 1er Colloque Inter-Régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie, Nancy – France. 19 – 20 Mars 2009.

E. Gaiffe, M. Saunier, S. Launay, P. Oudet, J.L. Prétet, C. Mougin. Horizontal Transfer of Viral Oncogenes: An Alternative Pathway Of Carcinogenesis.

- HPV2009, The 25th International Papillomavirus Conference, Malmö – Suède. 8 – 14 Mai 2009.

E. Gaiffe, M. Saunier, S. Launay, P. Oudet, J.L. Prétet, C. Mougin. Horizontal Transfer of Viral Oncogenes: An Alternative Pathway of Carcinogenesis.

- XVIème Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon – France. 7-8 Juin 2010. (1er prix poster).

E. Gaiffe, S. Launay, M. Saunier, P. Oudet, J.L. Prétet, C. Mougin. Le transfert horizontal d'oncogènes contribue au développement des cancers associés aux HPV.

Introduction à la publication n°1

L'objectif de cette première publication a été de démontrer si le transfert horizontal de gènes permettait à des cellules apoptotiques issues de cancer du col de l'utérus de transformer des cellules saines. Ce modèle n'existant pas, nous nous sommes appuyés sur la littérature décrivant le transfert horizontal de gènes ainsi que sur les publications de notre équipe étudiant l'induction de l'apoptose chez des cellules dérivées de cancer du col de l'utérus pour le mettre au point [Bernard 2003, Charlot 2004, Charlot 2006, Guerrini 2011]. Nous avons ainsi induit l'apoptose de 3 lignées cellulaires dérivées de cancer du col de l'utérus (infectées ou non par des HPV) par un traitement à la staurosporine (un inhibiteur de protéines kinases) et par des irradiations UVB. Ces résultats liés à la publication suivante en tant que « Supporting Information » disponibles en ligne font suite à la publication.

Après avoir obtenu et caractérisé une suspension de cellules apoptotiques dépourvue de cellules vivantes, nous avons mis au point un système de coculture avec des fibroblastes primaires humains. Une lignée fibroblastique murine et des kératinocytes primaires humains ont aussi été utilisés comme cellules receveuses. Ces résultats sont présentés en résultats supplémentaires de la publication n°1. Dans ce travail, nous avons suivi les étapes du transfert horizontal de gènes de l'internalisation de la cellule apoptotique jusqu'à la transformation des cellules receveuses. Nous avons vérifié que cette transformation était consécutive au transfert de l'ADN d'HPV.

Apoptotic HPV Positive Cancer Cells Exhibit Transforming Properties.

Emilie Gaiffe^{1,2}, Jean-Luc Pr  tet^{1,2,3}, Sophie Launay^{1,2}, Elise Jacquin^{1,2}, Maëlle Saunier^{1,2,4}, Pierre Oudet⁵, and Christiane Mougin^{1,2,3}.

1 Univ Franche-Comte, F-25000 Besancon, France; 2 EA 3181, IFR133, F-25000 Besancon, France; 3 CHU Besancon, F-25000, France; 4 Present address: Institut Catal   d'Oncologia - L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain and 5 Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg, F-67000.

Abstract

Previous studies have shown that DNA can be transferred from dying engineered cells to neighboring cells through the phagocytosis of apoptotic bodies, which leads to cellular transformation. Here, we provide evidence of an uptake of apoptotic-derived cervical cancer cells by human mesenchymal cells. Interestingly, HeLa (HPV 18+) or Ca Ski (HPV16+) cells, harboring integrated high-risk HPV DNA but not C-33 A cells (HPV-), were able to transform the recipient cells. Human primary fibroblasts engulfed the apoptotic bodies effectively within 30 minutes after co-cultivation. This mechanism is active and involves the actin cytoskeleton. *In situ* hybridization of transformed fibroblasts revealed the presence of HPV DNA in the nucleus of a subset of phagocytosing cells. These cells expressed the HPV16/18 E6 gene, which contributes to the disruption of the p53/p21 pathway, and the cells exhibited a tumorigenic phenotype, including an increased proliferation rate, polyploidy and anchorage independence growth. Such horizontal transfer of viral oncogenes to surrounding cells that lack receptors for HPV could facilitate the persistence of the virus, the main risk factor for cervical cancer development. This process might contribute to HPV-associated disease progression *in vivo*.

Keywords: apoptotic cells, HPV oncogenes, cellular transformation, cervical cancer, horizontal gene transfer.

Footnotes:

Corresponding author: Pr Christiane MOUGIN, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, EA 3181 - IBCT - IFR 133 - Université de Franche-Comté, CHU Jean Minjoz - Boulevard A. Fleming, F-25030 BESANÇON CEDEX, T  l : +33 3 81 66 91 11 - Fax : +33 3 81 66 83 42, christiane.mougin@univ-fcomte.fr

Introduction

Epidemiological and experimental studies have highlighted that high-risk human papillomaviruses (HPV), especially HPV 16 and 18, play a major role in the induction of carcinomas of the cervix [1,2]. The mechanistic aspects of HPV-induced carcinogenesis are most often related to deletion of the E2 ORF as a consequence of viral DNA integration into the host genome [3]. This leads to a deregulated

expression of viral E6 and E7 genes, which represent the main transforming genes. At the heart of this transformation are the binding of E6 to p53 and E6AP, which favors p53 degradation [4] and the E7 complex formation with the retinoblastoma protein pRb [5], resulting in the deregulation of cell cycle control, DNA repair and apoptosis.

During tumor development, a large percentage of cells is lost through apoptosis [6]. Such cell death is triggered by a variety of

extracellular signals, including growth/survival factor depletion, hypoxia and a loss of cell-matrix interactions, as well as intracellular signals such as DNA damage [7]. Finally, apoptotic cells are cleared by specialized phagocytic cells that inactivate and degrade their cellular components [8]. However, apoptotic cells can also be internalized by non-specialized recipient cells. Thus, fibroblasts are able to engulf apoptotic neutrophils [9], and liver endothelial cells can bind and phagocytose liver apoptotic bodies [10]. Through this endocytic process, apoptotic cells can act as a DNA vector, and the horizontally transferred DNA may confer a selective advantage to the recipient cell.

Horizontal gene transfer (HGT) has been well documented in prokaryotes and contributes to evolution, ecology and resistance to antibiotics [reviewed in [11,12]]. While the horizontal

transfer of genetic information between two eukaryotes has been reported in plants [13,14] and invertebrates [15], few studies have focused on HGT between mammalian cells. The exchange of genetic information mediated by apoptotic bodies has been shown to occur between prostate cancer cells [16]. The apoptotic bodies of transformed lymphoid cells harboring integrated copies of the Epstein-Barr virus can also transfer viral DNA sequences [17]. Similarly, HIV-1 proviral genes are transferred to cells lacking receptors for viral entry [18]. DNA has also been reported to be transferred from apoptotic H-ras^{V12}- and c-myc-transfected cells to p53^{-/-} mouse embryonic fibroblasts, which leads to their transformation [19]. On the other hand, phagocytosing cells that express p53 or p21 are not transformed, suggesting a protective mechanism controlled by the p53 pathway [20].

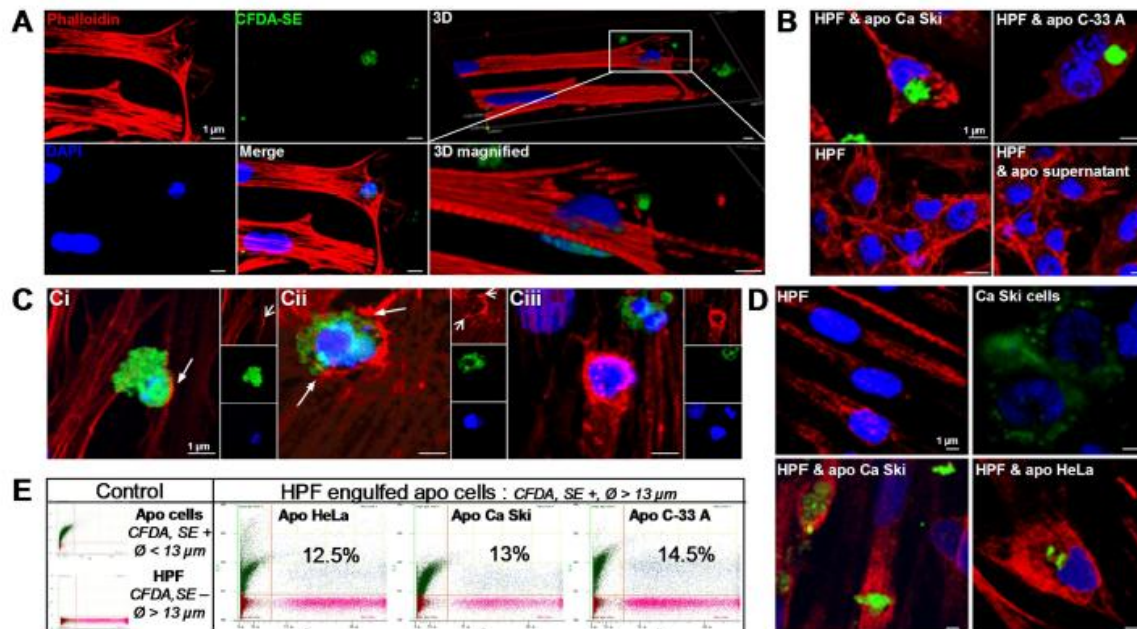


Figure 1. Apoptotic cells are engulfed by fibroblasts. (A, B, and C) HPFs plated onto coverslips were incubated with apoptotic HeLa (apo HeLa), Ca Ski (apo Ca Ski) and C-33 A (apo C-33 A) cells for 48 h. Before incubation, the apoptotic cells were stained with CFDA, SE. Co-cultures were fixed and permeabilized prior to actin staining using phalloidin-TRITC. DAPI was used to visualize the fibroblast nuclei and apoptotic cell DNA. The 3D picture (z projection) was reconstituted from 32 horizontal 2D slices obtained by confocal microscopy. (A) Co-culture of HPFs and apoptotic HeLa cells. (B) Co-cultures of HPFs and apoptotic Ca Ski cells (upper left), HPFs and apoptotic C-33 A cells (upper right), HPFs alone (bottom left) and HPFs with the supernatant of apoptotic HeLa cells (bottom right). (C) HPFs were cultured with apoptotic HeLa cells for different lengths of time: 1 h (Ci), 2 h (Cii) and 3 h (Ciii). The pictures show actin recruitment and membrane expansion formation (arrows). (D) HPFs, Ca Ski cells and HPFs plus apoptotic Ca Ski or HeLa cells were plated onto coverslips, incubated for 48 h and then stained with anti-vimentin (TRITC) and anti-cytokeratin (Cy2) antibodies. (E) HPFs were incubated with apoptotic HeLa, Ca Ski or C-33 A cells for 48 h. Apoptotic cells were labeled with CFDA, SE, prior to incubation. HPFs were distinguished from apoptotic cells by their diameter as evaluated by flow cytometry. Events with small diameters and positive for CFDA, SE, were considered apoptotic cells (upper left quadrant), events with large diameters and negative for CFDA, SE, were HPFs (bottom right quadrant), and events with large diameters and positive for CFDA, SE, were HPFs with engulfed apoptotic cells (upper right quadrant). All microscope observations were performed with a confocal microscope (scale bar: 1 μm). All results are representative of four independent experiments.

Recently, Ehnfors J. *et al.* demonstrated that fibroblasts and endothelial cells are capable of acquiring and replicating H-ras^{V12} and c-myc DNA when apoptotic tumor cells contain the simian virus 40 large T (SV40LT) antigen [21]. These observations provided evidence that transformation efficiency is associated with the expression of SV40LT inhibiting p53 [22]. Because the majority of cervical carcinomas express the E6 viral oncoprotein, which promotes p53 degradation, as does SV40LT, we hypothesized that the horizontal transfer of HPV oncogenes could be an alternative mechanism of carcinogenesis.

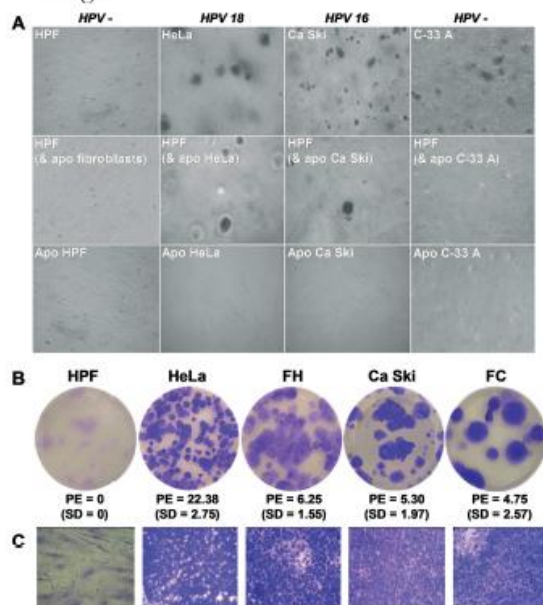


Figure 2. Apoptotic cells infected by HPV transform fibroblasts. (A) HPFs and HeLa, Ca Ski and C-33 A cervical cancer cells (upper line); HPFs after 48 h of exposure to apoptotic cells (apo HPF, apo HeLa, apo Ca Ski, apo C-33 A) at a ratio of 10 apoptotic cells per HPF (middle line) were cultured in soft agar at 3×10^5 cells/ml for 21 days. Apoptotic cells alone were also cultured as a control (lower line). Photographs were taken using a digital camera coupled to an inverted optical microscope with a 20x magnification lens. (B and C) HPFs, HeLa cells, Ca Ski cells and fibroblasts transformed by apoptotic HeLa (FH) and apoptotic Ca Ski (FC) cells were selected on soft agar and grown in 6-well plates at a limit-dilution (5×10^2 cells/well) for 21 days. (B) The cultures were photographed with a digital camera. The colonies stained with purple crystal were counted, and the plating efficiency (PE, percentage of cells able to form colonies; SD, standard deviation) was calculated. (C) Colony magnifications were photographed with an inverted optical microscope with a 40x magnification lens.

Here, we present evidence that apoptotic cells derived from cervical-derived cancer cells harboring integrated copies of HPV are able to transform human primary fibroblasts (HPF). We

further demonstrate that recipient tumor cells can be characterized by a high rate of proliferation and hyperploidy. In addition, the viral genetic material inhibiting the p53/p21 pathway is expressed in the transformed cells. To our knowledge, this is the first report of the transformation of human primary cells through the uptake of apoptotic bodies from HPV-infected cervical carcinoma cells.

Results

Apoptotic cervical carcinoma cells are internalized by fibroblasts

The apoptosis of cervical carcinoma donor cells was induced by UVB irradiation and staurosporine exposure as previously described [23,24] and was documented by an analysis of phosphatidylserine exposure (annexin V staining), DNA content (propidium iodide staining) and nuclear fragmentation (DAPI staining) (Supporting information and Fig. S1A and S1B). The treatment resulted in the absence of living cells capable of proliferation within the apoptotic cell suspensions (Supporting information and Fig. S1C and S1D). Previous studies have shown that apoptotic bodies derived from EBV-carrying B lymphocytes can transmit DNA by horizontal transfer and that EBV-integrated DNA may be preferentially transferred as compared with cellular DNA [17]. In this study, we questioned whether HPFs could engulf apoptotic cells derived from the cervical carcinoma cell lines HeLa (HPV18), Ca Ski (HPV16) and C-33 A (HPV-), regardless of virological status.

The presence of fluorescent apoptotic cells in the recipient cells was confirmed by confocal microscopy. Apoptotic HeLa cells containing DNA were entangled in the actin cytoskeleton of the HPFs within 48 h (Fig. 1A). Apoptotic Ca Ski and C-33 A cells were also taken up efficiently by the recipient (Fig. 1B). Incubation of the HPFs alone or with the supernatant of apoptotic cells did not result in CFDA, SE (5-(and 6)-carboxyfluoresceine diacetate succinimidyl ester) staining, suggesting a link between green fluorescence and the presence of apoptotic cells (Fig. 1B). By tracking the fluorescent dyes at early time points (from 1 h to 3 h), we observed actin recruitment when

apoptotic cells were bound to HPFs (Fig. 1Ci, white arrow). The fibroblast membrane expanded around both sides of the apoptotic cell through actin polymerization (Fig. 1Cii, white arrows). F-actin then surrounded the apoptotic cells to form a phagocytic cup and closed in a ring (Fig. 1Ciii). These microscopic observations are indicative of phagocytosis, although we have not specifically characterized this mechanism [25,26]. Using specific markers of intermediate filaments for each cell type, we confirmed that the apoptotic cells were epithelial cells (cytokeratin positive) that were internalized by fibroblasts (vimentin positive) (Fig. 1D). Using the quantitative approach of flow cytometry, we assessed the percentage of HPFs that engulfed the stained apoptotic carcinoma cells. Regardless of the type of apoptotic cells used, the internalization efficiency was similar (12.5% with apoptotic HeLa; 13% with apoptotic Ca Ski; 14.5% with apoptotic C-33 A) (Fig. 1E). However, we noted that 12 to 15% of the fibroblasts were able to take up the apoptotic cells, while the number of apoptotic cells seeded was ten times larger than that of the HPFs. This suggests that fibroblasts have a limited potential in the efficiency and/or quantity of apoptotic cell internalization. When recipient cells were co-incubated with apoptotic cells at 4°C for 48 h, the percentage of internalization dropped significantly to 2%, thus suggesting that the internalization process follows an energy-dependent pathway (Fig. S2). These results indicate that human primary fibroblasts can engulf apoptotic cells, independent of their virological status, through phagocytosis.

Only HPV-positive apoptotic cells efficiently transform recipient cells

Ehlfors *et al.* demonstrated that DNA from rat fibrosarcoma apoptotic cells transfected with H-ras^{V12}, c-myc and SV40LT is transferred to and transforms primary fibroblasts [21]. Because HPV oncogenes, like SV40LT, are capable of efficiently transforming infected cells and blocking the p53 pathway, among other effects, we tested whether fibroblasts cultured with apoptotic cells were able to grow with anchorage independence by measuring their ability to form colonies in a soft agar assay, as observed with the HeLa, Ca Ski and C-33 A cancer cells (Fig. 2A,

upper line). In contrast, human primary fibroblasts were unable to grow without a solid matrix (Fig. 2A, upper line). Although the three types of apoptotic bodies were internalized by fibroblasts, only the apoptotic cells harboring HPV (HeLa and Ca Ski cells) transformed the HPFs (Fig. 2A, middle line). The controls with apoptotic cells alone did not result in focus formation (Fig. 2A, lower line).

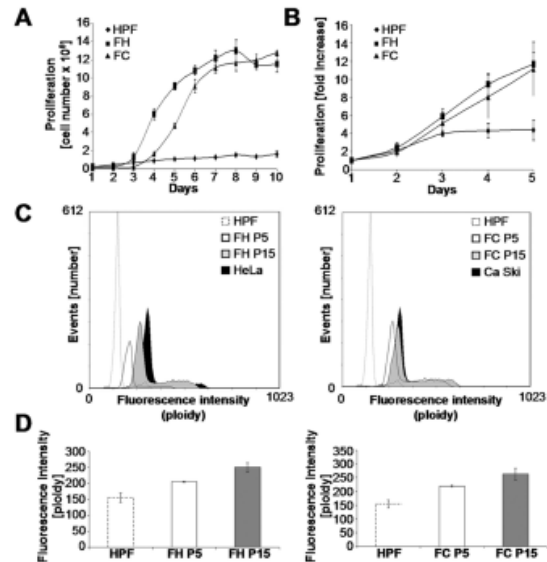


Figure 3. Transformed fibroblasts acquire tumorigenic characteristics. (A and B) HPFs and HPFs transformed by apoptotic HeLa (FH) or apoptotic Ca Ski (FC) cells were grown for the indicated lengths of time. The cell proliferation was monitored each day by counting the total numbers of cells (A) and by MTT assays (B). The graphs present the mean ($\pm$ SD) of three independent experiments. (C and D) HPFs, FH and FC at passages 5 (P5) and 15 (P15) were stained (10^6 cells) with propidium iodide solution, and 2×10^4 events were analyzed by flow cytometry. The MFI of the G0/G1 peak displays the ploidy. (C) Representative results of the cytometry analysis. (D) Mean of three independent experiments ($\pm$ SD).

These findings demonstrate that the incubation of apoptotic cells with HPV-integrated DNA effectively induced anchorage-independent growth of HPFs, a hallmark of transformation and an *in vitro* correlate of tumorigenicity *in vivo* [27]. The transformation status of the HPFs was further tested by limit-dilution assays. Indeed, in contrast to primary fibroblasts, the fibroblasts transformed by apoptotic HeLa (FH) and Ca Ski (FC) cells had the ability to form colonies when they were grown at low density (Fig. 2B). At this stage, the FH and FC began to exhibit a transformed phenotype, with some of the cells appearing

rounded, unlike the control HPFs, which displayed a spindle shape (Fig. 2C). Moreover, the transformed fibroblasts consisted mostly of packed or aggregated small cells such as HeLa and Ca Ski cells, whereas the primary fibroblasts formed a flattened monolayer.

Next, we determined the effects of HPF transformation on the proliferation rate using a growth curve and the results from the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) proliferation assay shown in Fig. 3A and 3B, respectively. The FH had an average population doubling time of 15 h, and the FC had an average time of 16 h, while the HPF doubling time was greater by a factor of 19 (298 h) (Fig. 3A). The mitochondrial activity measured by the MTT proliferation assay was concordant with the growth curve results (Fig. 3B). These growth rate modifications support the tumorigenic potential of the newly transformed fibroblasts. We therefore tested whether the increased growth rate and the transformation of the recipient cells were associated with genetic modifications leading to hyperploidy. Cytometry assays showed that the DNA content increased with the passages of transformed fibroblasts (Fig. 3C). In our experiments, an HPF mean fluorescence intensity (MFI) of 154 corresponded to diploid cells (Fig. 3D). The MFI increased to 205 and 250 after 5 (P5) and 15 (P15) passages of FH cells, respectively. We observed similar results for the FC cells (219 at P5 and 264 at P15). The MFI at passages 15 of FH and FC represented hypertriploidy. Aneuploidy, as seen in our model, is often caused by a particular type of genetic instability and is one of the most common properties of cancers [28].

Apoptotic HPV-associated cancer cells efficiently transfer viral oncogenes to fibroblasts

Because only apoptotic HeLa and Ca Ski donor cells were able to transform fibroblasts, we hypothesized that HPV oncogenes could be transferred to the recipient cells. Our confocal microscopy analysis suggested that genetic material was transferred from the apoptotic cells to the fibroblast nuclei after 6 h of co-culture (Fig. 4A, white arrows). The actin cytoskeleton reorganization appeared to deliver the apoptotic cell toward the nucleus for DNA transfer, as seen

at a high magnification by superimposing transmitted light with phalloidin or DAPI staining images. Following these observations, we investigated the HPV DNA transfer in fibroblast recipients using *in situ* hybridization (ISH) with a probe hybridized specifically to high-risk HPV DNA. HeLa and Ca Ski cells were used as positive controls. Confirming our hypothesis, the hybridization signals were observed as purple dots in the apoptotic cells and nuclei of the transformed fibroblasts (FH and FC) whereas no signal was detected in the HPFs (Fig. 4B).

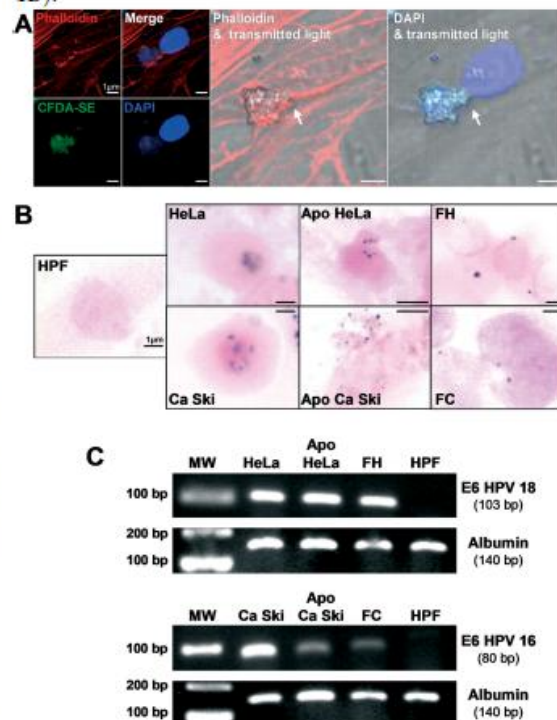


Figure 4. HPV oncogenes are transferred through apoptotic cells to transformed fibroblasts. (A) HPFs plated on coverslips were incubated for 48 h with apoptotic HeLa cells stained with CFDA, SE. Co-cultures were fixed and permeabilized prior to actin staining with phalloidin-TRITC. DAPI was used to visualize the fibroblast nuclei and apoptotic cell DNA. Microscopic observations were performed with a confocal microscope (scale bar: 1 μ m). The images illustrate the DNA transfer from the apoptotic cells to the fibroblast recipients (arrows). (B) High-risk HPV DNA was detected by *in situ* hybridization in parental and apoptotic HeLa and Ca Ski cells, FH and FC but not in HPFs. Cells were counterstained with eosin and observed with an inverted microscope (scale bar: 1 μ m). (C) Agarose gel electrophoresis of amplified human albumin and E6 HPV18 and E6 HPV16 DNA. Total DNA from parental cancer cells, apoptotic cells, transformed cells and HPFs was extracted for PCR (MW: molecular weight). The images are representative of three independent experiments.

These data validate the hypothesis of horizontal transfer of viral oncogenes. A second approach consisting of amplifying the E6 DNA of HPV 16 and 18 confirmed the presence of viral DNA in the transformed fibroblasts (Fig. 4C). We further analyzed the expression of E6 HPV16 and E6 HPV18 by reverse transcriptase followed by real-time quantitative PCR. Figure 5A illustrates that the E6 transcripts were detected in the transformed FH and FC cells with however lower levels than in the parental HeLa and CaSki cells. These data suggest that the transfer of viral oncogenes is efficient and functional. To more thoroughly scrutinize the role of the transferred E6 oncogenes as inhibitors of p53 expression, we immunoblotted for p53 and one of its targets, p21. Accordingly, the p53 and p21 levels of the transformed HPFs decreased substantially, similar to the decrease in donor cancer cells (Fig. 5B). Overall, these results emphasize a critical role of viral oncogene transfer in the transformation of primary cells, a process that bypasses the p53 pathway.

Discussion

The results of this study provide direct evidence of the oncogenic potential of HPV positive apoptotic cells. The transfer of viral DNA derived from HPV-positive cervical cancer cells through HGT promoted the growth and transformation of HPFs and could represent an alternative mechanism for HPV-associated cellular transformation. Bergsmedh *et al.* previously demonstrated horizontal oncogene transfer between eukaryotic cells [19]. In their model, the donor cells were primary rodent fibroblasts modified to overexpress *c-myc* and *H-ras*^{V12} and a hygromycin-resistant gene that permitted a highly stringent selection of transformed recipient cells after HGT.

In our study, the internalization rates of apoptotic cancer cells were similar, regardless of the HPV status. However, the finding that only HeLa and Ca Ski cancer cells carrying naturally integrated HPV oncogenes, but not HPV-negative C-33 A cells are able to transform phagocytosing fibroblasts provides support for the hypothesis that viral DNA transferred by apoptotic cells can be reused and expressed by recipient cells.

The *in vitro* recipient cell transformation by horizontally transferred DNA, facilitated by DNA fragmentation, was shown to be dependent on p53 [29]. Indeed, p53- or p21-deficient cells, but not wild-type p53 fibroblasts, became tumor-like after their uptake of *c-myc* and *H-ras*^{V12} oncogenes, indicating that the Chk2/p53/p21 signaling pathway protects cells against the propagation of potentially harmful DNA [19,20,30].

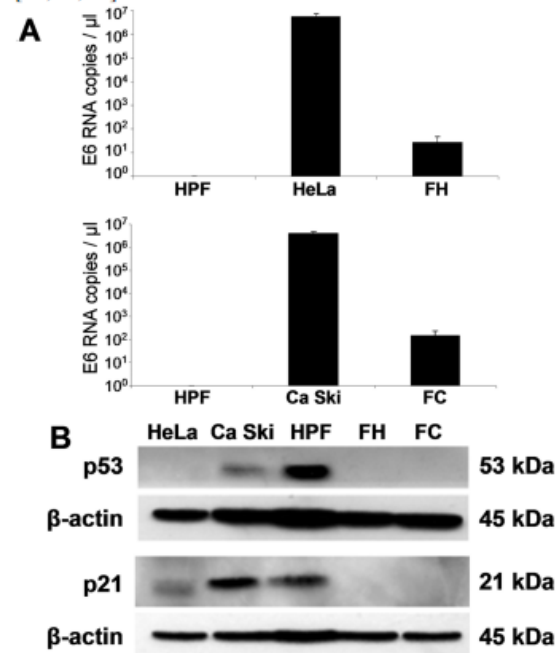


Figure 5. Downregulation of p53 in transformed fibroblasts expressing E6 HPV transcripts. (A) Total RNA from HPFs, parental cells and transformed fibroblasts was extracted. Quantification of E6 HPV18, E6 HPV16 and human β -2-microglobulin was performed by real-time quantitative PCR following reverse transcription. Standard curves were made with serial dilutions (1/10) of the pBR322-HPV18, pBR322-HPV16 and pGEM®-T Easy-B2M plasmids. The graphs represent the mean of three independent experiments ($\pm$ SD). (B) Immunoblotting analyses of p53 and p21 expression in cancer cell lines, HPFs and transformed cells, using mouse monoclonal antibodies against p53 and p21. Blots were also probed with a β -actin antibody.

Moreover, SV40LT, which facilitates p53 degradation, can overcome this genetic surveillance both *in vitro* and *in vivo* [21]. Like SV40LT, the E6 oncoproteins of HPV type 16 and 18 are physically associated with wild-type p53 and favor its proteosomal degradation [reviewed in [31]]. An analysis of the transformed fibroblasts revealed that they contained E6 HPV16 or E6 HPV18 DNA. In addition, ISH showed that HPV DNA from the apoptotic

cancer cells was transferred into the nuclei of recipient fibroblasts. Once the DNA was transferred, the expression of HPV E6 genes was detected at the RNA level up to 15 weeks after the start of co-culture experiments. The E6-expressing recipient cells exhibited decreased levels of p53 as well as its target, p21, which might partly explain the alterations in growth control circuitry.

Virally altered fibroblasts that were able to form colonies demonstrated peculiar morphological characteristics, a high proliferation rate and aneuploidy. The transition from diploidy to aneuploidy, a hallmark observed in virtually all cancers [28], has been noted in early high-risk HPV-associated lesions of the cervix [32] and has been attributed to the synergistic effect of E6 and E7 oncoproteins [reviewed in [31]]. However, high-risk HPV immortalized cells are non-tumorigenic, and the activation of cellular oncogenes *c-myc*, *H-ras* and *c-fos* is necessary to completely overcome the anti-oncogenic function of p53 and to result in cervical cancer development [33,34,35]. Further study of the expression of these possibly activated cellular oncogenes will aid in understanding the mechanism of fibroblast transformation. Nonetheless, HPV oncogene transmission could have a role more crucial than considered, since the expression of HPV16 E6 oncogene in HPV negative C-33 A cells confers an aggressive phenotype as shown by the radiation resistance in transplanted tumors [36].

Escape from immune surveillance mechanisms may represent the main risk factor for HPV DNA persistence and lesion progression, whereas the viral transfer from apoptotic bodies to surrounding cells lacking receptors for HPV *in vivo* could facilitate the persistence of HPV in the cervix. Moreover, such transfer might explain the spread of HPV to mesenchymal cells, as observed by ISH in cervical carcinomas [37,38], and the possibility of a stromal reservoir for HPV. Furthermore, in human solid tumors, a subset of cancer cells, called cancer stem cells, that are likely initiated as a result of HGT cause very aggressive cancers with a high propensity toward metastatic dissemination [39]. This might explain the positive association between the rate of intratumoral apoptosis and several cervical tumor parameters such as tumor size, lesion

grade, metastatic phenotype and patient survival [7,40,41,42].

In addition, the increased prevalence of apoptotic cells following chemo- and/or radiation therapy could be partly responsible for the recurrence of HPV lesions by inducing the transformation of new cells at the same or different anatomic locations months or years after remission [43,44]. Investigations of this possibility are warranted, in addition to efforts to find new therapeutic strategies targeting E6/E7 oncogenes to limit their horizontal transfer and to control tumor development.

Materials and Methods

Cell culture and apoptosis induction

HPFs were isolated from adult human skin after abdominoplasty as previously described [45] and were grown in complete DMEM (Lonza) containing 10% FBS (Lonza), penicillin/streptomycin and L-glutamine. HPFs extracted from surgical residues are not subject to validation from an ethics committee and the patient's consent in accordance with the law L.1245-2 of the "Code de la santé publique" applied in France. Moreover, the laboratory of skin engineering of Prof. Philippe Humbert's dermatology department, providing human fibroblasts, has manuscript documents stating the patient's non-opposition to the use of his surgical residues to medical research in accordance with the law L.1211-2. Human cervical carcinoma cell lines (ATCC), HeLa (HPV18, wild-type p53) and C-33 A (HPV negative, mutated p53) were grown in complete EMEM (Lonza), and Ca Ski cells (HPV16, wild-type p53) were grown in complete RPMI (Lonza). They were monitored monthly and found to be free of mycoplasmas. Twelve hours prior to apoptosis induction, the carcinoma cells were seeded at 2×10^4 cells/cm². They were then treated with 20 mJ/cm² UVB irradiation followed by 300 nM staurosporine (STS) (Sigma Aldrich) for 48 h. The apoptotic cells were harvested after centrifugation of the supernatant at 300g for 10 min. The apoptosis detection was conducted as described in the supplemental information (Supporting Information). The apoptotic cells were incubated with HPFs at a ratio of 10:1. This ratio was chosen because a higher ratio causes

fibroblast death and a lower ratio decreases the rate of internalization.

Apoptotic cell internalization analysis

The apoptotic cells were stained with 1 µg/ml CFDA, SE (Invitrogen Ltd) diluted in DMEM with 2% FBS for 13 min at 37°C. After washing, they were incubated for 48 h with recipient cells. For cytometry analysis, the fibroblasts incubated with the apoptotic cells were harvested by trypsinization and analyzed using a Cell Lab Quanta™ SC flow cytometer (Beckman Coulter). For confocal microscopy, fibroblasts grown on coverslips were fixed with 3.7% paraformaldehyde for 20 min at 4°C and permeabilized using 0.1% triton X100 for 10 min at room temperature (RT). The cells were stained using TRITC (tetramethylrhodamine-isothiocyanate)-conjugated phalloidin (Sigma Aldrich) for 30 min at 4°C and with 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI; Invitrogen) for 5 min at RT. Another set of cells was incubated with two primary antibodies: a monoclonal mouse anti-human cytokeratin antibody (clone AE1/AE3, Dakocytomation) used at 1:50 and a monoclonal rabbit anti-human vimentin antibody (clone SP20; GeneTex) used at 1:100 dilution. Corresponding secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) coupled to cyanine 2 (CY™2-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG) or to rhodamine (Rhodamine (TRITC)-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG) were used at 1:50 dilution. The coverslips were finally examined by using an Olympus FluoView 1000 fluorescence microscope (Olympus).

Colony formation assay, cell growth and aneuploidy analysis

Soft agar assays were conducted in 24-well plates in semi-solid media (DMEM, 10% FBS, 0.35% agar; Invitrogen) with 8×10^3 and 3×10^5 cells/ml on a media base layer (RPMI, 10% FBS, 0.5% agar). The cells were grown for 21 days, and the colonies were observed using an Axiovert 25 inverted microscope (Zeiss) [27]. The colonies were then harvested by scraping the surface of the soft-agar and two cell lines of fibroblasts transformed by apoptotic HeLa (FH) and Ca Ski (FC) cells were derived and used for further experiments.

Primary fibroblast transformation was also tested by limit-dilution cultures in 6-well plates at 5×10^2 cells/well for 21 days. The colonies were then stained using a purple crystal solution (0.1% purple crystal (w/v), ethanol 5%) and photographed with a Nikon Coolpix 4500 digital camera (Nikon) [46].

The proliferation of the transformed cells was monitored by counting the total number of cells in each individual well daily for 10 days with a Cell Lab Quanta™ SC flow cytometer. The proliferation was also monitored using the MTT test with the Cell Proliferation Kit I (MTT) (Roche) for 5 consecutive days. The formation of purple formazan crystals was quantified using the scanning multi-well spectrofluorimeter EnVision® 2102 Multilabel Reader (Perkin Elmer). For the aneuploidy analysis, 10^6 living cells were collected and fixed overnight in 70% (v/v) cold ethanol. After two washes, the cells were stained with a propidium iodide solution (0.1 mg/ml propidium iodide, Sigma Aldrich; 20 µg/ml RNaseA DNase-free, ABgene). After 15 min at RT, 20,000 events were analyzed by an FC500 flow cytometer (Beckman Coulter). The mean fluorescence intensity (MFI) of the G0/G1 peak was evaluated using the CXP™ cytometer software and expressed in arbitrary units.

In situ hybridization

Cells were cultured overnight on poly-L-lysine microscope slides (Thermo Fisher Scientific), fixed with 3.7% paraformaldehyde for 15 min at RT and permeabilized with PBS Tween 1% for 10 min at RT. The high-risk HPV DNA detection was conducted using the INFORM® HPV family probe (Ventana Medical Systems) and the BenchMark® XT Automated Slide Stainer (Ventana Medical Systems) as described by the manufacturer. The cells were also counterstained with eosin.

PCR and RT-PCR analysis and immunoblotting

Total DNA was extracted from 10^6 cells using the QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). PCRs targeted the albumin, E6 HPV16 and E6 HPV18 genes, using 500 nM of the corresponding primers (Eurogentec, Seraing, Belgium). The sequences of the albumin and E6 HPV16 primers have been previously described

by Laurendeau *et al.* and Saunier *et al.*, respectively, while the sequences of the E6 HPV18 primers are patent pending [47,48]. After a hot-started reaction at 94°C for 5 min, the target DNAs were amplified for 30 cycles for 30 sec at 94°C, 30 sec at the annealing temperature (57°C for albumin, 51°C for E6 HPV16 and 55°C for E6 HPV18) and 20 sec at 72°C, followed by a 7-min extension at 72°C. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

Total RNA was extracted from 2 × 10⁶ cells using the QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen). After DNase I treatment (Invitrogen), the reverse transcription of 500 ng of RNA was performed using the MMLV-Reverse Transcriptase (Invitrogen). Twenty five nanograms of cDNA were pre-amplified using 45 nM E6 HPV16, E6 HPV18 and human β -2-microglobulin primers in the TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems) as follows: a 10-min step at 95°C and 10 amplification cycles (15 sec at 95°C, 4 min at 60°C). The quantification of the pre-amplified products was performed with a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) in the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), using 500 nM of each primer (Eurogentec) and TaqMan Probes (100 nM for β -2-microglobulin: 5'-FAM-cctcatgatgtctgcttaccatgtctcgatccc-BHQ1-3'; 250 nM for E6 HPV16: 5'-FAM-aggagcgaccagaaagttaccacagtt-BHQ1-3' or E6 HPV18: 5'-JOE-caacacggcgaccctacaagctacc-BHQ1-3', Eurogentec) according to the manufacturer's thermal cycling protocol. Standard curves were obtained by serial dilutions over a range of six log concentrations of the pBR322-HPV16 and pBR322-HPV18 diluted in 50 ng/ μ l salmon sperm DNA.

Immunoblotting was performed as described previously [49]. Briefly, 30 μ g of protein was separated by SDS-PAGE and electrotransferred onto Hybond™-P membranes (GE Healthcare Lifesciences). Mouse monoclonal antibodies against p53 (clone DO-7, Becton Dickinson), p21 (clone 6B6, Becton Dickinson) and β -actin (clone AC-15, Sigma Aldrich) were used at 1:500, 1:500 and 1:8000 dilutions, respectively. A secondary antibody coupled with alkaline phosphatase was used at 1:10000 for p53, 1:5000 for p21 and 1:40000 for β -actin. The immunoblots were analyzed by chemiluminescence using the ECL

Plus Reagents System (GE Healthcare Wauwatosa).

Acknowledgements

We thank Gwenael Rolin for providing human primary fibroblasts; Sylviane Coumes-Marquet for assistance with *in situ* hybridization, Fanny Angelot, Francis Bonnefoy and Virginie Mougey for technical advices. We thank E de Villiers (DKFZ, Germany) for kindly providing us with HPV 16 and HPV 18 plasmids.

Financial Disclosure

E. Gaiffe, E. Jacquin and M. Saunier fellowships and works were supported by funds from the "Region de Franche-Comté", "Institut National du Cancer" and "Ligue Contre le Cancer, Comité du Doubs".

Competing Interest

The authors have declared that no competing interests exist.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EG, JLP, SL, PO, CM.

Performed the experiments: EG, SL, EJ, MS.

Analyzed the data: EG, JLP, SL, EJ, MS, CM.

Wrote the paper: EG, JLP, SL, PO, CM.

Abbreviations

CFDA, SE, 5-(and 6)-carboxyfluoresceine diacetate succinimidyl ester; FH and FC, Fibroblasts transformed by apoptotic HeLa and Ca Ski; HGT, Horizontal gene transfer; HPE, Human primary fibroblasts; HPV, Human papillomavirus; ISH, In situ hybridization; MFI, Mean fluorescence intensity; MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; RT, Room temperature; STS, Staurosporine; SV40LT, SV40 Large T.

References

- zur Hausen H (1986) Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. *Lancet* 2: 489-491.
- Lowy DR, Kimbaurer R, Schiller JT (1994) Genital human papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2436-2440.
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, et al. (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314: 111-114.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75: 495-505.
- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-937.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.

7. Lowe SW, Lin AW (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21: 485-495.
8. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B (1995) The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J* 9: 1277-1287.
9. Hall SE, Savill JS, Henson PM, Haslett C (1994) Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J Immunol* 153: 3218-3227.
10. Dini L, Lentini A, Diez GD, Rocha M, Falasca L, et al. (1995) Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. *J Cell Sci* 108 (Pt 3): 967-973.
11. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299-304.
12. Koonin EV, Makarova KS, Aravind L (2001) Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu Rev Microbiol* 55: 709-742.
13. Keeling PJ, Palmer JD (2008) Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet* 9: 605-618.
14. Elsas JD, Bailey MJ (2002) The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol Ecol* 42: 187-197.
15. Loreto EL, Carareto CM, Capi P (2008) Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. *Heredity* 100: 545-554.
16. de la Taille A, Chen MW, Burchardt M, Chopin DK, Buttyan R (1999) Apoptotic conversion: evidence for exchange of genetic information between prostate cancer cells mediated by apoptosis. *Cancer Res* 59: 5461-5463.
17. Holmgren L, Szeles A, Rajnavolgyi E, Folkman J, Klein G, et al. (1999) Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 93: 3956-3963.
18. Spetz AL, Patterson BK, Lore K, Andersson J, Holmgren L (1999) Functional gene transfer of HIV DNA by an HIV receptor-independent mechanism. *J Immunol* 163: 736-742.
19. Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, et al. (2001) Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6407-6411.
20. Bergsmedh A, Szeles A, Spetz AL, Holmgren L (2002) Loss of the p21(Cip1/Waf1) cyclin kinase inhibitor results in propagation of horizontally transferred DNA. *Cancer Res* 62: 575-579.
21. Ehnfors J, Kost-Alimova M, Persson NL, Bergsmedh A, Castro J, et al. (2009) Horizontal transfer of tumor DNA to endothelial cells in vivo. *Cell Death Differ* 16: 749-757.
22. Levine AJ (2009) The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology* 384: 285-293.
23. Bernard B, Fest T, Pretet JL, Mougin C (2001) Staurosporine-induced apoptosis of HPV positive and negative human cervical cancer cells from different points in the cell cycle. *Cell Death Differ* 8: 234-244.
24. Simbulan-Rosenthal CM, Velena A, Veldman T, Schlegel R, Rosenthal DS (2002) HPV-16 E6/7 immortalization sensitizes human keratinocytes to ultraviolet B by altering the pathway from caspase-8 to caspase-9-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 277: 24709-24716.
25. Hoppe AD, Swanson JA (2004) Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis. *Mol Biol Cell* 15: 3509-3519.
26. Swanson JA (2008) Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 639-649.
27. Colburn NH, Bruegge WF, Bates JR, Gray RH, Rossen JD, et al. (1978) Correlation of anchorage-independent growth with tumorigenicity of chemically transformed mouse epidermal cells. *Cancer Res* 38: 624-634.
28. Rajagopalan H, Lengauer C (2004) Aneuploidy and cancer. *Nature* 432: 338-341.
29. Yan B, Wang H, Li F, Li CY (2006) Regulation of mammalian horizontal gene transfer by apoptotic DNA fragmentation. *Br J Cancer* 95: 1696-1700.
30. Bergsmedh A, Ehnfors J, Kawane K, Motoyama N, Nagata S, et al. (2006) DNase II and the Chk2 DNA damage pathway form a genetic barrier blocking replication of horizontally transferred DNA. *Mol Cancer Res* 4: 187-195.
31. zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2: 342-350.
32. Winkler B, Crum CP, Fujii T, Ferenczy A, Boon M, et al. (1984) Koilocytotic lesions of the cervix. The relationship of mitotic abnormalities to the presence of papillomavirus antigens and nuclear DNA content. *Cancer* 53: 1081-1087.
33. DiPaolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V, Doniger J (1989) Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. *Oncogene* 4: 395-399.
34. Slagle BL, Kaufman RH, Reeves WC, Icenogle JP (1998) Expression of ras, c-myc, and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 83: 1401-1408.
35. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M (2004) Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 64: 3878-3884.
36. Hampson L, El Hady ES, Moore JV, Kitchener H, Hampson IN (2001) The HPV16 E6 and E7 proteins and the radiation resistance of cervical carcinoma. *Faseb J* 15: 1445-1447.
37. Unger ER, Vernon SD, Hewan-Lowe KO, Lee DR, Thoms WW, et al. (1999) An unusual cervical carcinoma showing exception to epitheliotropism of human papillomavirus. *Hum Pathol* 30: 483-485.
38. Grayson W, Taylor LF, Cooper K (1997) Adenoid basal carcinoma of the uterine cervix: detection of integrated human papillomavirus in a rare tumor of putative "reserve cell" origin. *Int J Gynecol Pathol* 16: 307-312.
39. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111.
40. Levine EL, Renehan A, Gossiel R, Davidson SE, Roberts SA, et al. (1995) Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother Oncol* 37: 1-9.
41. Isacson C, Kessis TD, Hedrick L, Cho KR (1996) Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type. *Cancer Res* 56: 669-674.
42. Tsang RW, Fyles AW, Li Y, Rajaraman MM, Chapman W, et al. (1999) Tumor proliferation and apoptosis in human uterine cervix carcinoma I: correlations between variables. *Radiother Oncol* 50: 85-92.
43. Sommers GM, Grigsby PW, Perez CA, Camel HM, Kao MS, et al. (1989) Outcome of recurrent cervical carcinoma

- following definitive irradiation. *Gynecol Oncol* 35: 150-155.
44. Elit L, Fyles AW, Devries MC, Oliver TK, Fung-Kee-Fung M (2009) Follow-up for women after treatment for cervical cancer: a systematic review. *Gynecol Oncol* 114: 528-535.
45. Hayflick L, Jacobs P, Perkins F (1964) A Procedure for the Standardization of Tissue Culture Media. *Nature* 204: 146-147.
46. Plumb JA (2004) Cell sensitivity assays: clonogenic assay. *Methods Mol Med* 88: 159-164.
47. Laurendeau I, Bahuaud M, Vodovar N, Larramendy C, Olivi M, et al. (1999) TaqMan PCR-based gene dosage assay for predictive testing in individuals from a cancer family with INK4 locus haploinsufficiency. *Clin Chem* 45: 982-986.
48. Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, et al. (2008) Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol* 46: 3678-3685.
49. Charlot JF, Nicolier M, Pretet JL, Mougin C (2006) Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin-alpha on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis* 11: 813-827.

Supporting information

Supplemental methods

Apoptosis analysis. For phosphatidylserin exposure analysis, apoptotic cell suspension was analysed with annexin V-FITC apoptosis detection kit I (Becton Dickinson) according to the manufacturer's instructions. Twenty thousand events were collected for each sample and analysed by cytomics FC500 flow cytometer (Beckman Coulter) with CXPTM cytometer software.

For nuclear fragmentation observation by microscopy, apoptotic cells in the media were retained and pooled with remaining adherent cells that were harvested by trypsinization. They were washed twice with PBS, centrifuged at 300g for 10 min, resuspended and fixed by 3.7% formaldehyde for 20 minutes at 4°C. Fixed cells were stained with 300 nM DAPI for 5 min at RT, washed twice with PBS, centrifuged at 300g for 10 min and resuspended in fluorescent mounting media (Dakocytomation). One drop of suspension was applied to a poly-L-lysine microscope slide (Thermo Fisher scientific), cover with a coverslip and observed with Olympus FluoView 1000 fluorescent microscope (Olympus).

Proliferation test. In order to determine whether living cells were present in suspension of apoptotic cells, those suspensions were cultured in complete medium during 28 days and then assayed with the Cell Proliferation Kit I (MTT test, Roche) according to the manufacturer's instruction.

Supplemental results

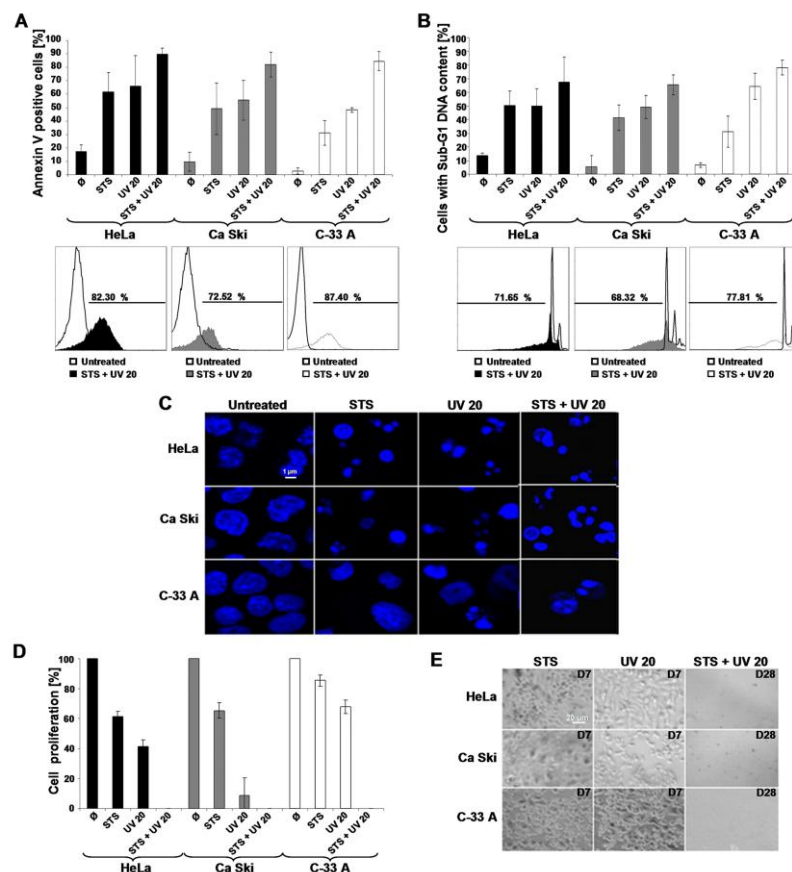


Figure S1. UVB and staurosporine treatments of HeLa, Ca Ski and C-33 A cells induce the formation of apoptotic body suspensions devoid of living cells. HeLa, Ca Ski and C-33 A cells were treated with UVB irradiation at 20 mJ/cm² (UV 20) and/or 300 nM staurosporine (STS) for 48 h. The cells and apoptotic body suspension were harvested and characterized. Ai, Phosphatidylserine exposure was evaluated by flow cytometry after annexin V-FITC labeling. Aii, The DNA content was quantified using propidium iodide staining. (A) Cumulative data of four independent experiments (upper panel) and representative data of flow cytometry analysis (lower panel). (B) Nuclear fragmentation was observed by fluorescent microscopy after DAPI staining. The proliferation of the cells and apoptotic body suspensions was verified by MTT (C) and by culture from 7 to 28 days (D). For each panel, four independent experiments were performed yielding similar results.

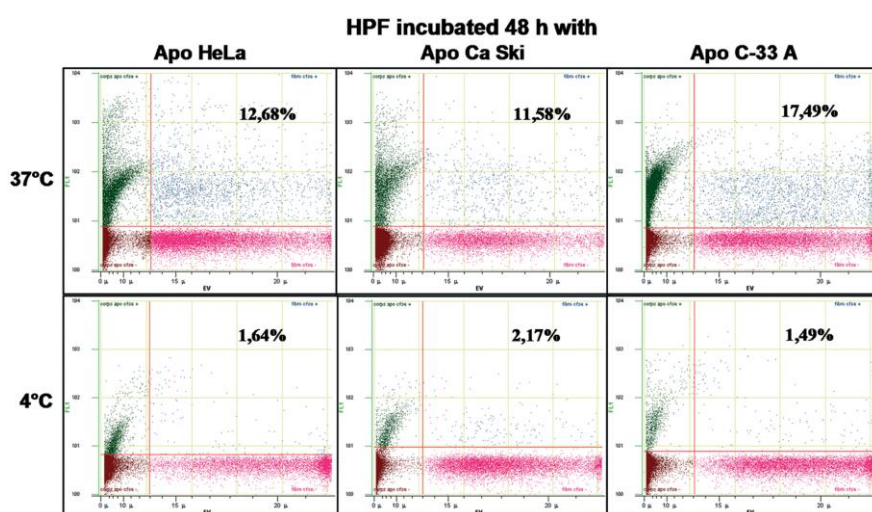
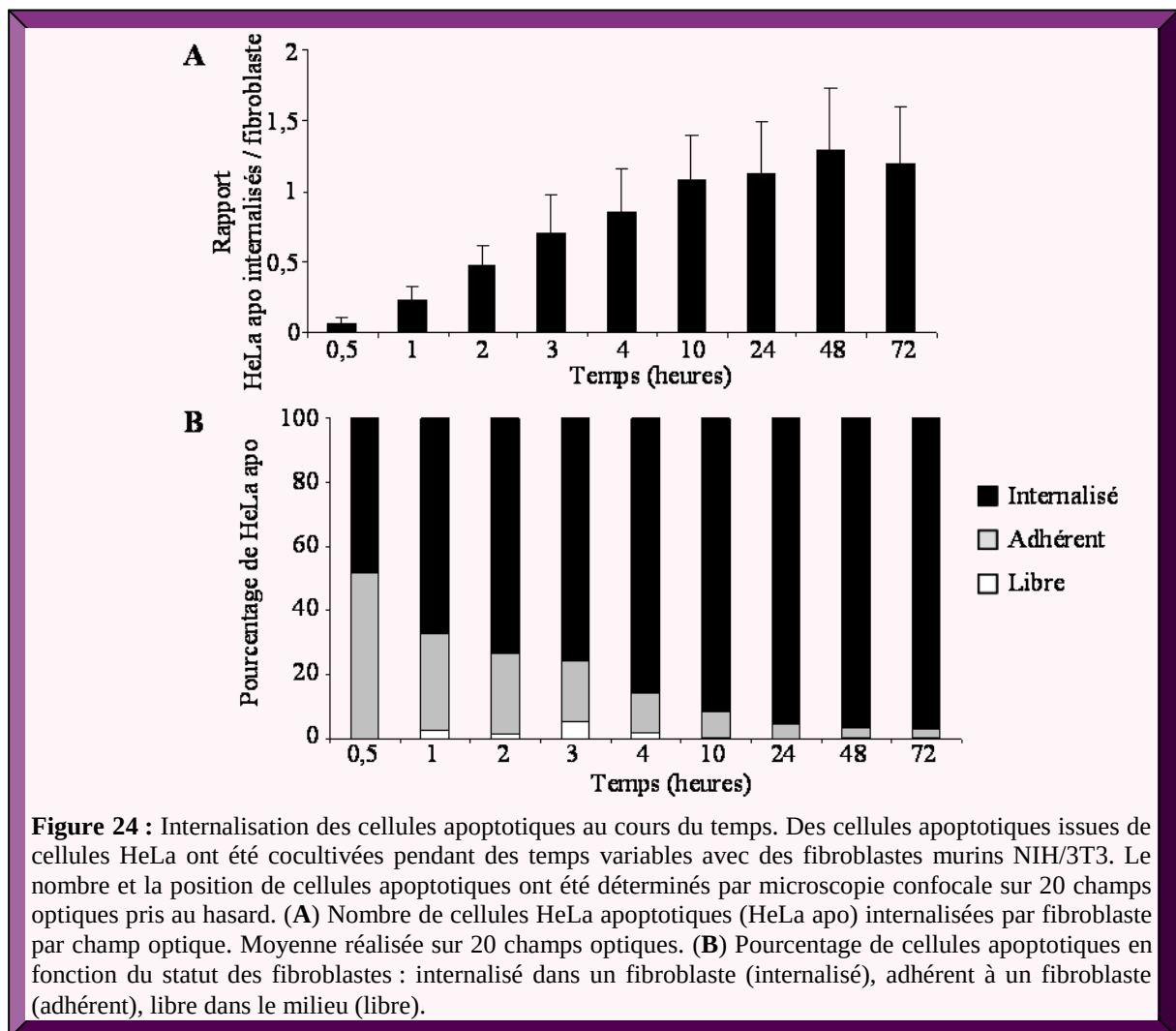


Figure S2. Apoptotic cell engulfment involves an energy-dependent pathway. HPFs were incubated with apoptotic HeLa (Apo HeLa), Ca Ski (Apo Ca Ski) or C-33 A (Apo C-33 A) cells for 48 h at 37°C and 4°C. Apoptotic cells were labeled with CFDA, SE, prior to incubation. HPFs were distinguished from apoptotic cells by their diameter as evaluated by cytometry (> or < 13 µm). Events with small diameters and positive for CFDA, SE, were considered apoptotic cells (upper left quadrant), events with large diameters and negative for CFDA, SE, were HPFs (bottom right quadrant), and events with large diameters and positive for CFDA, SE, were HPFs with engulfed apoptotic cells (upper right quadrant). The results are representative of three independent experiments.

Résultats supplémentaires non publiés

I/ Mise au point du modèle de coculture

Plusieurs temps et rapports de coculture sont proposés dans la littérature. Nous avons déterminé quels étaient les paramètres optimaux applicables à notre modèle. Les cocultures entre des cellules apoptotiques HeLa et des fibroblastes primaires humains ou la lignée fibroblastique murine, NIH/3T3, ont permis de mettre au point notre modèle impliquant des cellules apoptotiques dérivées de cancer du col de l'utérus.

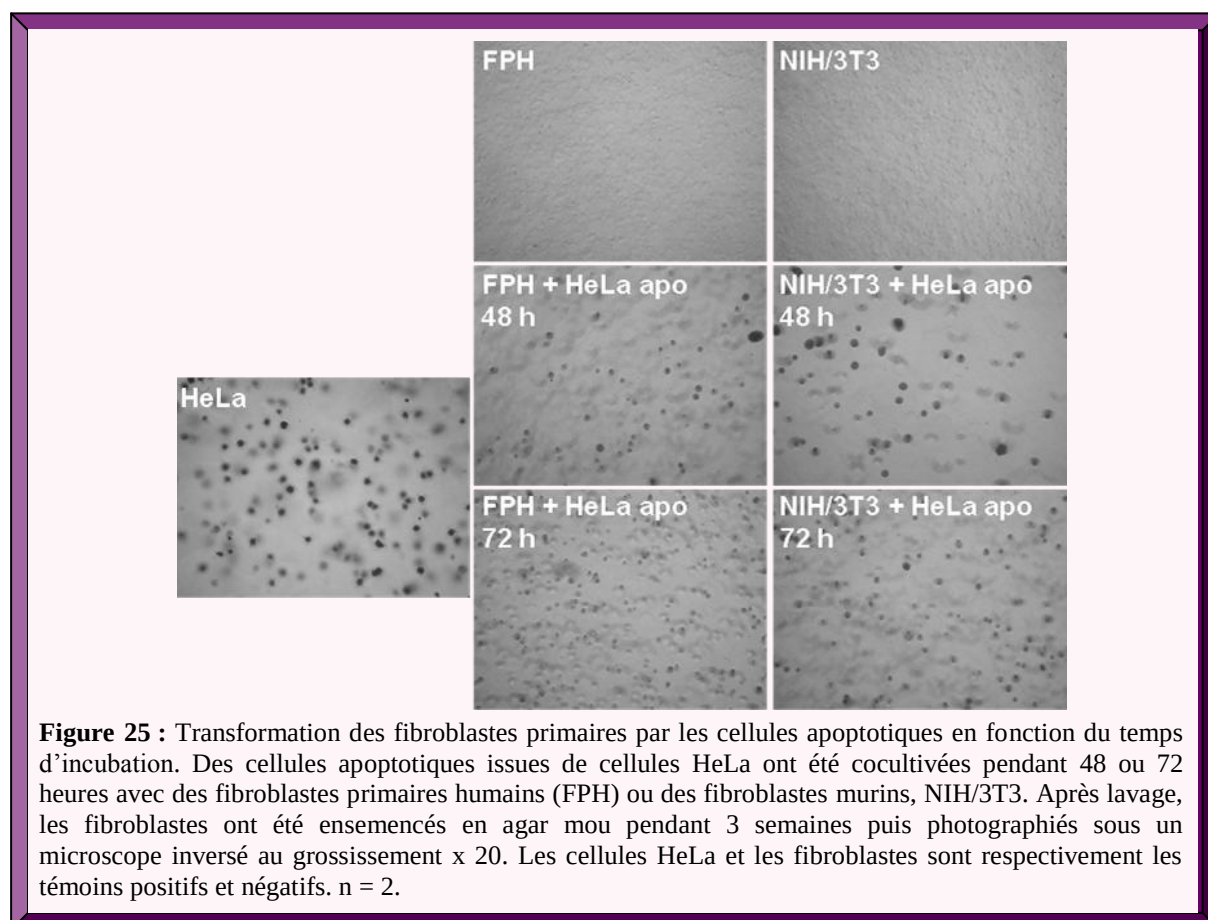


Holmgren et coll. ont démontré que les cellules apoptotiques sont internalisées dès une heure d'incubation. Cependant, la durée de coculture utilisée dans leurs travaux est de 48 heures et peut s'étendre jusqu'à 1 à 2 semaines selon la publication. Afin de déterminer un

temps d'incubation optimal dans notre modèle, une cinétique a été réalisée avec analyse aux temps 30 minutes, 1, 2, 3, 4, 10, 24, 48 et 72 heures. Les cultures ont été visualisées au microscope confocal après marquage fluorescent des cellules apoptotiques (CFDA, SE), des fibroblastes (Phalloïdine-TRITC) et de l'ADN (DAPI), comme présenté dans la publication n°1. Le nombre et la position des cellules apoptotiques (libres, adhérentes ou internalisées) ont été déterminés sur 20 champs optiques pris au hasard (figure 24).

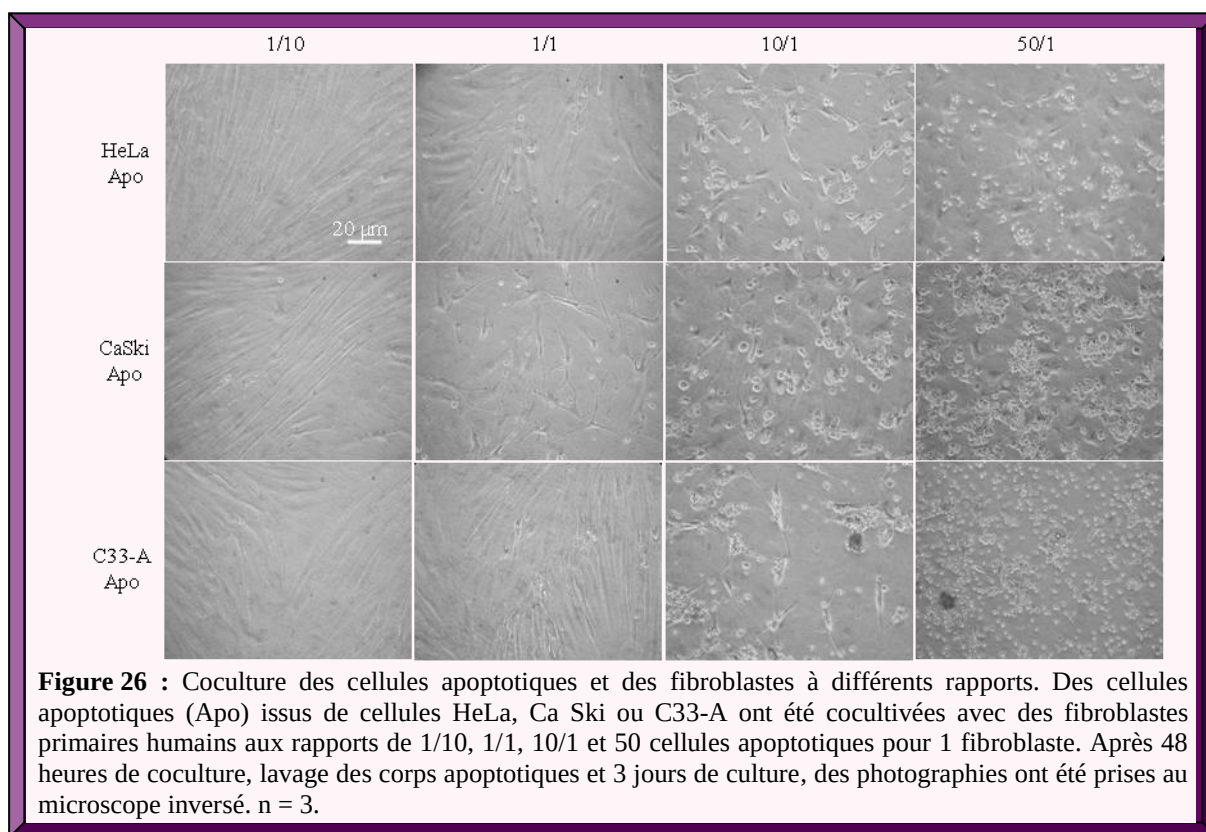
Le nombre de cellules apoptotiques internalisées augmente au cours du temps pour être maximal après 48 heures de coculture. De plus, le pourcentage de cellules apoptotiques adhérentes diminue pour atteindre un plateau après 48 heures, ce qui laisse supposer que le phénomène d'internalisation des cellules apoptotiques se déroule essentiellement avant 48 heures de coculture.

Bien que 48 heures d'incubation permettent d'observer un maximum d'internalisation, il n'est pas sûr que ce temps soit suffisant pour aboutir à la transformation des cellules primaires. Afin de vérifier cela, des fibroblastes primaires humains ont été cultivés 48 et 72 heures avec des cellules apoptotiques HeLa avant d'être ensemencés en agar mou (soft-agar) comme décrit dans la publication n°1. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante (figure 25).



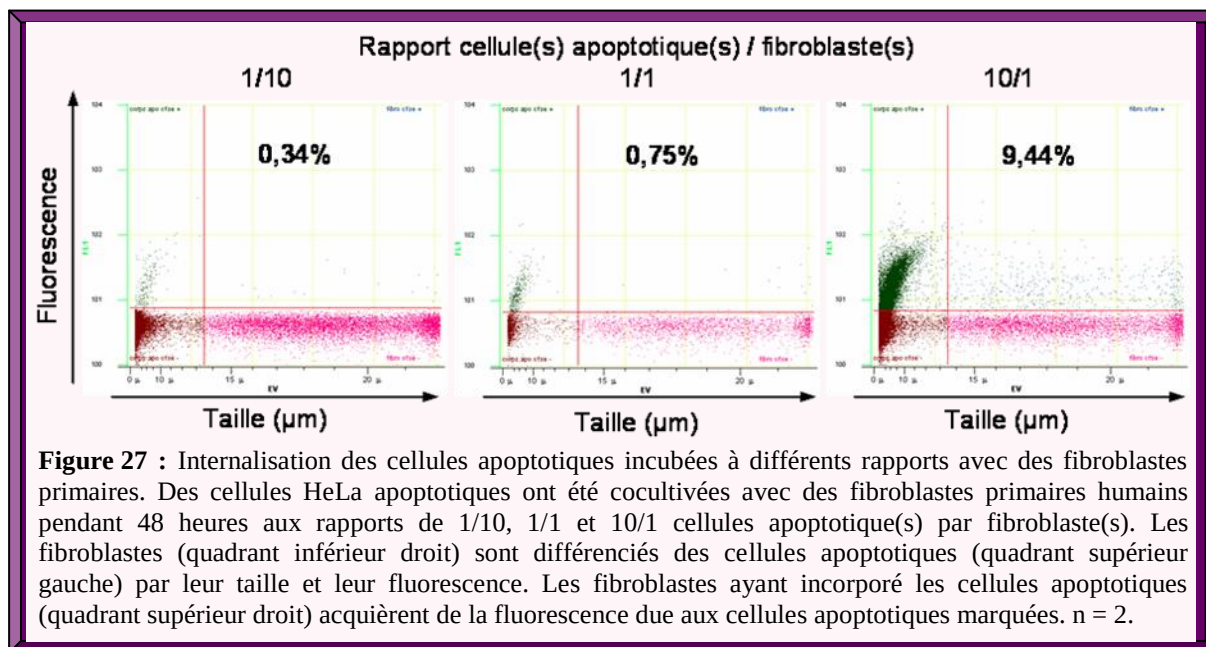
Les fibroblastes (humains et murins) cultivés avec des cellules apoptotiques forment des clones, témoins de la transformation cellulaire, au même titre que les cellules cancéreuses HeLa et à l'inverse des fibroblastes non transformés (humains et murins). Les clones sont présents quel que soit le temps d'incubation confirmant que 48 heures de coculture sont suffisantes pour permettre la transformation des cellules primaires. Nous avons donc conservé ce temps d'incubation.

Nous avons ensuite déterminé le rapport entre les cellules apoptotiques et les fibroblastes le plus adapté à nos expériences. Puisque les différents ratio cellules apoptotiques/cellules receveuses utilisés dans la littérature sont de 1 cellule apoptotique pour 5 cellules receveuses à 10 cellules apoptotiques pour 1 cellule receveuse, nous avons testé les rapports 1/10, 1/1, 10/1 et 50 cellules apoptotiques par fibroblaste primaire humain. Après 48 heures de coculture, les fibroblastes ont été lavés et observés en microscopie inversée quotidiennement pendant 7 jours. Les photographies de la figure 26 ont été prises trois jours après la coculture.



La culture des fibroblastes avec une forte dose de cellules apoptotiques provoque la mort de la majorité des fibroblastes. Nous avons exclu le rapport 50 cellules apoptotiques par fibroblaste.

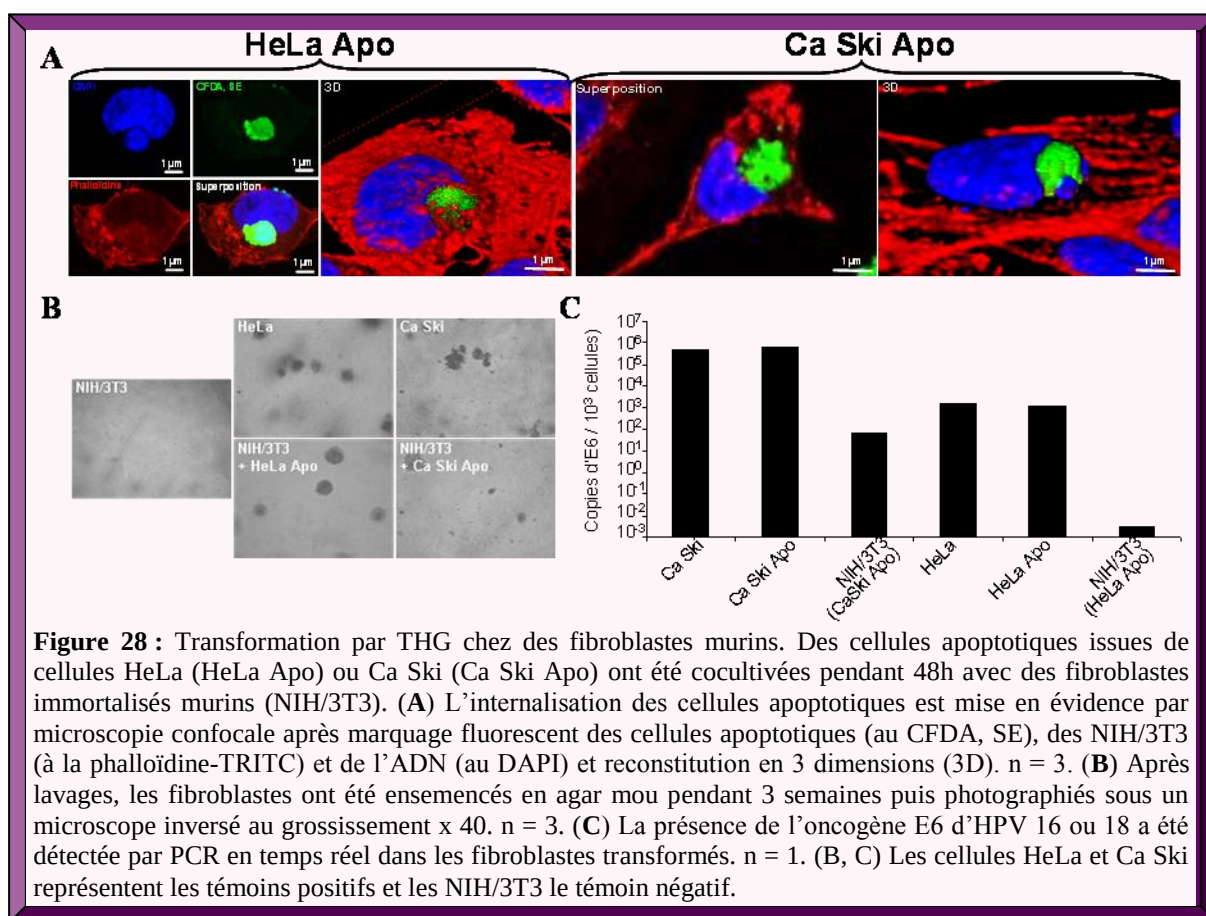
L'internalisation des cellules apoptotiques aux 3 rapports n'induisant pas la mort des fibroblastes receveurs, soit 1/10, 1/1 et 10 cellules apoptotiques par fibroblaste, a été mesurée par cytométrie de flux (fibroblastes ayant internalisé une ou plusieurs cellules apoptotiques marquée au CFDA, SE) comme décrit dans la publication n°1 (figure 27).



Un rapport trop faible de cellules apoptotiques diminue le pourcentage d'internalisation qui n'est alors plus visible par cytométrie de flux. Par conséquent, le rapport utilisé pour les expériences a été de 10 cellules apoptotiques par fibroblaste, qui est la dose la plus forte non létale pour les fibroblastes.

II/ Transformation des fibroblastes murins par transfert d'oncogènes d'HPV

Les expériences d'internalisation, de transformation et de transfert menées dans la publication n°1 sur des fibroblastes primaires humains ont été réalisées en parallèle sur une lignée de fibroblastes immortalisés murins, la lignée NIH/3T3. Nous avons vérifié l'internalisation des cellules apoptotiques abritant des HPV par microscopie confocale, la transformation des fibroblastes par ensemencement en agar mou et le transfert par PCR en temps réel ciblant l'oncogène E6 d'HPV16 et 18 dans les cellules transformées.



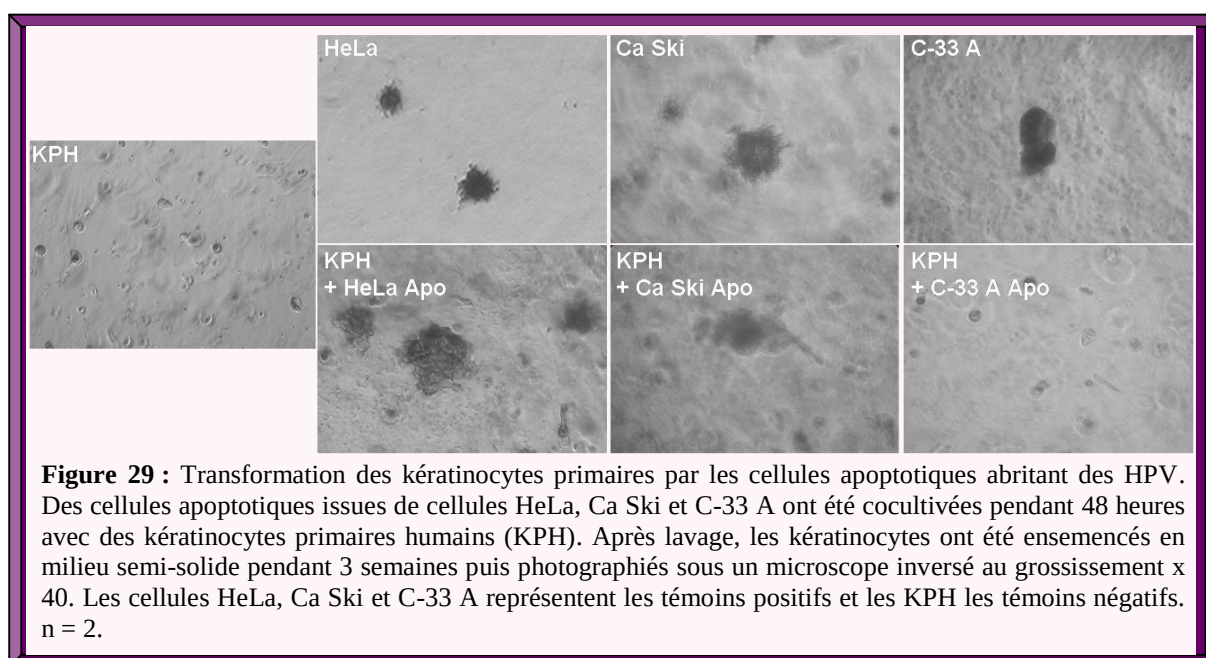
Les images de microscopie confocale montrent que les cellules apoptotiques issues des lignées HeLa et Ca Ski sont internalisées par les NIH/3T3 (figure 28 A). La formation de clones en agar mou illustre leur transformation par les cellules apoptotiques issues de la lignée HeLa et Ca Ski (figure 28 B). Les oncogènes E6 présents dans les cellules HeLa et Ca Ski avant et après induction d'apoptose sont retrouvés dans les NIH/3T3 transformés démontrant leur transfert (figure 28 C). Cependant, bien que la présence de E6 d'HPV 16 et 18 a été constatée, les expériences de PCR ciblant les oncogènes E6 dans les NIH/3T3 n'ont été réalisées qu'une seule fois. Nous ne pouvons donc pas conclure sur le nombre de copies d'E6 présent dans les fibroblastes transformés.

Les cellules apoptotiques dérivées de cancer du col de l'utérus, abritant des séquences d'HPV sont capables de transformer des fibroblastes murins, **passant ainsi les barrières d'espèces.**

III/ Transformation des kératinocytes primaires humains

Les travaux présentés dans le premier article ont démontré que la transformation par THG des fibroblastes induit une instabilité génomique aboutissant à l'acquisition d'un phénotype aneuploïde. Ce phénomène participerait à la progression tumorale au sein des tumeurs. Cependant, dans le cas du cancer du col de l'utérus, les cellules naturellement infectées et transformées par les HPV sont des kératinocytes et non des fibroblastes. C'est pourquoi nous avons vérifié si des kératinocytes primaires pouvaient être transformés par ce même processus.

Les kératinocytes primaires utilisés dans ces expériences ont été isolés par Gwenaél Rolin du laboratoire de dermatologie du Pr. Philippe Humbert, à partir de peau humaine après abdominoplastie et cultivés en milieu spécialisé pour les kératinocytes (Keratinocyte Basal Medium 2, PromoCell) complémenté (Keratinocyte Growth Medium 2 SupplementPack, PromoCell). Les cellules apoptotiques HeLa, Ca Ski et C-33 A ont été cultivées avec des kératinocytes primaires pendant 48 heures à un rapport de 10/1. Les kératinocytes ont été lavés, cultivés en agar mou pendant 3 semaines dans les mêmes conditions que précédemment et photographiés sous microscope inversé.

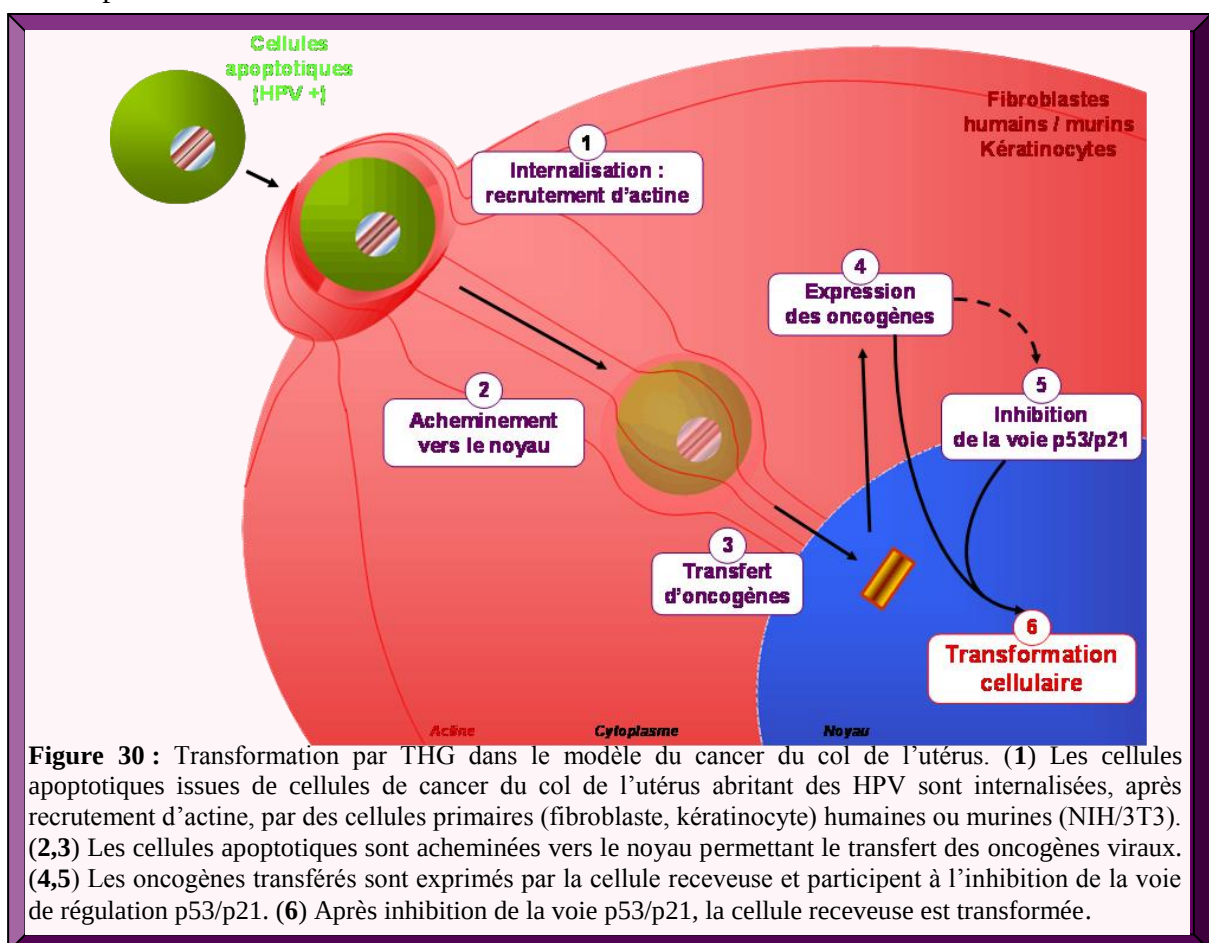


L'incubation des kératinocytes primaires avec des cellules apoptotiques dérivées de cancer du col de l'utérus et infectées par HPV (HeLa ou Ca Ski) entraîne la formation de clones caractéristiques de leur transformation contrairement aux kératinocytes primaires seuls. De plus, comme lors des expériences réalisées sur les fibroblastes primaires humains, les

cellules apoptotiques C-33 (HPV-) ne sont pas capables de transformer les kératinocytes primaires suggérant un mécanisme de transformation similaire dépendant de la présence d'HPV.

Conclusion de la publication n°1

Les travaux présentés dans cette première publication démontrent que des cellules apoptotiques dérivées de cancer du col de l'utérus peuvent servir de vecteurs d'oncogènes viraux et induire la transformation des cellules hôtes, mettant ainsi en évidence un mécanisme alternatif de transformation cellulaire associée aux HPV (figure 30). Notre modèle confirme les travaux de Bergsmedh et coll. sur la transformation par THG et prouve que ce transfert est possible à partir de cellules humaines naturellement transformées. La transformation par transfert d'oncogènes est inhibée par la voie p53/p21. Donc seules des cellules délétées pour le gène codant p53 peuvent être transformées sauf dans le cas où un inhibiteur de p53 est aussi transféré et induit ainsi sa dégradation. Nos fibroblastes receveurs transformés n'expriment plus les protéines p53 et p21 montrant une inhibition du mécanisme de protection. Les oncogènes E6 des HPV 16 et 18 exprimés par les fibroblastes transformés sont des acteurs possibles de cette inhibition.



De plus, la transformation par THG contourne les barrières liées aux espèces puisque des cellules murines, les cellules NIH/3T3 sont transformées par des cellules apoptotiques humaines.

Le transfert horizontal des gènes d'HPV pourrait expliquer la présence d'HPV retrouvé dans les cellules stromales environnant la tumeur dépourvues des récepteurs nécessaires à l'infection par HPV [Unger 1999a]. Ce réservoir stromal participerait à la persistance du virus et ainsi à la progression des lésions. Les cellules apoptotiques de cancer du col de l'utérus étant aussi capables de transformer des kératinocytes sains, il est tout à fait concevable que le THG participe à la progression tumorale, ce qui pourrait en partie expliquer l'association positive entre le taux d'apoptose intratumorale et certains paramètres tels que la taille de la tumeur ou le grade de la lésion. L'utilisation de chimio/radiothérapies induisant l'apoptose des cellules tumorales, dans certains cas, pourrait induire un THG. Il serait alors intéressant de combiner un traitement empêchant le THG pour limiter les risques de récives après traitements.

Le THG résulte de l'internalisation de cellules apoptotiques. Cette internalisation permet aussi aux cellules du système immunitaire d'éliminer les cellules mortes. Il est donc nécessaire de caractériser le mécanisme d'internalisation des cellules apoptotiques aboutissant au THG pour le différencier de la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules spécialisées.

Publications n°2 et n°3 : Collaboration Femto-ST

N°2 : Pseudo-periodic encryption of extended 2D surfaces for high accurate recovery of any random zone by vision

Galeano-Zea JA, Sandoz P, Gaiffe E, Prétet JL, Mougin C.

Int J Optomechatronics 2010, 4: 65-82

N°3 : Position-referenced microscopy for live cell culture monitoring

J. Galeano-Zea, P. Sandoz, E. Gaiffe, S. Launay, L. Robert, M. Jacquot, F. Hirchaud, J.L. Prétet, C. Mougin.

Biomedical Optics Express 2011, 2: 1307-18

Ces travaux ont été présentés sous forme orale à :

- **Séminaire Sciences et Techniques du Vivant, Besançon – France. 7 Avril 2009.**

E. Gaiffe, J. Galeano, S. Launay, M. Saunier, P. Sandoz, J.L. Prétet, C. Mougin. Suivi du transfert horizontal d'oncogènes viraux par les corps apoptotiques : Utilisation d'un système référencé en position.

- **OPTDIAG2009, Paris – France. 13 – 14 May 2009.**

J. Galeano, P. Sandoz, E. Gaiffe, J.L. Prétet, C. Mougin. Microscopie référencée en position : suivi site à site de l'évolution des cultures cellulaires avec une précision subpixel.

- **Invie 5, Mulhouse - France. 9-10 juin 2009.**

J. Galeano, P. Sandoz, E. Gaiffe, J.L. Prétet, C. Mougin. Microscopie référencée en position : une alternative à la vidéo-microscopie.

- **European Conferences on Biomedical Optics, OSA – SPIE, Munich – Allemagne. 14 – 18 Juin 2009.**

J. Galeano, P. Sandoz, E. Gaiffe, J.L. Prétet, C. Mougin. Position-referenced microscopy: regions of interest localization and subpixel image comparison by means of pseudo-random patterns embedded in cell culture boxes.

- **1ère journée du GIS « IMIS », Besançon – France. 3 Juin 2010.**

J. Galeano, E. Gaiffe, J.L. Prétet, C. Mougin, P. Sandoz. Utilisation d'un système référencé en position pour suivre le transfert horizontal d'oncogènes viraux par les corps apoptotiques.

- **4ème Forum du CGE, Strasbourg – France. 4-5 Novembre 2010.**

J. Galeano Zea, E. Gaiffe, P. Sandoz, J.L. Prétet, S. Launay, C. Mougin. Microscopie référencée en position : Application au suivi du transfert horizontal d'oncogènes viraux.

Ces travaux ont été présentés sous forme de poster à :

- **LEA (European Associated Laboratory in Microtechnic) Workshop, Arc-et-Senans – France. 8 – 9 September 2008.**

J. Galeano, P. Sandoz, E. Gaiffe, J.L. Prétet, C. Mougin. "Cell Culture Boxes with microstructures for subpixel reposition of zones with optical microscope".

Introduction des publications n°2 et n°3

Nos premiers travaux ont mis en exergue la transformation cellulaire consécutive à l'internalisation des cellules apoptotiques dérivées de cancer du col de l'utérus. *In vivo*, une partie des traitements anti-tumoraux vise à induire l'apoptose des cellules tumorales qui sont alors détruites puis éliminées par les cellules phagocytaires spécialisées. Cependant, une fraction des cellules apoptotiques pourrait induire un transfert de gènes et participer aux récédives après traitement. Afin de limiter le phénomène de transformation par THG, il est nécessaire de savoir comment l'internalisation d'une cellule apoptotique aboutit dans un cas à sa dégradation et dans d'autres cas à un transfert de gène. L'observation de cocultures fixées à différents temps d'incubations nous a permis d'assembler des données, comme le recrutement d'actine ou la formation d'expansions membranaires. En cytométrie, nous avons pu aussi déterminer que les cellules apoptotiques étaient internalisées dès 30 minutes et ce jusqu'à 8 à 12 heures. Cependant en observant des événements sur différentes cocultures nous ne pouvons pas conclure parfaitement sur le devenir de la cellule apoptotique, de sa prise en charge jusqu'au transfert de gènes. Pour obtenir plus d'informations, il faudrait suivre une même cellule apoptotique au cours du temps.

Le moyen le plus utilisé pour réaliser ces expériences est d'utiliser la vidéomicroscopie en chambre thermostatée, qui nécessite la monopolisation d'un appareil volumineux, non disponible durant toute la durée de l'expérience. La microscopie classique peut être aussi utilisée grâce au repositionnement à l'aide d'une platine motorisée. Cependant dans ce cas le référentiel étant la platine, lors du repositionnement du support de culture sur la platine, des erreurs de plusieurs micromètres peuvent fausser les observations à l'échelle cellulaire ou subcellulaire. Nous avons choisi d'utiliser le système référencé en position de l'équipe de Patrick Sandoz, du département d'optique de l'Institut FEMTO-ST (LOPMD : équipe « Nanométrie et Microsystèmes pour les Sciences du Vivant ») [Sandoz 2002, Sandoz 2005, Sandoz 2007]. Ce système qui n'avait été utilisé que pour observer des coupes de tissus nécessitait une mise au point pour son utilisation avec des cultures biologiques.

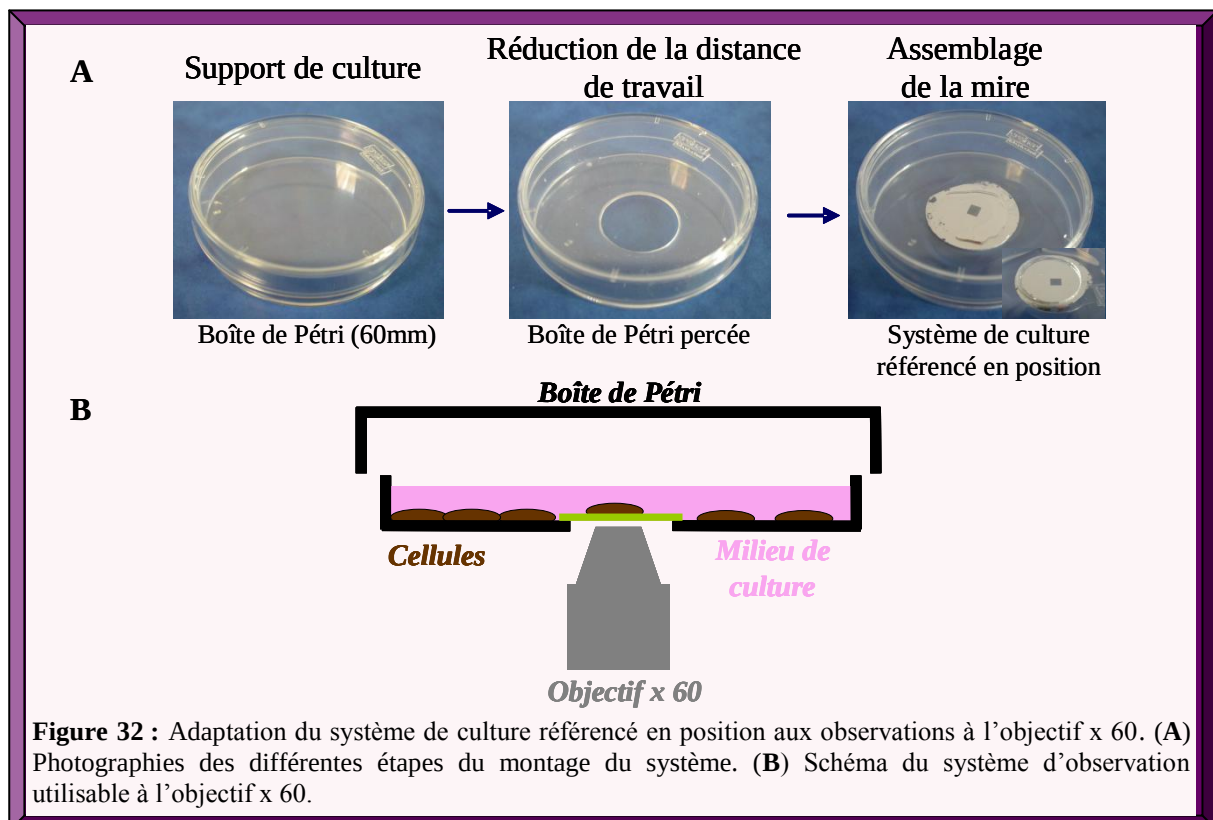
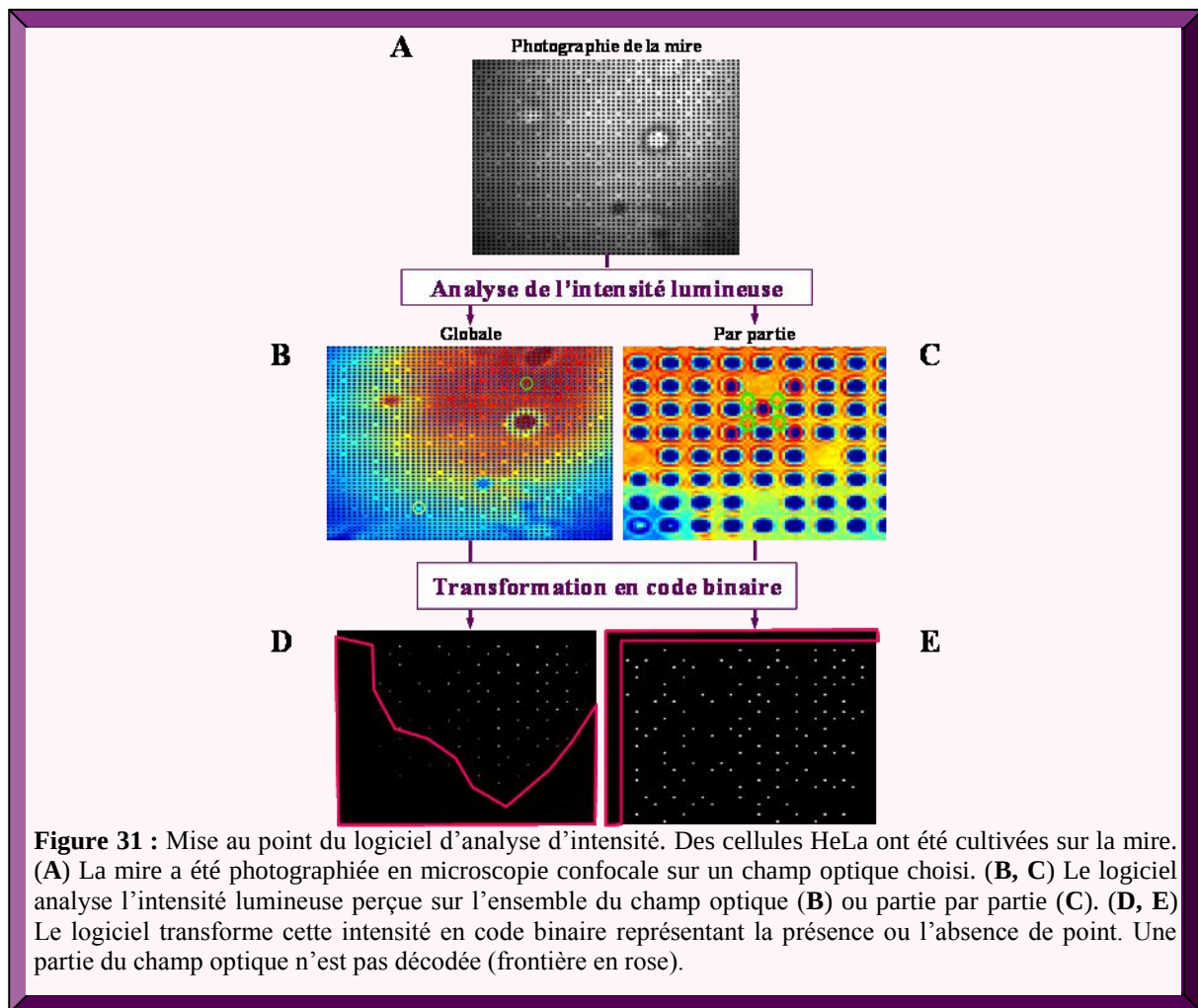
Cette mise au point a été réalisée en collaboration avec July Galeano-Zea doctorante de l'équipe de Patrick Sandoz, dans le cadre de son doctorat et a aboutit à la publication des deux articles suivants.

Mise au point et utilisations de la mire

I/ Utilisation de la mire pour l'observation d'une préparation biologique

Le logiciel de décodage de la mire analyse l'intensité lumineuse afin de déterminer la présence ou l'absence de points. Lors de nos premiers essais d'observation d'une culture cellulaire, le logiciel d'analyse ne parvenait pas à décrypter le code binaire à partir de l'intensité lumineuse détectée. En effet, durant la conception de la mire, le logiciel était testé en observant la mire directement sur une lame de microscope. Lors de nos essais, l'utilisation de milieu de culture et de cellules vivantes ont induit des variations importantes de la luminosité (figure 31A). Certaines zones étaient trop sombres pour permettre une détection alors qu'à l'inverse d'autres zones étaient trop lumineuses pour être analysées. L'équipe de P. Sandoz a dû modifier le logiciel mis au point pour décoder la mire. Le décodage d'ensemble (Figure 31B), c'est-à-dire sur le champ optique entier, a été remplacé pour un décodage localisé, c'est-à-dire en se focalisant sur des groupes de 9 points voisins et en comparant leurs intensités lumineuses (Figure 31C). Avec l'ancien système de reconnaissance du code une large proportion de la mire ne pouvait pas être décodée (Figure 31D) et donc la position non détectée. Avec le nouveau système de décodage localisé seule la première ligne et la première colonne ne sont pas détectées, du fait de la comparaison entre lignes et colonnes successives (Figure 31E), ce qui n'empêche pas la localisation.

Lors de ces observations un deuxième problème lié à l'observation au grossissement x60 est survenu. Afin de suivre une culture cellulaire, la lamelle sur laquelle est gravée la mire est recouverte de PDMS (PolyDiMethylSiloxane), un polymère biocompatible permettant l'adhérence cellulaire, et collée à l'aide de vernis transparent stérile au fond d'une boîte de Pétri. Les cellules sont ensuiteensemencées sur cette boîte. Mais compte tenu de l'épaisseur des boîtes de culture et de la mire, la distance entre la préparation biologique et l'objectif est supérieure à la distance focale de l'objectif x60, donc trop importante pour obtenir une image de la culture. Pour remédier à cela, nous avons dû adapter nos supports de culture à l'utilisation de la mire. Nous avons percé des boîtes de cultures classiques afin d'y adapter les lamelles de codage (Figure 32A) et réduire la distance entre l'objectif et la préparation à observer (figure 32B). Les mires ont été fixées à la boîte de culture dans un premier temps à l'aide de vernis et dans un deuxième temps directement par du PDMS.



Nous avons aussi mis au point des marquages fluorescents permettant de suivre l'internalisation des corps apoptotiques. Les cellules apoptotiques ont été marquées au CFDA, SE, un marqueur non spécifique qui se lie aux groupements amines des protéines membranaires et intracellulaires, comme détaillé dans les publications n°1 et dans la partie «Mécanisme d'internalisation des cellules apoptotiques ». Les fibroblastes primaires sont visualisés grâce à un marquage au PKH 26, un marqueur non spécifique s'intercalant dans les membranes plasmiques, comme décrit dans la partie décrivant le mécanisme d'internalisation. Nous avons testé plusieurs concentrations de PKH 26 car les fluorochromes excités à chaque repositionnement et observation photoblanchissaient (extinction de la fluorescence).

II/ Utilisation de la mire pour se repositionner sur un même champ optique

July Galeano-Zea a mis au point une interface permettant à un expérimentateur, non spécialisé en informatique, d'utiliser le logiciel pour se repositionner à partir de l'image de la mire (figure 33A). A chaque champ optique de culture est associé un champ optique de la mire située en dessous (figure 33B). La photographie du champ de mire, une fois analysée, permet de déterminer sa position très précisément sur la mire. Ces coordonnées sont utilisées comme référence de position (X_i , Y_i). Lors d'un repositionnement, la photographie d'un champ optique de la mire prise au hasard permet au logiciel de calculer dans un premier temps les coordonnées de ce champ (X , Y) et dans un deuxième temps le déplacement nécessaire pour retrouver le champ de référence (ΔX , ΔY). Après déplacement, le nouveau champ de mire est analysé afin de vérifier le bon repositionnement ($X=X_i$, $Y=Y_i$). Enfin une photographie de la culture correspondante est prise et permet le suivi dans le temps.

Lors des premières expériences, les déplacements nécessaires pour retrouver la position de référence s'effectuait à la main en comptant les lignes et les colonnes. L'utilisation d'une platine motorisée a permis d'automatiser ce déplacement réduisant le temps de déplacement d'une dizaine de minutes à quelques secondes. Cette platine, correspondant à la série H117 ProScan Inverted Stage de Prior scientific, est fournie avec une librairie de fonctions pour commander ses déplacements par ordinateur en utilisant le protocole de communication série (RS232). Ces possibilités sont intégrées à l'interface utilisateur de repositionnement des images pour déplacer la platine en X et Y au gré des besoins et atteindre les positions recherchées sur la culture en un seul déplacement automatisé (figure 34).

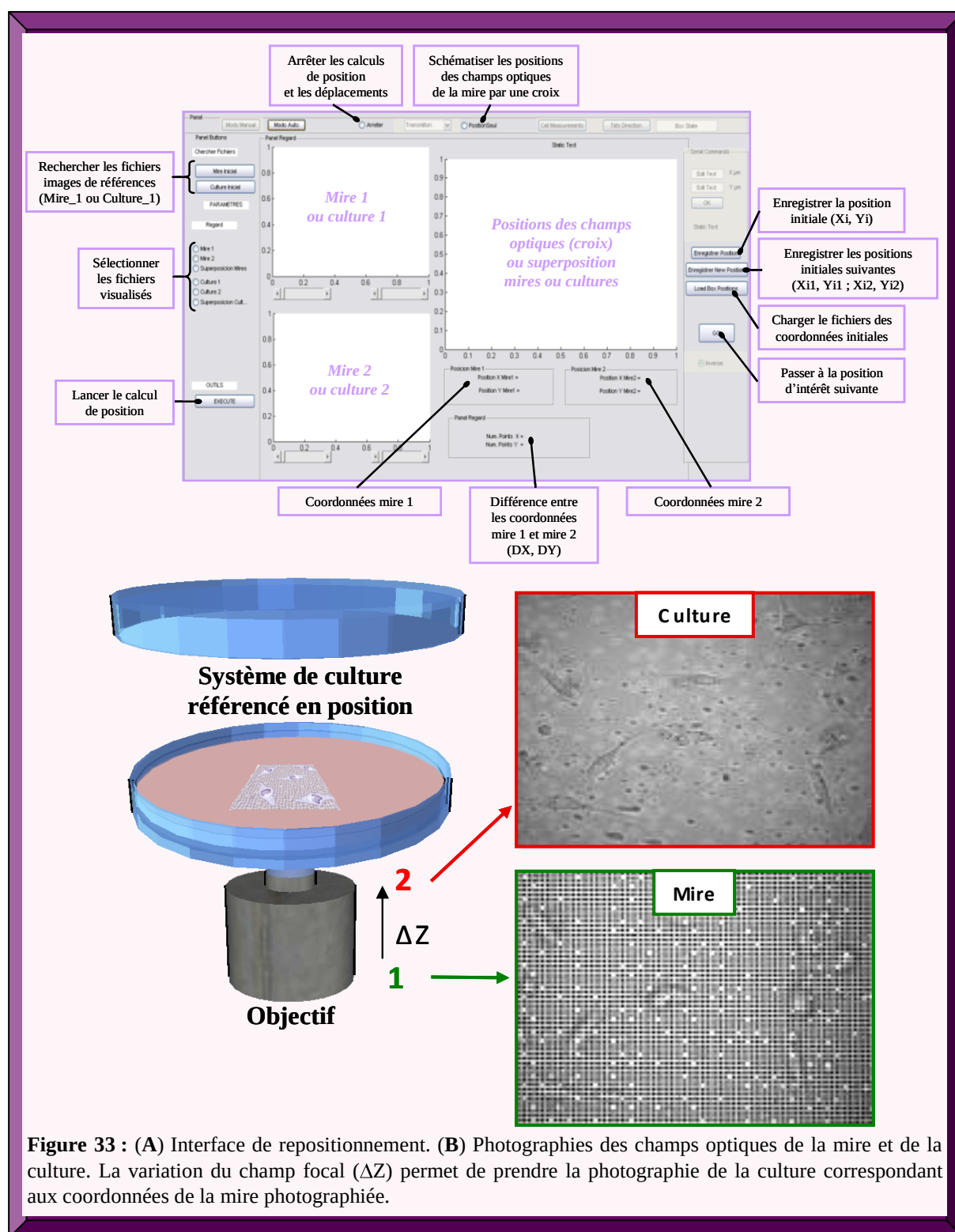
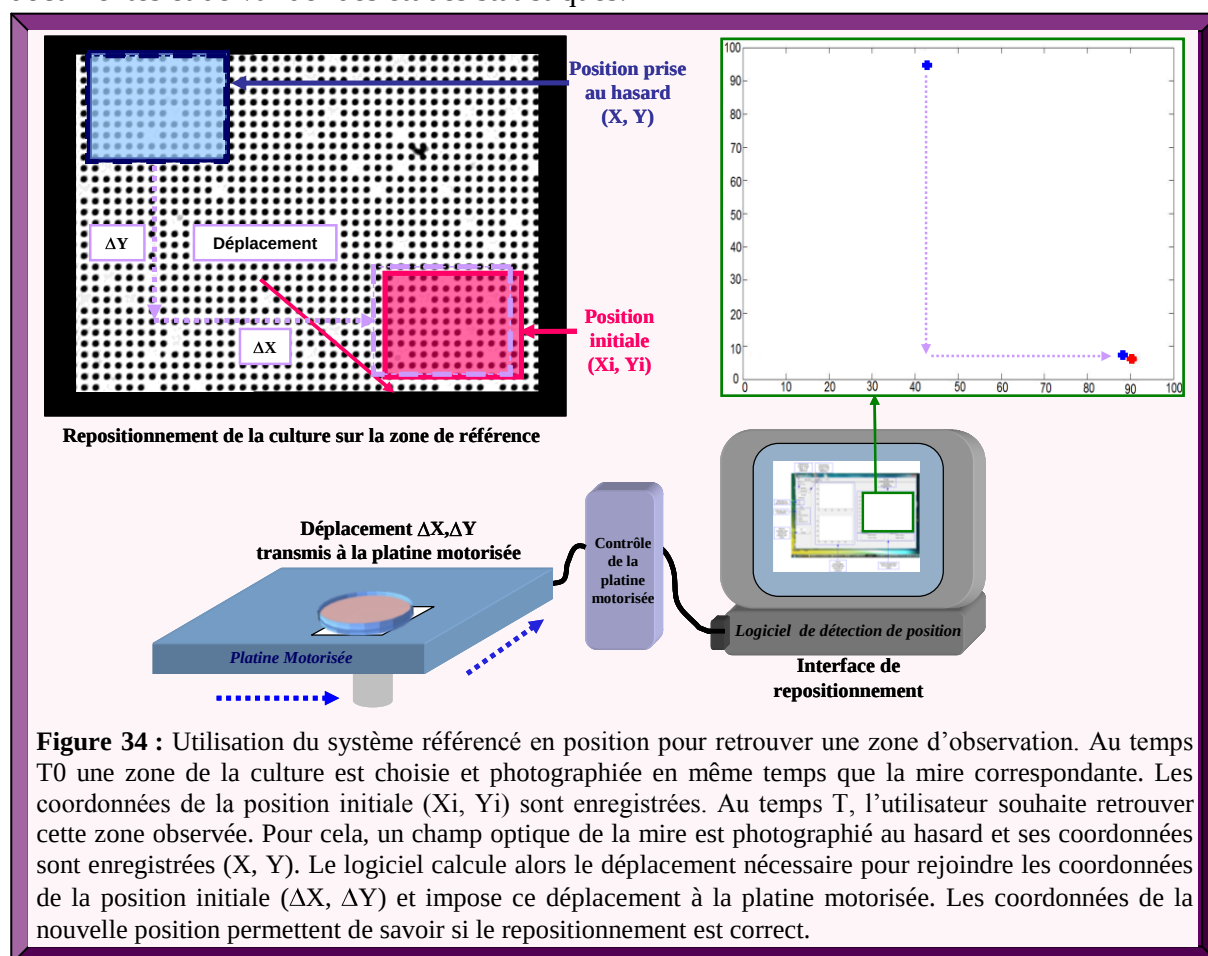


Figure 33 : (A) Interface de repositionnement. (B) Photographies des champs optiques de la mire et de la culture. La variation du champ focal (ΔZ) permet de prendre la photographie de la culture correspondant aux coordonnées de la mire photographiée.

En pratique, à partir de la position obtenue après le retour de la culture sous le microscope, le logiciel calcule la distance à parcourir pour atteindre la position visée. Ce déplacement est alors imposé à la platine motorisée. Après vérification de la bonne position, l'observation de la zone recherchée peut démarrer instantanément. Le déplacement de la platine motorisée étant beaucoup moins précis que les coordonnées des champs de mire, une

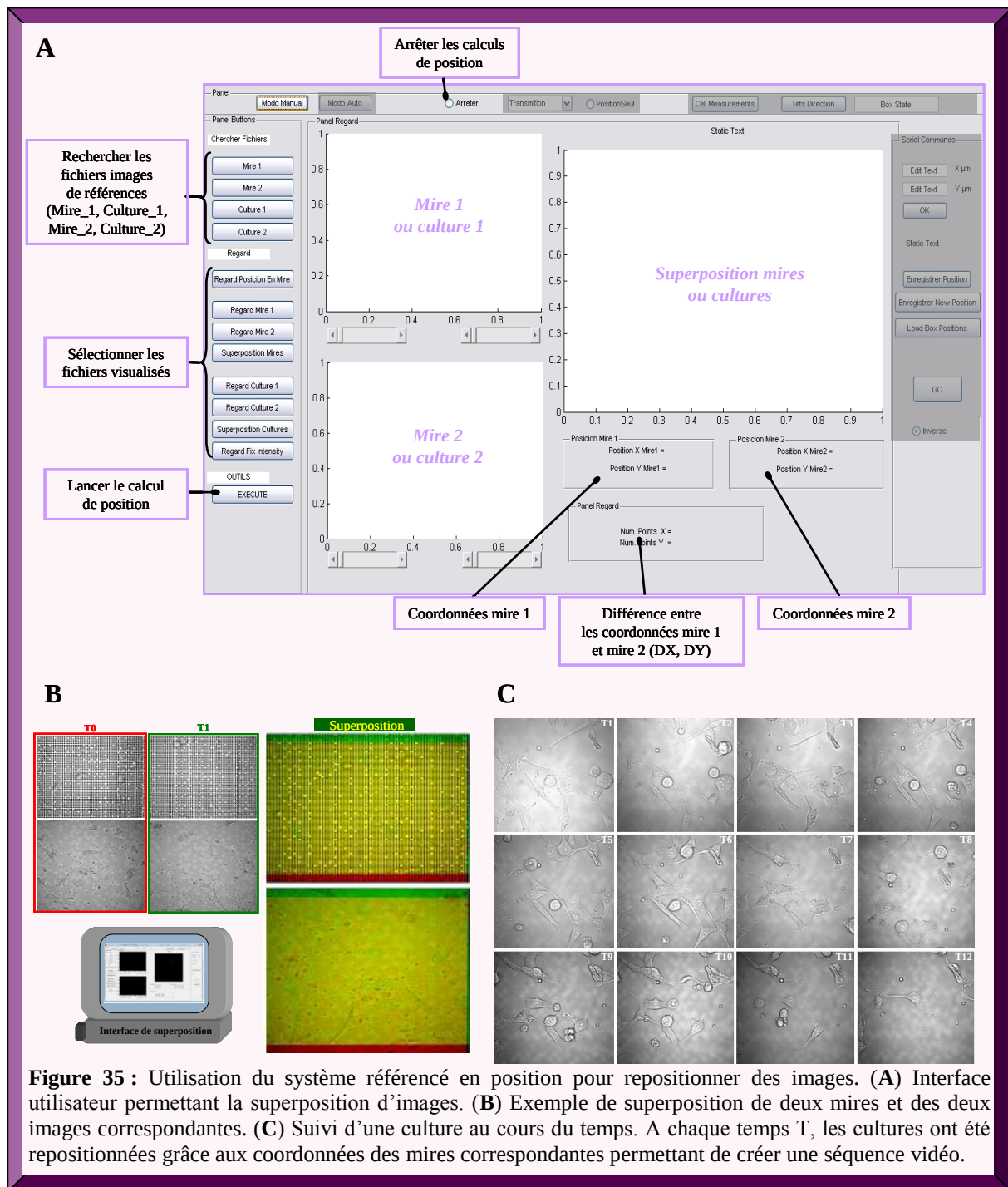
marge d'erreur de 4 lignes ou colonnes est acceptée pour la programmation du déplacement de la platine motorisée ($X=X_i \pm 4$, $Y=Y_i \pm 4$). Si les coordonnées mesurées sont différentes de plus de 4 lignes ou colonnes que les coordonnées initiales, la platine motorisée effectue un nouveau déplacement. Ce dispositif automatique est aussi mis à profit pour se déplacer d'une zone d'intérêt à une autre d'une même culture de façon quasi instantanée par la mémorisation de leurs positions respectives. Ceci offre une observation en parallèle de plusieurs sites lors d'un même protocole et permet ainsi de multiplier le nombre d'événements documentés et de valider des études statistiques.



III/ Utilisation de la mire pour suivre un événement biologique

L'équipe de P. Sandoz a mis au point une deuxième interface qui permet de superposer avec précision la même zone d'une culture observée à deux ou plusieurs reprises (figure 35A). Une fois la photographie de la mire et des cultures correspondantes importées, le logiciel superpose les champs de mire grâce à leurs coordonnées et fait de même pour les cultures associées (figure 35B). Après avoir repositionné précisément l'image des cultures de

chaque temps d'observation, il est possible de réaliser un film montrant l'évolution de la culture au cours du temps (figure 35C).



Publications n°2

Pseudo-periodic encryption of extended 2D surfaces for high accurate recovery of any random zone by vision

Galeano-Zea JA, Sandoz P, Gaiffe E, Prétet JL, Mougin C.

Int J Optomechatronics 2010, 4: 65-82

Pseudo-periodic encryption of extended 2D surfaces for high accurate recovery of any random zone by vision

Galeano-Zea July-Andrea¹, Sandoz Patrick¹, Gaiffe Emilie²,
Prétet Jean-Luc² and Mougin Christiane²

¹ Département d'Optique PM Duffieux, Institut FEMTO-ST, UMR CNRS 6174,
Université de Franche-Comté, 25030 Besançon Cedex, France

² Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, EA3181, IFR IBCT 133,
Université de Franche-Comté, 25030 Besançon Cedex, France

E-mail: patrick.sandoz@univ-fcomte.fr

Abstract. This paper presents a binary position encoding method for extended two-dimensional surfaces. Position encryption is based on linear feedback shift register sequences inserted within a periodic frame of spots. The position and orientation of any local view is retrieved accurately with respect to the encrypted surface. Image processing combines phase computations with binary image feature analysis. Measurement resolution is in the range of 10^{-2} pixel in position and 10^{-3} degree for in-plane orientation. The method is used as visual sensor in a position control loop applied to fluorescence optical microscopy for the recovery of cells of interest within culture dishes.

Keywords: Position sensing, Visual control, Subpixel resolution, In-plane orientation, Region of interest recovery, Binary position encryption, Local contrast detection, Phase measurement, Optical microscopy.

1. Introduction

With the improvement of technological tools and knowledge, our capabilities to act at the micrometer and nanometer scales increase continuously with ever more impressive realizations. As the scale of action is reduced, the actual size of regions of interest is also reduced and their localization is no more an obvious problem. The use of accurate translation stages allows the performance of reversible displacements as long as the specimen of interest remains fixed on the translation stage. If the specimen is removed or has to be transferred from one setup to another one, to find back a region of interest becomes a difficult task, especially if a high position accuracy is required. This problem is encountered in micro- and nano-technology, in micro-robotics and automation, and in cellular and molecular biology as well. Vision is a convenient tool for this task by combining non-contact sensing and digital processing.

For the last decades, lots of works were reported in the field of vision and visual control, especially from the robotics and automation community (shirai and Inoue, 1973; Chaumette and Hutchinson, 2006; Chaumette and Hutchinson, 2007). Impressive progresses were observed, partially driven by the continuous improvement of camera and personal computer capabilities. For the purpose of autonomous system control, the time response of the vision system is a crucial issue because of its role in closed-loop bandwidth determination. Our work is outside this response time constraint since we consider more a 'looking' then 'moving' approach for applications in which the continuous observation of the scene is not possible. A typical case corresponds to successive transfers of a specimen from a micro-machining process to a characterization instrument. Our aim is to propose a straightforward solution for localizing directly the zone of interest by vision. We also aim to provide a high resolution in position accuracy in order to benefit from the high lateral resolution of characterization instruments for image comparison. Furthermore, in-plane rotation has to be monitored for the compensation of random specimen alignment on the work plane. Our final application concerns live cell biology and more precisely the following of cell behavior over time by optical microscopy. Cell cultures are transferred from a controlled atmosphere cell incubator to the microscope at regular time instants. Our need is thus to localize efficiently the same cellular regions at each observation in order to observe the local evolution of well-identified sites of interest.

In term of vision, our problem can be defined as depicted in Fig.1. The gray area corresponds to an extended work space that is too large to be observed in whole. Only a smaller area - schematized by the white rectangle - can be observed at once with a sufficient definition with respect to the process involved. Then, the problem has basically two forms:

- (i) What is the position (x,y) and orientation (θ) of the observed area with respect to the work space in whole?
- (ii) How to find back a particular region of interest observed before to continue a process?

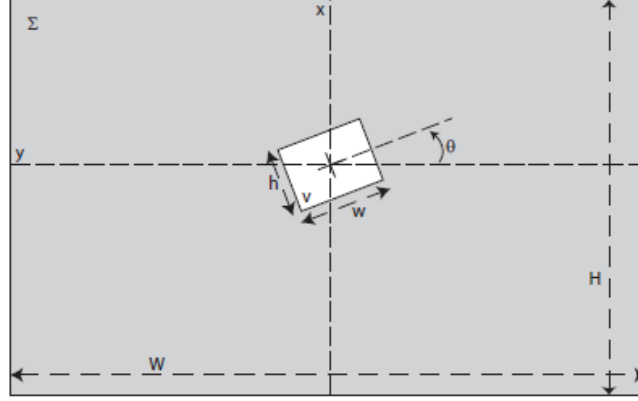


Figure 1. Definition of the position (x, y, θ) of a zone (v) of size $(w \times h)$ observed under microscope with respect to the encoded surface (Σ) of size $(W \times H)$.

Several approaches were proposed for answering this problem. In nanotechnology for instance, specific features are often inserted to make the localization of the sites of interest easier. A grid with lines of different widths was also proposed for the nanometer positioning of a STM probe supported by a miniature robot (St-Jacques et al., 2003). In the field of biology, several techniques were proposed for the localization of regions of interest, mainly on microscope slides (Feldman, 1980; Lin and Ruddle, 1981; Ruddle and Lin, 1983; Hause, 2004). They are based on regular grids and some of them use characters for the identification of squares defined by the grid lines. All those methods achieve a coarse localization of the sites of interest but do not allow fine zone adjustments suitable for sharp image comparison.

This paper proposes a method for the encryption of a binary code over an extended 2D surface. Our method allows accurate coordinate transformations of the image pixel frame into actual positions on the work space observed. In this way, partially overlapping images recorded at different instants of time can be displayed in a common reference system based on their actual positions on the sample. Sharp image comparison are thus possible with a subpixel accuracy. Binary encoding strategies have already been proposed (Salvi et al., 2004) but they are not suited to our case since they are designed for surfaces whose size is of the same order than the imaged one. Our encoding technique is based on a pseudo-periodic pattern that allows a high level of interpolation through phase measurements that lead to subpixel resolution. To avoid ambiguity due to pattern periodicity, alterations are inserted in order to distinguish between consecutive rows and columns in a unique way. Lateral position and in-plane orientation are thus retrieved from the image of any small fraction of the encoded area. The phase data is also used for local contrast computations that make the decoding software robust against noise and shadows. Section 2 describes our solution for position encoding of extended 2D surfaces. Binary sequences based on linear feedback shift register (LFSR) are encrypted in a regular distribution of dots. Image processing and position recovery are presented in section 3. They are based on Fourier transformations and spatial phase computations.

The performances of our method as well as its application to cell culture boxes are discussed in section 4.

2. Pseudo-periodic position encryption of 2D surfaces

2.1. Linear Feedback Shift Register sequences for 1D position encoding

To answer the position coding problem depicted in Fig.1, an idea would be to divide the whole surface in a regular set of sub-domains that are smaller than the field of observation and to encode the position of each of them (Sandoz et al., 2002). In such an approach, one has to manage the problem of partially visible sub-domains at the borders of available images. The size of sub-domains has then to be small enough to ensure that one at least is seen in whole in any recorded image. We choose a different way and designed a kind of rolling code just like a zoom is rolling over an extended view. Our idea was to build a continuous code in which contiguous position codes are closely interwoven with each other. We implemented a solution based on linear feedback shift register (LFSR) sequences that are widely used as test signals in the field of telecommunications because of their statistical properties (Golomb, 1967). The principle is to generate a sequence of maximum length; i.e. 2^N words of N bits; by means of a N digit shift register. The sequence corresponds to the binary words formed by the successive states of the shift register digits while at each shift, the input bit is a logical combination of previous state. (Shift register feedback is usually based on XOR gates of well-chosen register cells. This technique does not generate the word '0' that is a stable state but it may be inserted artificially in the generated sequence to obtain the full sequence of 2^N words.) Because of this mode of generation, each word of N bits shares its $N - 1$ first bits with the previous word and its $N - 1$ last bits with the following word. This rolling code is represented in Fig.2. Whatever the position along the sequence, any set of N consecutive bits forms a binary word. The latter can be converted into its position along the binary sequence by means of a look-up table known by construction from the feedback applied to the shift register and from its starting state.

This coding method presents the interest of reducing drastically the number of bits necessary to encode a complete sequence. Because of the $N - 1$ bits systematically shared between consecutive words, the total number of bits is limited to $2^N + N - 1$ bits instead of $2^N \times N$. This is of practical interest in the actual realization of the position encoding. In the context of our vision application, any image of the LFSR sequence allowing the identification of N consecutive bits is suited for the identification of the actual position of the view with respect to the complete sequence. In practise, one has to determine the number N of bits necessary to encode the desired sequence length and to suite the vision system to obtain a field of observation and an image resolution compatible with the LFSR sequence used.

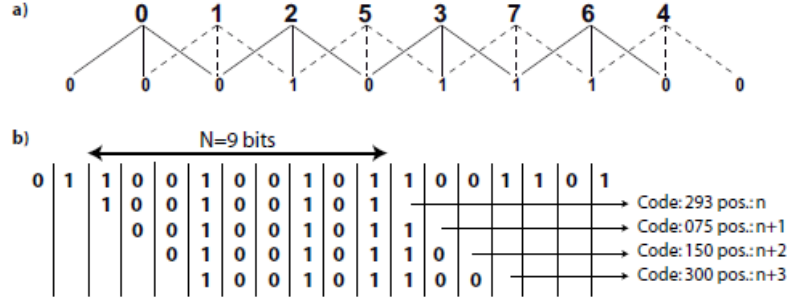


Figure 2. a) Principle of LFSR sequences for $N = 3$ bits. The full sequence of the 8 possible words are encoded with only 10 bits. b) Sequence part for $N = 9$ bits. The first line corresponds to the generated bit sequence while the following lines depict the N bit words read at consecutive positions along the sequence. The actual position along the sequence is obtained through a look-up table.

2.2. Combinaison of LFSR sequences for 2D surface encryption

LFSR sequences as discussed above and as used in telecommunications are one-dimensional. In our case of 2D surface encoding, those sequences have to be extended to two dimensions. Different possibilities may probably be proposed for this task. We choose to encode the perpendicular direction, let's say Y , through a relative shift between consecutive reproductions of the chosen LFSR sequence. This choice is illustrated in Fig.3. In this way, the two-dimensional encoding is made of LFSR sequences of two types. The even ones are identical whatever the Y position. These lines are only representative of the position along the horizontal direction. They are called reference lines or sequences. At contrary, the odd lines differ from each other as a function of the vertical coordinate Y . These lines reproduce the same LFSR sequence but with an incremented shift that is proportional to the Y coordinate. They are called shifted lines or sequences. Their code is thus representative of an hybrid information made of the sum of coordinate X plus a term proportional to the coordinate Y .

At the decoding stage, the recorded image is required to contain at least N consecutive bits on four consecutive lines. Then odd and even code lines are compared. Reference lines are identified because of exact reproduction of the same words that give the X position with respect to the encoding scheme. At contrary, shifted lines present different words representative of consecutive position values in the look-up table. The X position has then to be subtracted to deduce the Y position with respect to the encoding scheme. At this step, the in-plane orientation has to be taken into account for the determination of reference and shifted lines. Alignment have to be considered with respect to the code directions instead of the pixel frame ones.



Figure 3. Combinaison of LFSR sequences for 2D surface encryption. Even lines reproduce identical sequences that encode the X position only. Odd lines reproduce the same sequence with a incremented shift that is proportional to the position along the Y direction. On the left side of odd lines, the number of stars standing for undefined bits encodes the position along the vertical axis. An angle was introduced to fit with a general case of code observation.

2.3. Position encryption through periodic pattern alteration

The actual implementation of the code on extended two-dimensional surfaces is based on the alteration of a periodic frame of dark spots over a bright background. This choice fulfills several requirements:

- The pattern has only two levels for ease of realization and bit detection efficiency,
- spots are simple features similar to the point spread function of a vision system,
- the periodic basis of the encrypted pattern is necessary for phase computations allowing a high level of pixel interpolation.

Fig.4 presents different encryption solutions. In the most direct case (Fig.4.a), each spot encodes a bit of value '1' while the absence of spot encodes a bit of value '0'. The encoding of the lines and columns necessary for position identification is concentrated within a very small area. However, bit identification may be highly sensitive to noise, especially at repetitions of bits of value '0'. Furthermore, the periodic frame is highly altered. An alternative is shown in Fig.4.b in which one line of 'non coding' spots is inserted after each line of coding spots. The minimal area necessary for position identification is twice in the vertical direction but those neutral lines improves the periodic frame definition. '0' value bit identification can also be improved by comparison with neighbor spots. Finally, Fig.4.c presents the codification actually used in our application. We have only one coding spot every ten spots distributed in rectangular sets of five lines and two columns as shown in the figure. Furthermore, missing spots encoding for '0' values are distributed alternately on the second or fourth line of each set of five lines for a lower periodic frame distortion. In this case, position identification requires the imaging of 18 consecutive columns and 20 lines with a sequence of $N = 9$ bits. (This choice was induced by technical limitations in our master mask realization machine that asked us to reduce the density of missing spots).

While many other possibilities might be thought of one may notice that a solution based on Manchester codes would not be suited in our case because of our requirement to distribute spots along a periodic frame for further position interpolation as explained below.

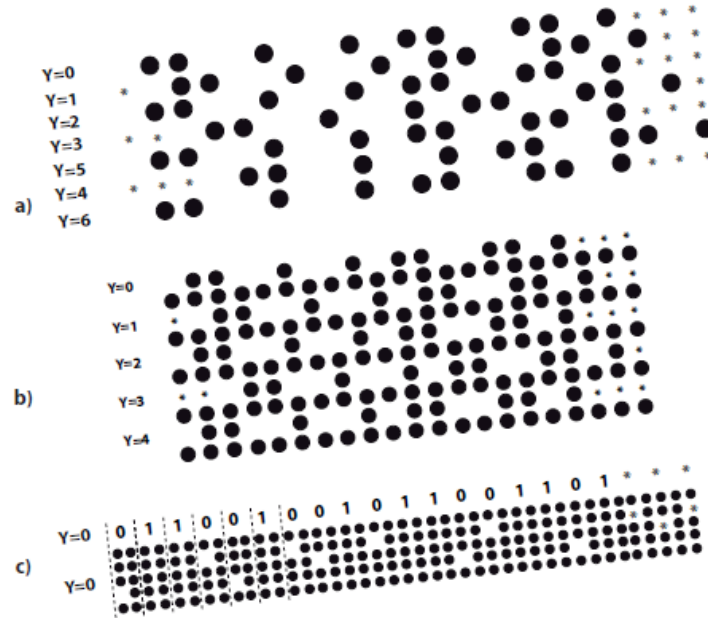


Figure 4. Pseudo-periodic dot patterns for 2D LFSR sequences encryption. a) Direct encoding: black spot means ‘1’, no spot means ‘0’. b) Lower density code with neutral lines inserted. c) Encryption actually used with only one encoding spot among groups of 10.

3. Phase processing for subpixel position recovery

Once an image of a small area of a surface encrypted with the chosen pseudo-periodic code is recorded, position identification is carried out in a two step procedure. The first step involves linear processing and provides a very fine positioning of the periodic frame with respect to the pixel frame of the camera. The second step involves binary processing for bit value identification and LFSR sequences reconstruction and decoding. It allows to convert relative position measurement obtained at the first step into absolute position determination with respect to the whole encoded surface by keeping subpixel accuracy.

3.1. Phase processing for fine determination of periodic frame position

The basic principle of fine position determination by phase computations was already presented in previous works (Sandoz et al., 2002; Sandoz et al., 2007a). Then, we just outline the main idea here. Fig.5.a presents an image of a small area of an encoded

surface as recorded experimentally in our biological application in presence of noise. The Fourier power spectrum of this image is represented in Fig.5.b in a logarithmic scale. This spectrum is made of well separated lobes that correspond to the set of spatial frequencies involved in the pattern. The DC term is in the middle of the figure. Around this DC term, a first squared perimeter is made of eight symmetrical lobes. The latter correspond to fundamental pattern frequencies along line and column directions as well as following diagonal directions. A second squared perimeter appears at the figure sides. These lobes correspond to the first harmonics of pattern frequencies because of non-sinusoidal profile of the pattern. Among this spectrum, we successively filter out only two lobes, as marked by arrows and representative of the main pattern directions. The Fourier spectrum is multiplied by a gaussian filter centered on the lobe position and we consider the inverse Fourier transform of that filtered spectrum. This inverse Fourier transform returns a complex image in the spatial domain that is representative of the best sinusoidal approximation of the pattern along a single direction. The phase of this complex image, as represented in Fig.5.c, gives at each image pixel the argument of the cosine function fitting the pattern with the best approximation along the direction considered. The phase values match the spot positions in the initial pattern as follows in the case of dark spots on a bright background: spot centres correspond to phase values of $\pm\pi$ while horizontal white lines between consecutive spot lines correspond to phase values equal to 0.

The high accurate identification of the spot centre locations requires the removal of phase discontinuities by unwrapping the phase image of Fig.5.c. The resulting phase map is represented in Fig.5.d. Because of regular distribution of spots, this phase map is a plane that can be easily expressed by a least square fitting equation:

$$\Phi_V(i, j) = A_V \cdot i + B_V \cdot j + C_V \quad (1)$$

where i, j stand for pixel indexes. Spot positions are known to satisfy the following equation:

$$\Phi_V(i, j) = \pi \pm 2 \cdot n \cdot \pi \quad (2)$$

where n is an integer. By solving it, we obtain straight lines describing with a subpixel definition the location of dark spots along the vertical direction. These lines are reduced to points by processing the Fourier spectrum in the same way for the complementary spectral lobe, as marked by an arrow in Fig.5.b, and leading to a second phase plane, perpendicular to the first one and expressed by:

$$\Phi_H(i, j) = A_H \cdot i + B_H \cdot j + C_H \quad (3)$$

Equations 1 and 3 represent finely the position of the periodic frame of spots with respect to the image pixel frame. The in-plane orientation is determined modulo $\pi/2$ from parameters A_V, B_V or A_H, B_H . However the phase planes do not distinguish between present and missing spots neither between consecutive lines and columns with respect to the whole pattern. This is due to arbitrary initial conditions for phase unwrapping that introduce a $\pm 2 \cdot k \cdot \pi$ uncertainty in phase constants C_V and C_H . This is solved by decoding the LFSR sequences present in the observed image as explained below.

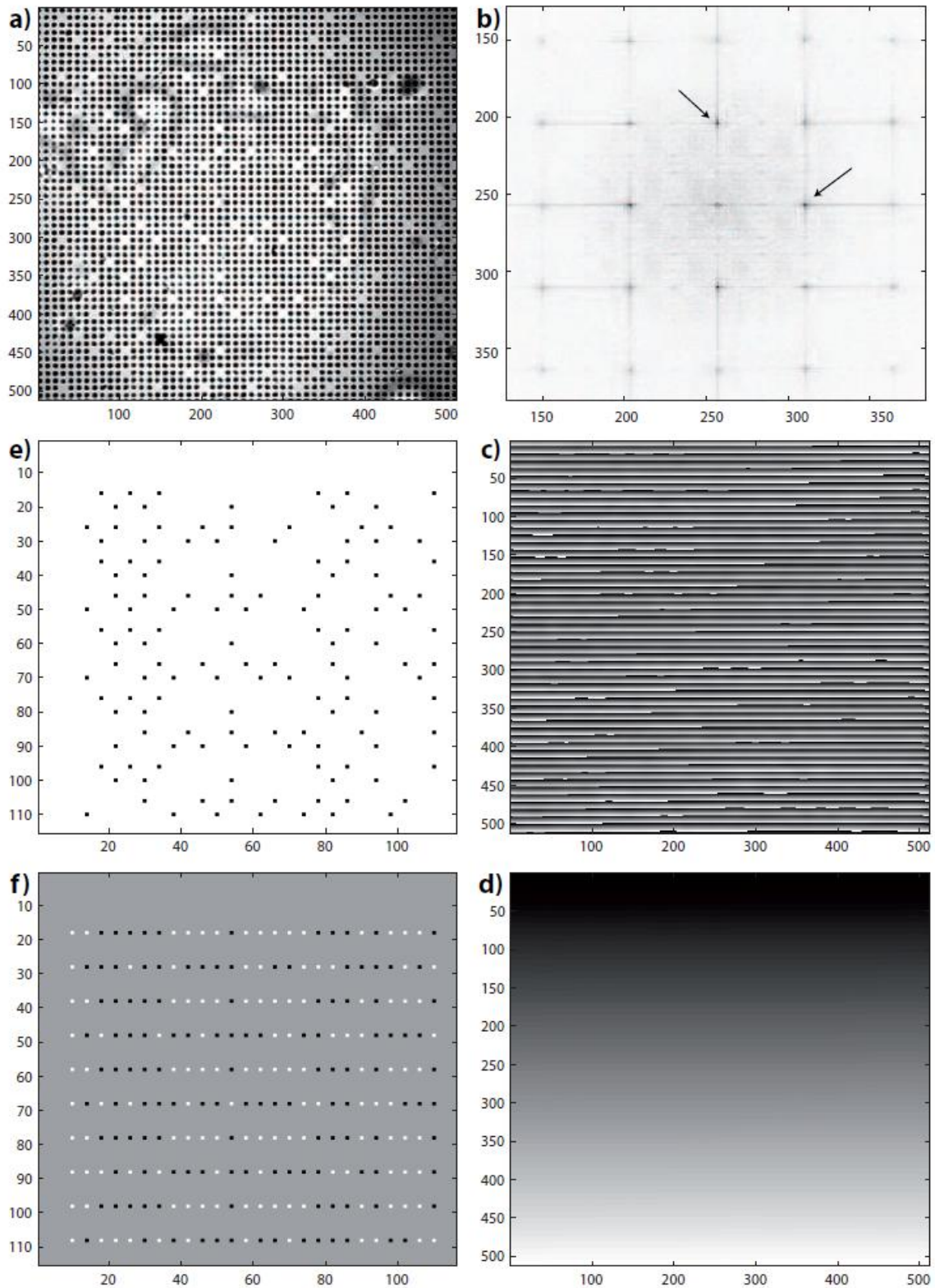


Figure 5. Different steps of image processing: a) Pseudo-periodic pattern image in presence of noise; b) Fourier spectrum modulus of a) (log scale) c) vertical wrapped phase; d) vertical unwrapped phase; e) missing points identified; f) reconstructed LFSR sequences. Scale in pixel (a, c, d), spatial frequencies (b), spot line number (e, f).

3.2. LFSR sequence decoding and absolute position recovery

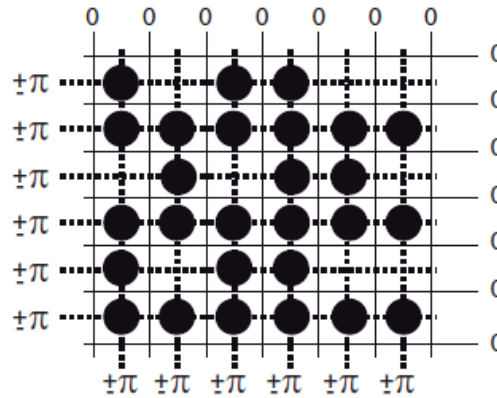


Figure 6. Use of wrapped phase values for the determination of dot sites. Dot centres are located at the intersection of dashed lines ($\phi = \pm\pi$) while the intersection of solid lines ($\phi = 0$) correspond to background sites.

The first and most critical step in LFSR sequence decoding is the correct identification of missing spots in the initial image. As can be seen in Fig.5.a, noise is present that make this identification difficult. For this purpose, we take advantage of the phase information presented above to perform very robust missing spot determination. The principle is depicted in Fig.6. Because of periodic distribution of spots and thanks to Fourier processing, we are able to determine the possible spot positions as well as positions of intermediate lines crossing between spot lines and columns. As shown in the figure, pixels close to the center of spots are associated to phase values close to $\pm\pi$ modulo 2π in both phase maps. At contrary, background points intermediate between spots lines and columns are known to have a phase value close to 0 modulo 2π . From this *a priori* knowledge, each spot location is tested individually by comparing its intensity level with respect to that of the neighbor spots and the background intensity. We are thus able to determine the local value of spot contrast and to optimize the decision threshold at each possible location. At this stage, the presence of ‘non coding’ spots, as represented in figures 4.b and 4.c is useful. It allows the determination of regular sites where spots are known to be present and that make easier the evaluation of the local spot contrast.

The processing of the image depicted in Fig.5.a has led to the missing spot image of Fig.5.e. We can see that missing spots are identified properly even in presence of shadows or non uniform illumination. (A narrow band is voluntarily omitted on the left and upper sides to avoid image side effects). For convenience and amount of data reduction, we switch from images defined in pixels to images defined in spot lines and columns. This is easily done by considering again the unwrapped phase maps and more precisely their entire values after division by 2π . At this stage, the knowledge of the pattern construction is also used for distinguishing horizontal and vertical sequences

directions and for identifying sets of spot lines encoding each LFSR sequence. For instance, in our particular choice of encryption pattern, spot lines can be associated by sets of five lines with missing spots distributed only on the second and fourth lines of each set. Such processing leads to the reconstruction of LFSR sequences as depicted in Fig.5.f. We can observe that odd sequences are identical while even lines are shifted by two bits with respect to each other. References and shifted sequences are thus easily identified and decrypted for deducing the position of the observed view within the complete encrypted surface. This coarse but absolute position determination allows the adjustment of the phase plane definition of Eq.1 and 3 with the correct $2k\pi$ phase offsets to obtain absolute and high resolution position of the observed view. (After division by 2π , phase values are representative of spot line and column orders). The modulo $\pi/2$ uncertainty on in-plane orientation is also removed by this identification of LFSR sequences. Finally we obtain a complete and accurate position determination of the observed view with respect to the extended 2D surface encrypted.

4. Performances and application

4.1. Performances in position and orientation measurement

An encryption pattern was realized following the spot distribution described in Fig.3 and 4.c. A $4\mu\text{m}$ spot period was chosen for the encryption of a surface of $3.6 \times 3.3\text{mm}^2$ with LFSR sequences of 9 bits. (In fact, the encrypted area is limited by technical restrictions for master mask realization). The encryption pattern designed was transferred onto a master mask and then on glass plates by photolithography. Dark spots are made of aluminium in contrast with the glass background. The specimens produced can be used in reflection or in transmission as well. In the case of Fig.5.a, the pattern is observed on an transmission optical microscope with a $40\times$ magnification lens. The field of view is of $0.22 \times 0.22\text{mm}^2$; i.e. about 0.3% of the encoded surface.

Performance evaluation experiments were carried out with the same pattern but on a different setup using a $20\times$ magnification lens in transmission. The encoded glass plate was fixed onto a 3D piezoelectric transducer (PI P-615). The positions reconstructed from pseudo-periodic pattern processing are compared with image displacements obtained by a sub-pixel image correlation method. We are thus able to evaluate the performances of our method in lateral position measurement. Fig.7 presents the results obtained. The displacement non-linearity observed is due to the PZT behavior but the two curves show excellent agreement with each other. The standard deviation between the two measurements is 2.5nm . This deviation has to be compared with the pseudo-periodic pattern period of $4\mu\text{m}$ and with the image definition of $0.4\mu\text{m}$ per pixel with a $20\times$ lens.

The PZT was also used in an home-made mechanical arrangement suited to produce a progressive in-plane rotation of the pseudo-periodic pattern. The reconstructed in-plane orientation of the pattern is represented in Fig.8. The progressive rotation of

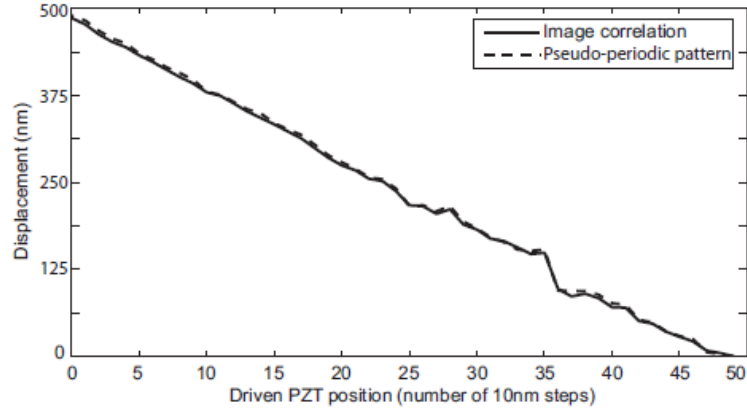


Figure 7. Comparison of lateral position values returned by processing of the pseudo-periodic pattern images and by an image correlation method while the PZT is driven laterally by steps of 10nm.

the pattern is well detected and a 10^{-3° peak to peak deviation from a straight line is observed.

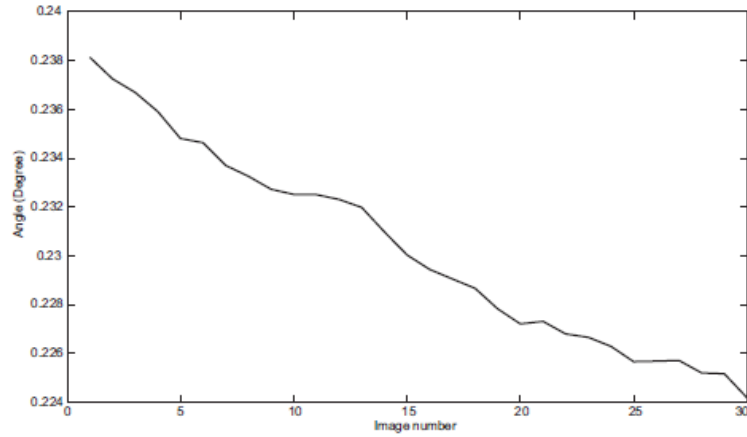


Figure 8. Reconstructed values of the in-plane pseudo-periodic pattern orientation while the PZT is used to produce a progressive rotation of the pattern. A peak to peak deviation from a straight line of 10^{-3° was evaluated.

The capability of the encoding procedure and image processing developed to retrieve

the actual position of the small area under observation with respect to the encrypted surface was verified experimentally. The method is found to provide the absolute position and in-plane orientation of any observed zone. A magnification range from $10\times$ to $60\times$ is compatible with our design based on a $4\mu\text{m}$ pattern period. Measurement resolution was found to increase with the lens magnification. It varies from a few 10^{-2} pixel at $10\times$ magnification to a few 10^{-3} pixel at $60\times$ for lateral coordinate determination. In-plane orientation is determined with a resolution of 10^{-3}° and no sensitivity to lens magnification was observed in angular measurements.

4.2. Biological application to the observation of cell transformations

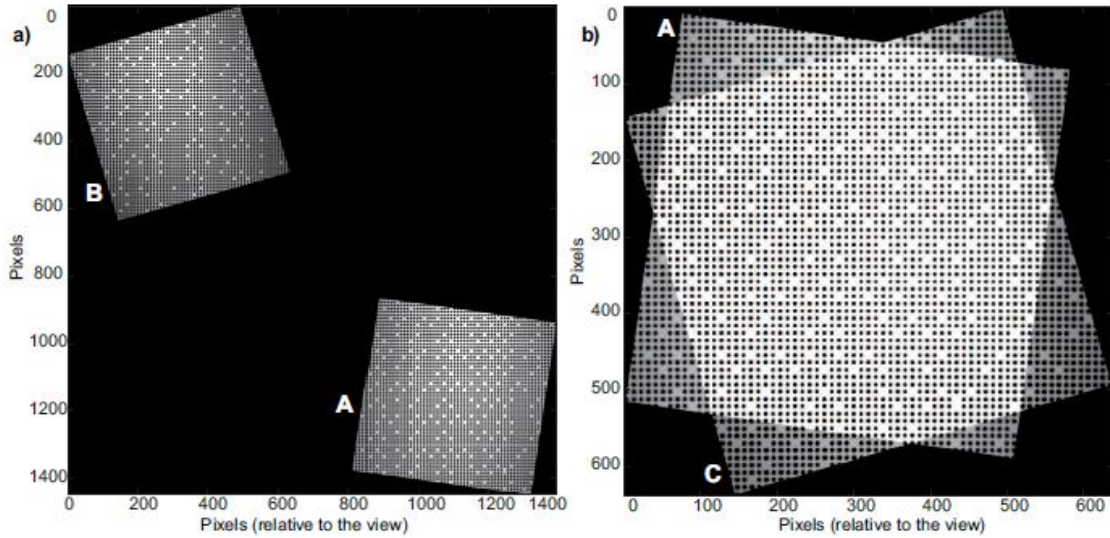


Figure 9. Region of interest recovery. a) After culture dish setting on the microscope stage, the current zone 'B' is usually far from the zone of interest 'A'; b) After automatic position adjustment, the current zone 'C' overlaps the zone of interest 'A'.

The method was applied to the following of biological cell transformations over time during their culture in Petri dishes by using optical microscopy. When cells are put in a culture dish with nutritive liquid, they have more or less a spherical shape and they are moving within the liquid. We do not follow cells at this stage but wait for their 'installation'. Effectively, the first action of cells in culture is to develop bonds to link themselves to the culture dish surface. Once cells spread on the dish surface, it becomes possible to distinguish cells from each other through their spatial position on the culture dish. We use this property in our application based on optical microscopy. We realized specific culture boxes in which a pseudo-periodic pattern is inserted for further lateral position determinations. As described in a previous proof of principle (Sandoz et al., 2007b), the pseudo-periodic pattern is set in the depth of the culture box to avoid crosstalk between images during microscopy observations. Observations are thus made in two steps. The cells of interest are observed with the focus made on the dish

surface as usually. Once the cell image is recorded, the focus is shifted along the vertical direction to observe the in-depth pseudo-periodic pattern. This vertical translation does not affect the lateral coordinates and the cell image position is computed from the image of the pseudo-periodic pattern recorded after this focus adjustment. Following this procedure, all cell images recorded are referenced in position with respect to the culture dish surface. After cell transfers in the cell incubator for a while, the same culture areas can be observed again by localizing the right dish zones thanks to the pseudo-periodic pattern. Positions derived from pseudo-periodic pattern processing are used to drive the motorized stage of the microscope to the right culture dish zone. This procedure is depicted in Fig.9. In Fig.9.a, the current zone of observation 'B' is far from the zone of interest 'A' observed previously. This is the usual case as the culture dish is set on the microscope stage after cell transfer in the cell incubator. These regions are localized with respect to each other thanks to the processing of the pseudo-periodic pattern images and thus displayed in a common reference system to obtain this figure.

From the knowledge of the position of the zone of interest 'A' and from the current position of observation 'B', the necessary stage translation is computed and sent to the stage control unit through serial communication. After this lateral position adjustment, the new zone of observation 'C' overlaps the actual zone of interest 'A'. After this displacement, angular mismatch remains as well as lateral position uncertainty due to the microscope stage resolution. The latter is compensated digitally from actual positions derived from pseudo-periodic pattern images. Excellent image superimposition is thus obtained as depicted in Fig.9.b. While image orientations mismatch and limited stage resolution, subpixel resolution is finally obtained in recorded image adjustment. The combination of position encryption, pseudo-periodic pattern image processing and serial driving of the microscope stage forms an efficient control loop for the recovery of any zone of interest on the culture dish surface and allowing sharp image comparisons.

Fig.10 presents the application of this principle to an actual cell culture observed with a fluorescence confocal microscope (Olympus Fluoview, 60 $\times$ immersion lens in reflection). The preparation is made of Hela cells issued from human cervical cancer. Cells are treated with a PKH26 red fluorescent marker to make cytoskeleton visible. Fluorescence excitation is made at 548nm with green ray of He-Ne laser. Images of Fig.10.a and 10.b correspond to the same culture zone after coordinate adjustment with a culture period of two hours between image recordings. They are therefore displayed in the same reference system and cell displacements and transformations appearing reveal the actual evolution of the culture. Such cell views are very useful for biological description of culture kinematics. For instance the extension of the cell on the right side of the image is due to cellular division.

Fig.11 presents a restricted view of this zone centered on the cell in the middle of the lower part. We can see in Fig.11.b that the cell has released its bonds to the surface on the left side, probably for taking a more spherical form in preparation of an upcoming division. The displacement of the cell to the right is clearly visible in these images, especially in Fig.11.c showing the intensity difference observed between

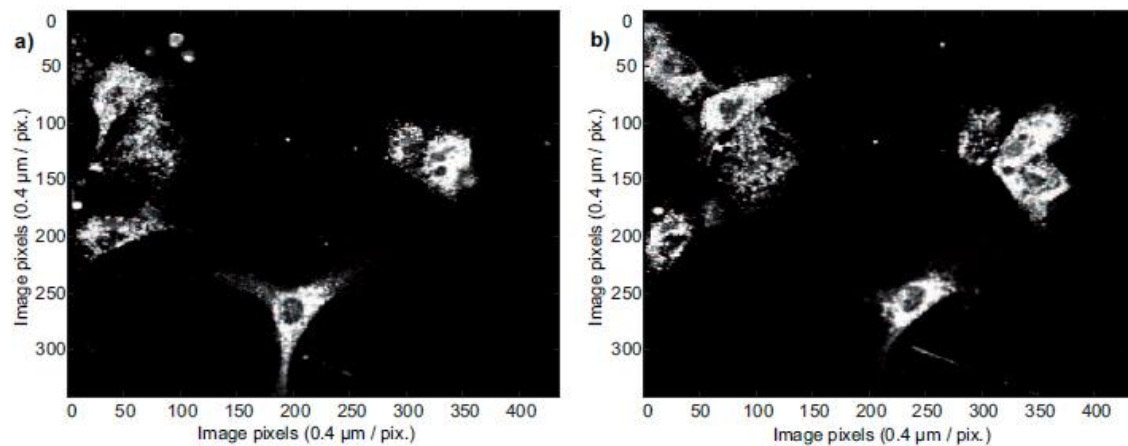


Figure 10. Images of the same cell culture area after culture box transfer from microscope to cell incubator during two hours. a) Fluorescent image of cytoskeleton at time T ; b) image of the same spatial zone at time $T + 2h$. Cell displacements and transformations can be observed and quantified accurately.

recorded images. The black hole in the cell middle corresponds to the nucleus that is not sensitive to the fluorescent marker.

These results demonstrate the capabilities of this method for use in cell culture following and characterization by optical microscopy. Our method of position referencing based on pseudo-periodic pattern is shown to be a new tool available for the biology community. The control loop based on position computation and microscope stage driving ensures the recovery of any zone of interest, even after culture dish removal from the microscope stage. In our actual biology work, the method is used for characterizing the kinematics of DNA material transfer from dying cells to living ones by using multiple fluorescence markers. (Details about this cancer research work are outside the frame of this paper).

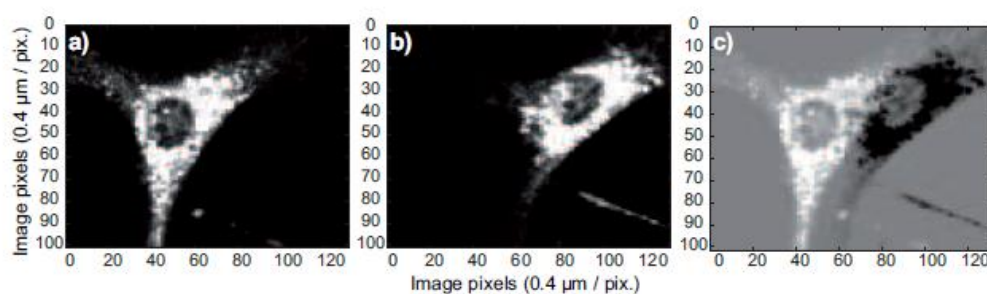


Figure 11. Zoom of Fig.10. a) Time T ; b) Time $T + 2h$; c) Subtraction of previous images.

5. Discussion and conclusion

This paper demonstrates a position encoding method suited for extended two-dimensional surfaces and allowing the visual determination of the position of any local view with respect to the whole surface. The position encoding is based on the binary implementation of LFSR sequences that present a great advantage: Adjacent locations share a large amount of data for the encoding of their position. Provided it has the required minimal size, any view is suited for position determination thanks to this ‘rolling code’ concept. Furthermore, the amount of bits actually encrypted on the surface is reduced drastically. This property releases constraints in both pattern design and realization and in vision system resolution requirements. Position is reconstructed by combining two complementary procedures. Phase processing benefits from the periodic frame of the pattern for performing subpixel position measurement. This fine measurement is relative and has to be complemented by a coarse measurement resulting from binary decoding of LFSR sequences present in the recorded images. These two decoding steps are interwoven since the phase data are used to predict the spot locations. A local contrast is thus determined that allows the optimization of the decision threshold applied to the identification of the bit values in LFSR sequence reconstruction. The resulting decoding process was found to be very robust against noise, shadows or non uniform illumination. Furthermore, if the recorded view is larger than the required minimum size, extra data can be extracted for redundancy. This opportunity is not explored in the paper but such extra data could be used for error detection and correction for application in a more difficult environment. Finally experiments demonstrate that any recorded view can be located in both position and orientation with respect to the whole encoded surface. Resolution achieved is in the range of 10^{-2} pixel for position and 10^{-3} degree for in-plane orientation.

This method of visual determination of position can be used as sensing element in a position control loop. We present an application in the field of optical microscopy analysis of cell cultures. Smart culture dishes was realized with a pseudo-periodic pattern embedded in their structure. With the position control allowed, the position of the current view can be known at any time; even after specimen removal from the microscope stage. Every cell image is thus referenced in position and it becomes straightforward to recover any zone of interest. In practise, the motorized stage of the microscope is controlled through serial communications for automatic stage translation towards the zone of interest. Finally, cell images recorded at different instants of time are displayed in a common reference system ensuring subpixel position adjustment. Biological events can thus be accurately documented for sharp analysis. At present time, the software is implemented with Matlab. The processing time is about 25s with a 3GHz dual core Pentium processor. A much faster implementation could be realized for reducing this time constant. Other applications could then be thought of for the proposed method, for instance in the field of work space position monitoring in micro-robotics.

Acknowledgments

We thank Sophie Launay for assistance in confocal microscopy and Laurent Robert and Denis Bitschené for their help in clean room processing of pseudo-periodic patterns. We acknowledge Région de Franche-Comté for project funding (UFC 39SB) and Institut National du Cancer (INCa) for supporting PhD work of July A. Galeano Zea.

References

- Shirai, Y. and Inoue, H. 1973. Guiding a robot by visual feedback in assembling tasks, *Pattern Recognition*, **5**, 99-108.
- Chaumette, F. Hutchinson, S. 2006. Visual servo control. I. Basic approaches [Tutorial], *IEEE Robotics & Automation Magazine*, **13**, 82-90.
- Chaumette, F. Hutchinson, S. IRISA, R. 2007. Visual servo control. II. Advanced approaches [Tutorial], *IEEE Robotics & Automation Magazine*, **14**, 109-118.
- St-Jacques, D. Martel, S. FitzGerald, T. 2003. Nanoscale Grid Based Positioning System for miniature Instrumented Robots. CCECE 2003 conference, IEEE, **3**, 1831- 1834 .
- Feldman, B. 1980. Microscope Slide, US Patent 4,183,614, 01-15-1980.
- Ruddle, F.H. Lin, P.F. 1983. Method for engraving a grid pattern on microscope slides and slips, US Patent 4,415,405, 11-15-1983.
- Lin, P.F. Ruddle, F.H. 1981. Photoengraving of coverslips and slides to facilitate monitoring of micromanipulated cells or chromosome spreads, *Exp. Cell Res.*, **134**, 485-488.
- Hause, L. 2004. Mapping method for a microscope slide, US Patent 6,734,442 B1, 05-11-2004.
- Salvi, J. Pagès, J. Batle, J. 2004. Pattern codification strategies in structured light systems, *Journal of Pattern recognition*, **37**, 4, 827-849.
- Sandoz, P. Bonnans, V. Gharbi, T. 2002. High-accuracy position and orientation measurement of extended 2D surfaces by a phase-sensitive vision method, *Appl. Opt.*, **41**, pp. 5503-5511.
- Golomb, S.W. 1967. Shift Register Sequences, Holden-Day Inc., San Francisco, U.S.A.
- Sandoz, P. Friedt, J.M. Carry, E. 2007 (a). In-plane rigid-body vibration mode characterization with nanometer resolution by stroboscopic imaging of a microstructured pattern, *Rev. of Scient. Instrum.*, **78**, 023706.
- Sandoz, P. Zeggari, R. Froelhy, L. Prétet, J.L. Mougin, C. 2007 (b). Position referencing in optical microscopy thanks to sample holders with out-of-focus encoded patterns, *Journal of Microscopy*, **255**, 293-303.

Publications n°3

Position-referenced microscopy for live cell culture monitoring

J. Galeano-Zea, P. Sandoz, E. Gaiffe, S. Launay, L. Robert, M. Jacquot, F. Hirchaud, J.L. Prétet, C. Mougin.

Biomedical Optics Express 2011, 2: 1307-1

Position-referenced microscopy for live cell culture monitoring

July A. Galeano Z.,¹ Patrick Sandoz,^{1,*} Emilie Gaiffe,²
Sophie Launay,³ Laurent Robert,⁴ Maxime Jacquot,¹
Fabienne Hirschaud,² Jean-Luc Prétet,² and Christiane Mougin²

¹D  partement D'Optique P.M. Duffieux, Institut FEMTO-ST, UMR CNRS 6174, Université de Franche-Comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon, France

²Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, EA3181, IFR IBCT 133, Université de Franche-Comté, CHU Jean Minjoz, F25030 Besançon, France

³IFR IBCT 133, Université de Franche-Comté, CHU Jean Minjoz, F25030 Besançon, France

⁴MIMETO technological facility, Institut FEMTO-ST, UMR CNRS 6174, Université de Franche-Comté, 32 Av. de l'Observatoire, 25044 Besançon, France

*patrick.sandoz@univ-fcomte.fr

Abstract: Position-referenced microscopy (PRM) is based on smart sample holders that integrate a position reference pattern (PRP) in their depth, allowing the determination of the lateral coordinates with respect to the sample-holder itself. Regions of interest can thus be retrieved easily after culture dish transfers from a cell incubator to the microscope stage. Images recorded at different instants in time are superimposed in a common coordinate system with subpixel accuracy. This paper presents such smart Petri culture dishes and their use for live cell culture monitoring. The impact of the PRP on the light budget is discussed and performances are demonstrated. First results on the application of PRM to the observation of apoptotic body internalization are reported.

   2011 Optical Society of America

OCIS codes: (170.0180) Live cell culture; (100.0100) Image processing; (120.5050) Phase measurement; (120.0120) Instrumentation, measurement, and metrology; (180.2520) Fluorescence microscopy.

References and links

1. Y. L. Wang and D. L. Taylor, *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture* (Academic Press, 1989).
2. T. W. J. Gadella Jr., T. M. Jovin, and R. M. Clegg, "Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale," *Biophys. Chem.* **48**, 221–239 (1993).
3. M. Rajadhyaksha, M. Grossman, D. Esterowitz, R. H. Webb, and R. R. Anderson, "In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast," *J. Invest. Dermatol.* **104**, 946–952 (1995).
4. J. G. Fujimoto, "Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging," *Nat. Biotechnol.* **21**, 1361–1367 (2003).
5. B. Feldman, "Microscope slide," U.S. Patent 4,183,614 (15 January 1980).
6. P. Lin and F. Ruddle, "Photoengraving of coverslips and slides to facilitate monitoring of micromanipulated cells or chromosome spreads," *Exp. Cell Res.* **134**, 485–488 (1981).
7. K. M. Saleh, P. G. Toner, K. E. Carr, and H. E. Hughes, "An improved method for sequential light and scanning electron microscopy of the same cell using localising microcoverslips," *J. Clin. Pathol.* **35**, 576–580 (1982).
8. F. Ruddle and P. Lin, "Method for engraving a grid pattern on microscope slides and slips," U.S. Patent 4,415,405 (15 November 1983).
9. G. Dimou and T. Pang, "Process for manufacturing a cover glass with a viewing field," U.S. Patent 5,766,677 (16 June 1998).
10. L. Hause and D. Jeutter, "Mapping method for a microscope slide," U.S. Patent 5,786,130 (28 July 1998).

#140190 - \$15.00 USD Received 4 Jan 2011; revised 13 Apr 2011; accepted 14 Apr 2011; published 25 Apr 2011
(C) 2011 OSA 1 May 2011 / Vol. 2, No. 5 / BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS 1307

11. D. St-Jacques, S. Martel, and T. B. FitzGerald, "Nanoscale grid based positioning system for miniature instrumented robots," *Proceedings of IEEE Canadian Conference on Electrical and Computer Engineering* (IEEE 2003) 3 1831–1834.
12. P. Sandoz, R. Zeggari, L. Froelhy, J. L. Prétet, and C. Mougin, "Position referencing in optical microscopy thanks to sample holders with out-of-focus encoded patterns," *J. Microsc.* **255**, 293–303 (2007).
13. J. A. Galeano-Zea, P. Sandoz, E. Gaiffe, J. L. Prétet, and C. Mougin, "Pseudo-periodic encryption of extended 2-D surfaces for high accurate recovery of any random zone by vision," *Int. J. Optomechatron.* **4**, 65–82 (2010).
14. J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics* (McGraw Hill, 1996).
15. K. Matsushima, H. Schimmel, and F. Wyrowski, "Fast calculation method for optical diffraction on tilted planes by use of the angular spectrum of plane waves," *J. Opt. Soc. Am. A* **20**, 1755–1762 (2003).
16. A. Marian, F. Charri  re, T. Colomb, F. Montfort, J. K  hn, P. Marquet, and C. Depeursinge, "On the complex three-dimensional amplitude point spread function of lenses and microscope objectives: theoretical aspects, simulations and measurements by digital holography," *J. Microsc.* **225**, 156–169 (2007).
17. J. A. Galeano Z., *Position referenced microscopy: microfabricated pseudo-periodic patterns for absolute positioning of specimens with sub-micrometer accuracy*, PhD dissert., Université de Franche-Comté (2010).
18. J. Galeano Zea, P. Sandoz, and L. Robert, "Position encryption of extended surfaces for subpixel localization of small-sized fields of observation," in *Proceedings of IEEE Conference ISOT 2009 on Intern. Symp. on Optomechatr. Tech.* (IEEE, 2009) pp. 21–27.
19. R. J. Hansman, "Characteristics of instrumentation," in *The Measurement, Instrumentation, and Sensors Handbook*, ed. by J. G. Webster (Springer-Verlag, 1999).
20. B. Fadeel and S. Orrenius, "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease," *J. Int. Med.* **258**, 479–517 (2005).
21. H. zur Hausen, "Papillomaviruses in the causation of human cancers: a brief historical account," *Virology* **384**, 260–265 (2009).
22. E. Gaiffe, M. Saunier, S. Launay, P. Oudet, J. L. Prétet, and C. Mougin, "Horizontal transfer of viral oncogenes: An alternative pathway of carcinogenesis," Presented at 25th International Papillomavirus Conference, Malmö, Sweden, 9–14 May 2009.

1. Introduction

Permanent transformation is an intrinsic characteristic of living systems. For example living organisms undergo constant remodeling during their lifetime. These modifications occurring at different scales and at different rates can be linked to physiological (metabolism, development, differentiation or multiplication) or pathological (degeneration, immortalization, transformation) mechanisms. From the point of view of microscopy imaging, in addition to expectations on image quality and definition, this particularity of living bodies sets two complementary requirements on image acquisition durations:

- Image acquisition has to be sufficiently short to avoid blurring effects due to biological mechanisms occurring within the specimen while the image is being recorded.
- Sequences of images have to be recorded over time in order to cover the biological process involved over its whole duration.

To fulfil the first point, many techniques have been developed successfully in recent decades. New techniques or apparatus become progressively reference tools in biology and medical laboratories (for instance) [1–4]. These new methods have also a direct impact on the second point since short acquisition times allow the recording of image sequences at high rate and thus the complete documentation of fast processes. However, very little work has been interested in longer time-constant processes and in the right way to manage living-specimen observations over days or weeks. Nowadays in the field of cell culture, videomicroscopy is used as a reference method. It couples a microscope with an incubation chamber ensuring cell survival by controlling temperature, humidity and CO₂ concentration. For each experiment, this equipment is monopolized during the entire protocol duration for the observation of a single culture dish. A series of sites of interest can however be observed in parallel by means of computer-controlled stages providing micrometer repeatability in lateral specimen positioning.

While videomicroscopy is effective, the exclusive use of expensive equipment for a single experiment is a drawback, especially in the case of slow processes requiring long term observations. An alternative way consists in transferring cell cultures from the cell incubator to the microscope stage for every observation and then to return the specimen to the incubator until the next observation. In this way, the microscope is made available for other users. But a new problem arises: how to localize the same regions of interest every time that the specimen is returned onto the microscope stage? This problematic has been addressed in several ways during the 1980's [5–8] and then at the end of the 1990's [9,10]. All solutions are based on grids suited to partition the specimen surface in labeled sub-surfaces that can be easily identified visually by the operator. These devices allow visual recognition of regions of interest but do not provide accurate position data suitable for precise image registration. More recently, St-Jacques et al. proposed a similar approach in the field of robotics in which a sub-surface label is encoded within the actual width of the grid separations [11].

In a previous paper we introduced a position referencing principle based on a pseudo-periodic position reference pattern (PRP) [12]. The latter is suited for lateral coordinate determination of each recorded image with respect to the sample-holder itself. This principle was demonstrated to provide a high resolution and was applied to cell preparations fixed on a microscope slide. Since position is referenced to the sample holder itself, specimens are not required to remain on the microscope stage and regions of interest can be easily localized from position data. The present paper reports on advances and characterization of the method. The technique is now applied to Pétri culture dishes and actually exploited in live cell culture experiments. In section 2 we briefly recall the PRM principle and present smart Pétri culture dishes integrating a wide PRP. Section 3 reports on positioning capabilities of the developed patterns. We demonstrate improvements in image registration quality in comparison with that allowed by microstage repeatability. Finally Section 4 illustrates a biological application of the method in the frame of experiments intended to document the internalization of apoptotic bodies by human fibroblasts. The method's capabilities to comply with different microscopy modes is thus clearly demonstrated.

2. Position-referenced microscopy (PRM)

In the field of live cell culture, the PRM principle benefits from two complementary properties:

- To survive and proliferate, cells in culture have first to adhere to the culture dish surface. At a given instant in time, it is then equivalent to locate individual cells or their spatial position on the culture dish surface.
- The short depth of focus of optical microscope objectives allows some kind of vertical multiplexing of a biological image with a PRP image.

As shown in Figs. 1(a) and 1(b), the image of the cell culture is obtained as the lens is focused on the upper side of the culture dish surface. This biological image is referenced in position thanks to the recording of a second image, as shown in Figs. 1(c) and 1(d), after vertical shifting of the focusing depth in order to image the PRP. These two levels of imaging are separated by a transparent layer made of bio-compatible polymer (PDMS). The thickness of this layer, i.e. about $40\mu m$ in our case; is adjusted in order to avoid image crosstalk while maintaining an overall thickness that is compatible with the working distance of the lens. A photograph of a smart culture dish that has been developed is shown in Fig. 2. The PRP is first produced by photolithography on a glass coverslip and then covered by the transparent polymer layer. This position-referenced part is finally stuck on the bottom side of usual culture dish that has been previously pierced to minimize the final thickness of the smart culture dish obtained. The

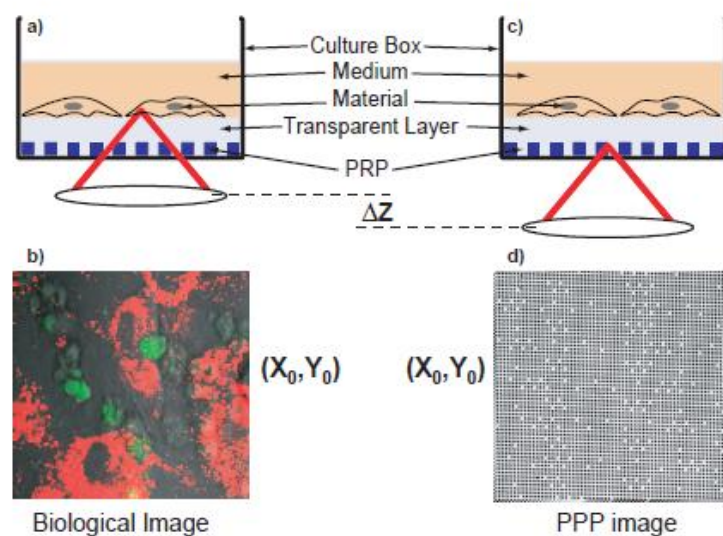


Fig. 1. PRM principle. (a) Focusing on the biological material; (b) Biological image recorded (phase contrast plus confocal fluorescence, see Section 4.2); (c) Focusing on the PRP; (d) PRP image recorded (phase contrast).

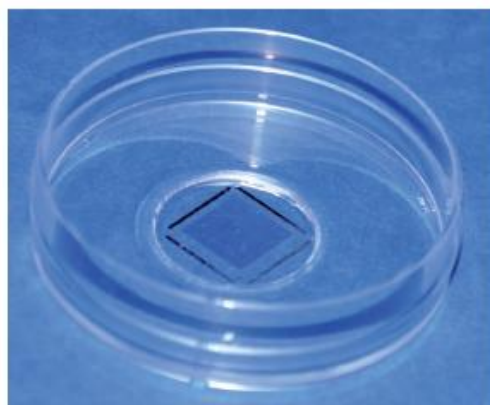


Fig. 2. Photograph of a position-referenced culture box; the patterned coverslip is stuck on the box aperture with bio-compatible polymer.

encoded surface is 1 cm^2 wide and appears as a gray shade within black lines in Fig. 2. This spatial extension defines the size of the area available for PRM applications. The PRP conception as well as the image processing methods used for position reconstruction are described in detail elsewhere [13] and summarized in the following section. Lateral coordinate data obtained from PRP image processing are also valid for the biological image since the only displacement operated between the recording of both images is vertical. Thanks to the PRM principle, any biological image recorded is thus position-referenced with respect to the culture dish. Any position of interest can be found easily at any time; i.e. after several culture dish transfers from the microscope stage to the incubator and vice-versa. Furthermore, recorded images can be registered digitally to be displayed in a common reference system. Image superimpositions with subpixel accuracy can thus be obtained. The latter can be used for reconstructing image sequences or videos presenting the transformations of any region of interest with the same spatial accuracy as if the culture dish had been maintained static on the microscope stage during the whole protocol duration.

3. PRM performances

3.1. Basics of position encryption and reconstruction

The PRP is based on a pseudo-periodic frame of partially reflective spots on a transparent background (Fig. 1(d)) [13]. The periodic frame allows phase measurements; i.e. a fine interpolation of the elementary period of the pattern; that result in high accuracy in position measurement. The periodic frame is however made pseudo-periodic by removing a fraction of the dots in such a way to encrypt the order of each line and column of dots with respect to the top left corner of the PRP. In such a way, 2π phase ambiguities inherent to phase measurements are compensated in an absolute way through the decryption of the missing dot distribution present in each field of observation. Once a local image of the PRP is recorded, its position with respect to the PRP coordinate system is reconstructed in two steps. The first step involves linear phase processing. It allows the sharp localization of the periodic dot distribution with respect to the pixel frame of the recorded image (fine measurement) as well as the in-plane orientation of the view. The second step involves binary image processing. Its aim is to identify the distribution of the missing spots for the determination of the order of the lines and columns under view. This results in a coarse but absolute position measurement. The latter is combined with the fine but relative measurement provided by the phase processing to finally give the fine and absolute position of the zone under view.

3.2. Effect of PRP on light budget

If an inverted microscope is used as described in Fig. 1, the PRP has to be crossed twice in the formation of the biological material image. This section considers the impact of the PRP on the imaging system performance and on the final light budget of PRM. From the point of view of optical wave propagation, the problem consists in determining the disturbances of the point spread function (PSF) observed in the focusing plane that are due to the presence of the PRP. Figure 3(a) represents the intensity distribution of the converging wave in the plane just behind the PRP. In this plane, the optical wave is given by the product of the PRP transparency by usual spherical wave, here with a gaussian intensity distribution. The phase change due to the PRP comes from the coverslip thickness and can be considered to be uniform. The converging wave has thus usual spherical phase distribution associated with an intensity distribution as in Fig. 3(a). The propagation of the altered spherical wave up to the focusing plane has been calculated by using the angular spectrum of plane waves approach in the scalar approximation [14, 15, 17]. A 2D Fourier transform is first applied to the converging beam in the plane just

behind the PRP. The angular spectrum of plane waves is thus obtained. The latter is then propagated up to the focusing plane by applying the appropriate phase changes. Finally, an inverse 2D Fourier transform is performed to obtain the desired PSF.

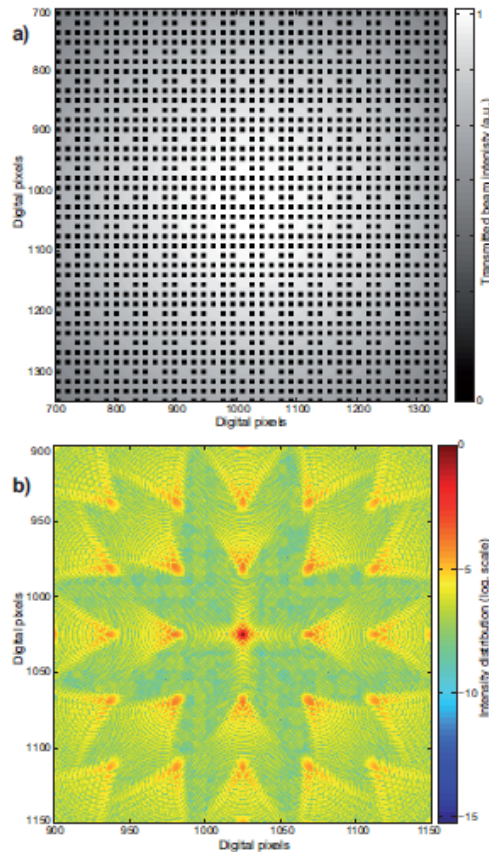


Fig. 3. PRP impact on PSF: (a) converging wave after PRP crossing; (b) computed PSF in the focusing plane in logarithmic scale.

Computations have been performed on digitally generated images of 2048×2048 pixels, with a sampling distance of $0.2 \mu\text{m}$ that avoids aliasing, and for a wavelength of $0.45 \mu\text{m}$. The PRP is made of square dots of $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ with a period of $4 \mu\text{m}$ as used experimentally. Different proportions of absent dots have been considered in order to evaluate the effect of this parameter on the light budget. In Fig. 3(a), only the central part of the converging wave is presented for an improved visualization of the PRP structure. Figure 3(b) presents a typical PSF obtained with a logarithmic scale. As can be expected, secondary focusing spots appear that are distributed along a square grid. These secondary lobes present two drawbacks. Firstly, the light energy diffracted in these lobes is lost for the central part of the PSF. The light budget is therefore decreased. Secondly, these secondary lobes may contribute to ghost images by returning the detector light coming from out of axis specimen points. It is thus of prime importance to reduce the power of these secondary lobes to the minimum in order to avoid these drawbacks. The width of the central lobe of the PSF is not affected by the PRP. This fact can be understood easily since the dot distribution does not modify the numerical aperture of the converging beam.

Table 1. Percentage of Incident Light Power Concentrated in the Central Peak of the Diffraction Pattern in the Focus Plane Versus the Dot Material Transparency and the Proportion of Absent Dots

Dot Transparency	Absent dots				
	1/4	1/9	1/16	1/25	none
100% (no dot)	100%				
95%	98.1	97.7	97.6	97.6	97.5
75%	90.8	89.2	88.6	88.3	87.8
50%	82.2	79.1	78.0	77.5	76.6
25%	73.9	69.5	68.0	67.3	66.1
0%	66.0	60.5	58.6	57.8	56.3
0% - duty cycle: 0.4			76.6		

Computations were performed for different PRP configurations as summarized in Table 1. We observe that for completely opaque dots, the amount of light power concentrated in the central peak of the PSF is only 58.6% with a proportion of one absent dot out of every 16. After a double pass across the PRP, this would correspond to a light budget of only 34.2%. Such a drastic reduction of the light budget is not acceptable, especially in fluorescence microscopy that requires the minimizing of photobleaching. There are two main possibilities for reducing the rate of light loss due to the PRP. The first one is to use semi-transparent dots instead of opaque ones. One can see in the table that the amount of light intensity in the main PSF lobe increases with the dot transparency. A gain of 30%, from 58.6% to 88.6% is observed if the dot transparency is increased to 75%. Such a dot transparency would be easily detected by microscopy systems dedicated to biological samples that are known to produce relatively weak contrasts. A second way of reducing the impact of the PRP on the light budget is to decrease the pattern duty cycle by choosing a smaller dot size. In the last line of the table, with a duty cycle of 0.4; i.e. a dot size of $1.6\mu m$ instead of $2\mu m$, the percentage of light intensity concentrated in the central peak is increased from 58.6% to 76.6%. So, dot transparency and pattern duty cycle are two parameters that can be tuned for improving the overall light budget significantly. If a highly sensitive detection system is used, for instance with a photomultiplier tube in a confocal configuration, both dot transparency and duty cycle can be optimized to maintain the negligible light loss rate. If a less sensitive detection is used, proper imaging of the PRP may require light losses of up to 10% or 20%.

Ghost image formation is not an actual problem. In fact, the amount of light received by each secondary lobe is too small to contribute significantly to the detected image. This is especially true in an inverted configuration in which stray light has to be diffracted twice by the PRP. One may also notice that in fluorescence microscopy, since the diffraction pattern is wavelength dependent, the excitation PSF would be different from the emission one. This slight mismatch would still reduce the probability of stray light detection.

We would like to note that computations summarized in Table 1 have to be considered as orders of magnitude instead of sharp and definitive values since they correspond to specific setup parameters; for instance a numerical aperture of 0.5. For high numerical apertures, the scalar approximation is no longer valid and a vectorial approach is required [16]. Fluctuations of a few percent may thus be observed in the case of large numerical aperture lenses. In experiments presented in the following, we used PRPs produced in our technological facility. They present a dot transparency of about 40% and a duty cycle close to 0.4. They also present some

dot shape irregularities and the overall light budget was evaluated to be 85 % per PRP crossing.

3.3. Positioning performances

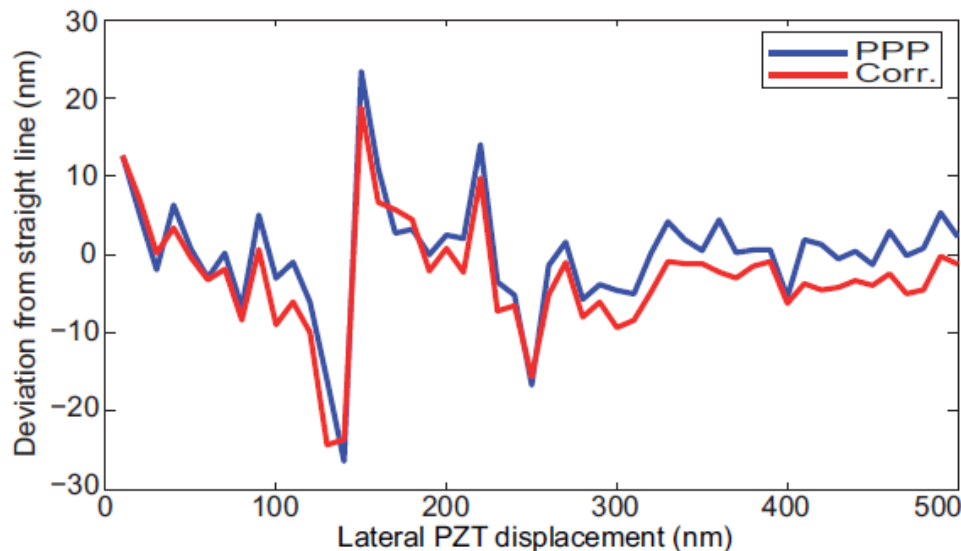


Fig. 4. Deviation of reconstructed PRP positions from a straight line for a linear displacement of 500 nm by the PZT. *blue*: PRP method; *red*: subpixel correlation method. Standard deviation between two curves: 2.5 nm

The method capabilities to provide absolute and high-accuracy in-plane coordinates of the fields of observation from the processing of the PRP images have been demonstrated elsewhere [13, 17, 18]. Resolutions achieved are in the range of a few nanometers for lateral position and of 10^{-3} degree for in-plane orientation. As an illustration, Fig. 4 presents the lateral positions reconstructed by the PRP method in comparison with that reconstructed from a typical image correlation method. In this experiment, the PRP is attached to a (PI P-615) servo-controlled piezoelectric translator (PZT) and observed by means of a $10\times$ magnification objective and a 56 dB CCD camera. The PZT was then shifted by steps of 10 nm over a distance of 500 nm with the recording of an image at each position. This set of images has been processed following the PRP decoding procedure as well as by a subpixel correlation method used as a reference. After subtraction of the mean straight line we obtain the curves presented in Fig. 4. We can see that the two curves suffer from the same distortions, about 50 nm peak to peak. The latter are due to PZT behavior that is unable to achieve the required positions as well as to external mechanical disturbances. In spite of this non-linear PZT displacement, the distance between the two curves remains very small and its standard deviation is only 2.5 nm. From these data the lateral resolution of the PRP method can be estimated to be better than 10 nm by considering the usual 3σ interval [19].

These high accuracy capabilities have been used for the characterization of the performances of the motorized stage (Prio Scientific H117 ProScan) used in our microscopy setup. For this purpose, we chose a set of five reference positions, a few tens of micrometers apart from each other. Then we send a control signal to the stage to rejoin successively every position and to reproduce this cycle 25 times. At each stop, an image of the PRP was recorded and then processed in order to determine the positions actually visited by the motorized stage. Figures 5(a) and 5(b)

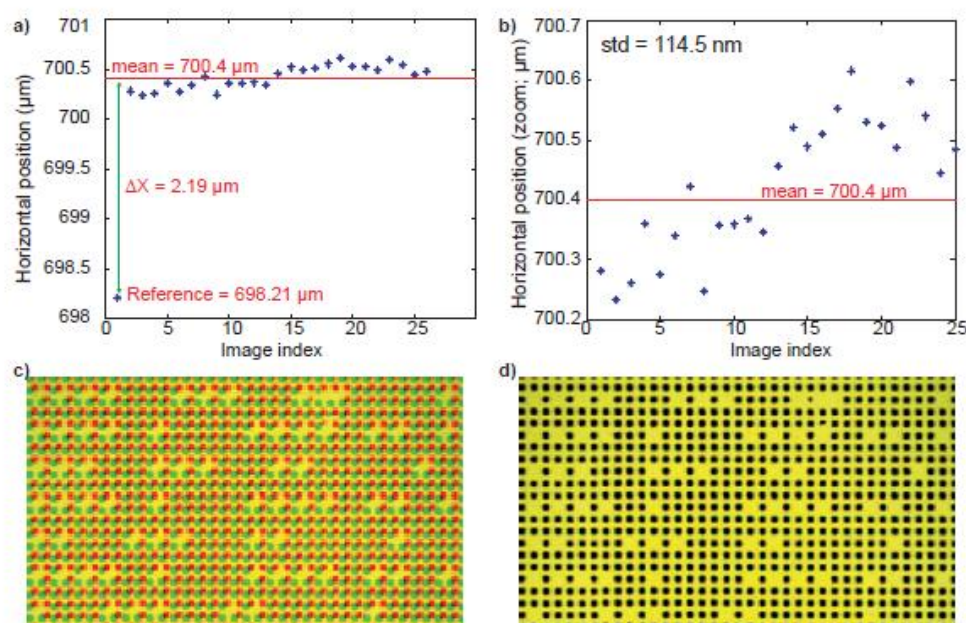


Fig. 5. Characterization of motorized microscope stage capabilities to retrieve a given position. (a) successive stage positions as reconstructed by PRP image processing. (b) same as (a) without reference position. (c) direct superimposition of reference image (red) with the second image (green). (d) same as (c) after image registration from PRP position.

present the results obtained for the first position. The latter are similar to that obtained for the other four reference positions. We can observe that despite quite a good repeatability (Fig. 5(b)), the positions retrieved by the stage are at a distance of more than $2\text{ }\mu\text{m}$ from the expected reference position (Fig. 5(a)). A systematic error thus appears quite clearly. It is significant and may be dependent on the stage motion history. If the image recorded at the reference position is directly superimposed on that recorded after the first cycle, as would be done by using standard video-microscopy methods, we obtain the result presented in Fig. 5(c). The effect of the systematic error appears clearly as severe blurring of the image obtained. However, if PRP data are used for digital subpixel image registration, we then obtain the superimposition shown in Fig. 5(d). In this case the systematic error is compensated for and images can be compared as if no stage displacements had occurred. This capability of PRM to comply with motorized stage limitations and to take them into account for sharp image registration is a second advantage in comparison with usual video-microscopy procedures.

4. Live cell application

4.1. Cell growth observation

PRM has been validated by observing the growth of a live cell culture by means of different microscopy modes. In this experiment, P  tri culture dishes are systematically transferred from the incubator to the microscope stage for every observation and vice-versa after the observation. The zone of interest is easily retrieved by means of PRP data. Furthermore, the highly accurate lateral coordinates obtained are used for image registration. We thus obtain a sequence of images displayed in a common reference system and in which the differences observed are only representative of transformations that have occurred in the cell culture. Figure 6 presents

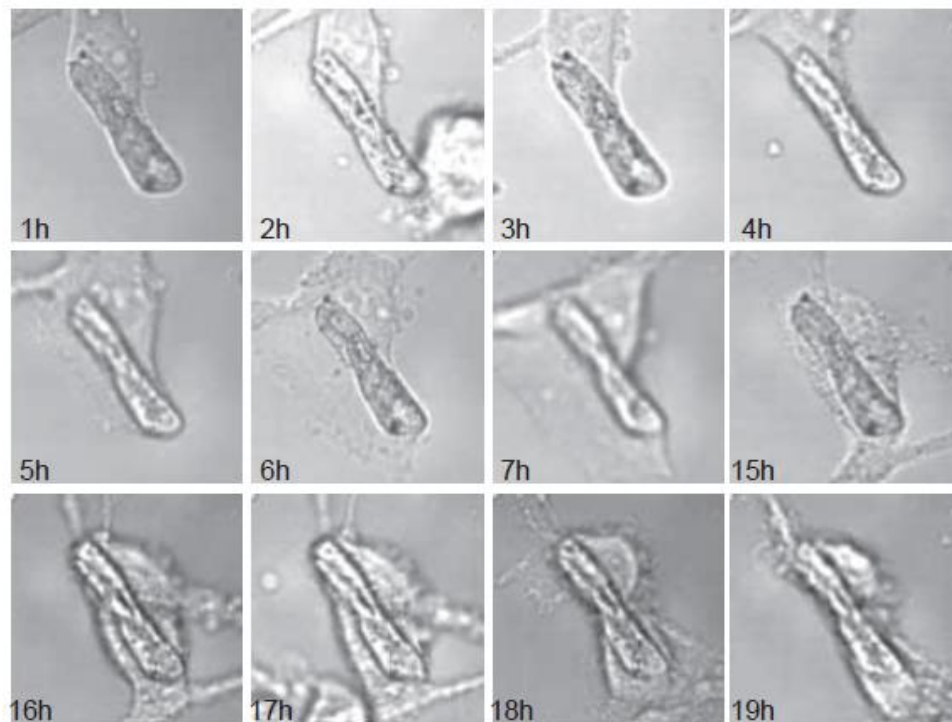


Fig. 6. Evolution of a fibroblast culture as observed by phase contrast microscopy. The chosen zone corresponds to a dust artefact around which cells are transforming. Sequence of images after digital registration by the PRM method. Image size: 120×120 pixels; $48 \times 48 \mu\text{m}^2$; $60\times$ oil lens N.A.=1.42.

such a sequence of images as obtained from a human fibroblast culture observed at time intervals of one hour over two days by phase contrast microscopy. To illustrate PRM capabilities to retrieve a region of interest with high resolution, we made a zoom on a zone in which a dust artefact is stuck on the P  tri dish. This particle appears as a diagonal stick around which cells are proliferating. We can observe that the particle of interest lies at the same image location in all the images while cells take different forms and extensions. One may also notice that PRM is only concerned with lateral positions and remains insensitive to focus adjustments or light intensity fluctuations.

A different zone of that fibroblast culture is presented in the video of Fig. 7 that was obtained by fluorescence confocal microscopy on the same setup. In this case, a CFDA-SE fluorochrom is used for labeling membrane and intracellular proteins of fibroblast cells. The video demonstrates again the ability of PRM to comply with cell culture transfers from cell incubator to microscope stage and to provide high resolution image registrations suitable for live cell culture monitoring.

4.2. Internalization of apoptotic bodies by fibroblasts

Apoptosis is a highly regulated process of cell death and plays a fundamental role in the maintenance of tissue homeostasis in adult organisms. Numerous studies in recent years have revealed that apoptosis is a constitutive suicide programme expressed in most, if not all cells, and can be triggered by a variety of extrinsic and intrinsic signals.

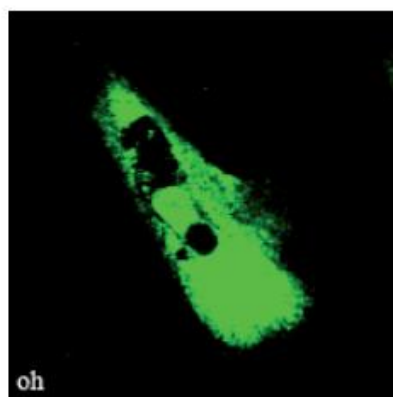


Fig. 7. (Media 1) Video of a fibroblast cell as observed by fluorescence confocal microscopy and after image registration by PRM. Image size: 200×200 pixels; $120 \times 120 \mu m^2$; $20\times$ dry N.A.=0.5.

During the cell death process, the cell undergoes nuclear and cytoplasmic condensation with blebbing of the plasma membrane, and eventually breaks up into membrane-enclosed particles termed apoptotic bodies containing intact organelles, as well as portions of the nucleus. These apoptotic bodies are then rapidly recognized, ingested and degraded by specified phagocytes or neighboring cells [20].

Nonetheless, many studies have suggested that DNA from apoptotic bodies may even be rescued and reused by other cells, in which case we talk about horizontal DNA transfer. In the case that the transferred DNA harbors oncogenes, the recipient cell may become an immortal and transformed cell (cancerous cell).

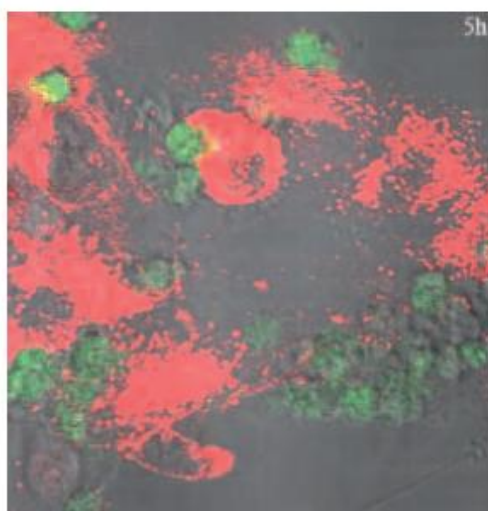


Fig. 8. (Media 2, Media 3) Video of the phagocytosis of an apoptotic body (green) by a fibroblast (red) as observed by fluorescence confocal microscopy and after image registration by PRM. Image size: 290×280 pixels; $116 \times 112 \mu m^2$; $60\times$ oil N.A.=1.42.

Based on these observations, biologists are investigating if this phenomena is also applica-

ble to cervical cancer cells, which is a cancer induced by oncogenic human papillomaviruses [21, 22]. To corroborate this, we used encoded Pétro dishes for monitoring in a same cell the dynamics of apoptotic body internalization by healthy cells. For this purpose, we tracked the cellular evolution of a co-culture of human fibroblast cells with apoptotic bodies. Fibroblast cytoskeleton was labeled with a red dye (PKH26) while in a separate culture dish, apoptotic bodies were labeled with a green dye (CFDA-SE). Then apoptotic bodies were incubated with the fibroblasts for a 24 hours experiment of co-culture with an observation every hour by using the PRM technique. Different sites of interest were documented among which we could observe apoptotic body internalization by a fibroblast cell. The corresponding sequence of images is presented in the video of Fig. 8. This video combines images from confocal fluorescence microscopy of the two dyes with those obtained by phase contrast imaging. We observe significant displacements of the fibroblasts on the Pétro culture dish surface. We can see that all of the apoptotic body (green) adherent to a fibroblast (red) in the upper left part of the first image is progressively internalized within the fibroblast. The appearance of the yellow shade results from red-green combination at the same location. Discussion on the biological significance of this observation is outside the frame of this paper. The important thing here is the new possibility offered by PRM to reconstruct such videos from images registered digitally in a common reference system while obtained after multiple Pétro culture dish transfers from cell incubator to microscope stage.

5. Conclusions

This paper establishes what we call Position-Referenced Microscopy (PRM) as a mature technique for live cell culture monitoring by using various modes of optical microscopy. Proof of principle had been demonstrated previously on a biological specimen fixed on a microscope slide [12]. As described here, smart Pétro culture dishes inserting a PRP allow actual use of the technique in live cell experiments. The size of the encoded area has been extended to 1 cm^2 and the impact of the PRP on the light budget has been evaluated and discussed.

Biological observations allowed by PRM were already possible by monopolizing a video-microscopy equipment. The interest of the method is of practical order since culture dish transfers from microscope stage to cell incubator and vice-versa are now supported without performance deteriorations. Furthermore lateral resolution achieved by PRM is shown to be much better than that proposed by a motorized microscope stage. Unperfect stage displacements are quantified and compensated for with accurate image registration. Finally, live cell culture experiments reported in the paper, especially the internalization of an apoptotic body by a fibroblast, demonstrate the interest of PRM as a useful tool for biomedical research.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Région de Franche-Comté for project funding and for supporting E. Gaiffe's PhD. J.A. Galeano Z. acknowledges the Institut National du Cancer (INCa) for PhD funding.

Conclusion des publications n°2 et n°3

Nous avons désormais un outil de repositionnement géré par des logiciels qui ne nécessitent pas des utilisateurs expérimentés et qui permet l'observation successive d'une même zone. Ce système sera mis à profit pour observer en temps réel des préparations biologiques sans chambre thermostatée, c'est-à-dire, en remplaçant la culture cellulaire dans un incubateur entre chaque temps d'observation. Ce système permet donc de ne pas monopoliser le microscope durant toute la durée de l'expérience. De plus, le repositionnement avec une mire est beaucoup plus précis que celui d'une platine motorisée ce qui permet de faire des observations à l'échelle subcellulaire sans erreurs et de calculer différents paramètres comme une distance ou une vitesse. Enfin, ce référentiel en position permet d'observer plusieurs champs optiques sur la même culture durant la cinétique. En effet, les observations multiples sont permises grâce au calcul automatique des distances séparant chaque champ d'observation.

Cependant, l'utilisation d'une mire comporte quelques inconvénients. Comme la vidéomicroscopie, il est difficile de l'utiliser avec des cellules en suspension ou tout autres éléments sans support. Les temps nécessaires au repositionnement (quelques minutes) ne permettent pas de réaliser des cinétiques courtes (temps minimum entre deux points de cinétique de 30 minutes à 1 heure) pour lesquelles la vidéomicroscopie sera préférée. Enfin si des équipes de recherche sont intéressées par l'utilisation de ce procédé dans leur laboratoire, le logiciel codant pour les interfaces d'utilisation devra être installé sur leur microscope confocal et le logiciel de repositionnement devra être adapté au système d'exploitation de leur platine motorisée.

La mire étant mise au point sur notre microscope confocal et les cellules utilisées par notre équipe étant des fibroblastes adhérents, nous avons pu utiliser ce microsystème pour suivre et caractériser la cinétique et le mécanisme d'internalisation des cellules apoptotiques par les fibroblastes.

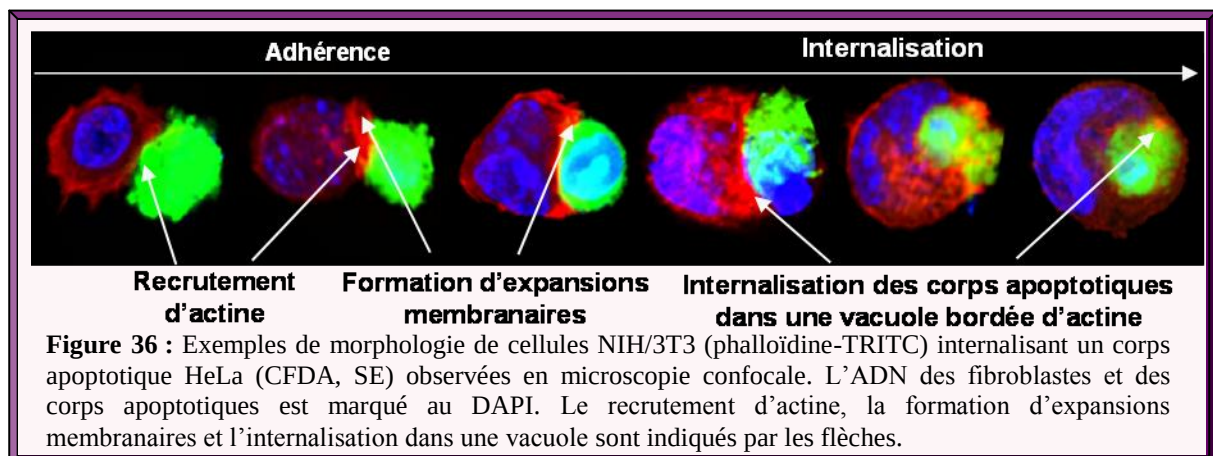
**Mécanisme d'internalisation des cellules
apoptotiques par des fibroblastes primaires humains.**

Mécanisme d'internalisation des cellules apoptotiques

Nous avons démontré que des cellules apoptotiques dérivées de cancer du col de l'utérus abritant un HPV transforment des cellules saines quel que soit leur type (fibroblastes ou kératinocytes) et quelle que soit leur espèce (humaine ou murine) en transférant les oncogènes viraux après leur internalisation. Au cours des derniers mois, nous nous sommes intéressée au mécanisme d'internalisation. Nous présentons ici des résultats préliminaires qui seront approfondis et qui pourront faire l'objet d'une future publication.

I/ Spécificité de l'internalisation

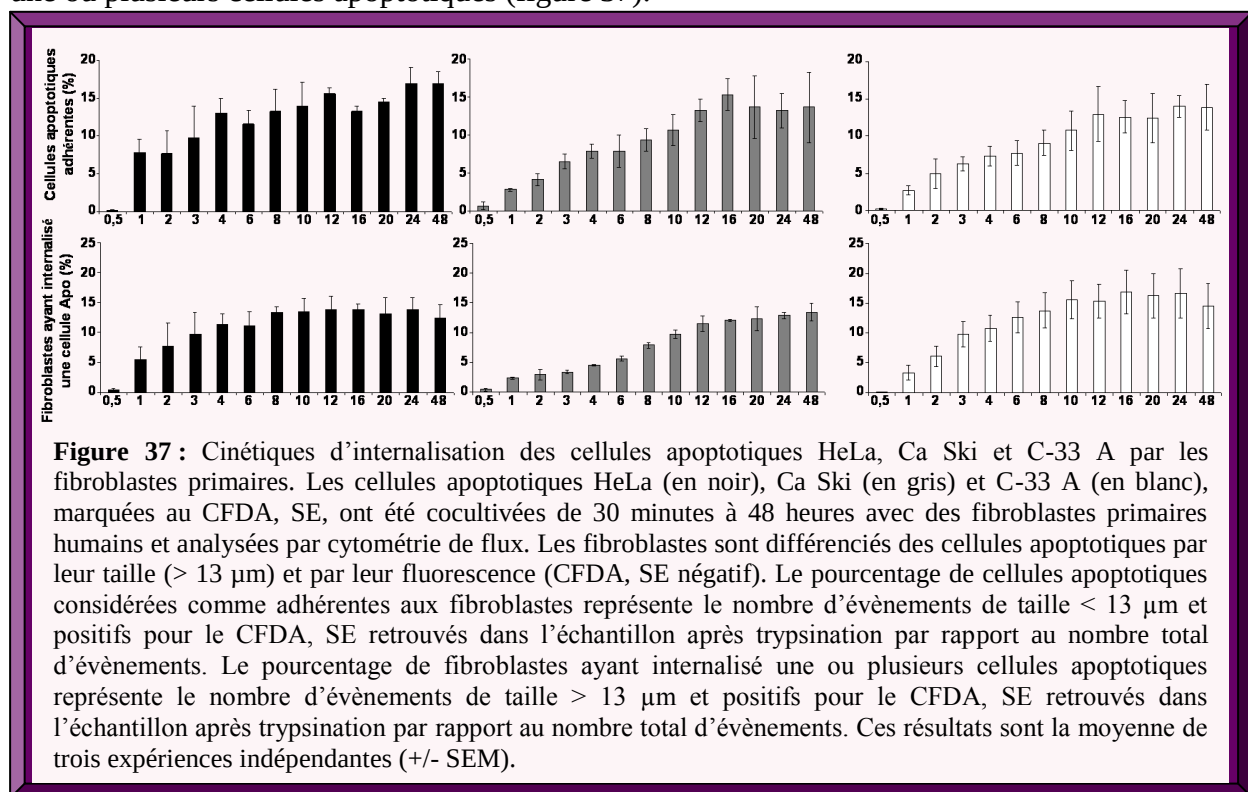
Nous avons montré par microscopie confocale que l'internalisation des cellules apoptotiques par les fibroblastes primaires humains nécessite le recrutement d'actine, la formation d'expansions membranaires interagissant avec la cellule apoptotique et la formation d'une vacuole entourant cette cellule. Afin d'étudier la spécificité de l'internalisation, nous avons aussi réalisé des expériences de coculture de cellules apoptotiques HeLa avec des cellules NIH/3T3 dérivées d'une lignée fibroblastique murine et nous avons observé ces cocultures par microscopie confocale (figure 36).



L'internalisation des cellules apoptotiques par les NIH/3T3 semble similaire à celle des fibroblastes primaires car elle nécessite aussi le recrutement d'actine et la formation d'expansions membranaires se refermant en une vacuole. Ces résultats suggèrent que l'internalisation n'implique pas nécessairement de récepteurs/protéines spécifiques d'une espèce ou alors que ces récepteurs/protéines peuvent présenter des homologies humain/souris.

II/ Cinétiques d'internalisation

Dans notre étude précédente, nous avons constaté que les cellules apoptotiques HeLa, Ca Ski et C-33 A sont internalisées à des taux similaires, alors que seules les cellules apoptotiques HeLa et Ca Ski transforment les cellules receveuses. Bien que nous ayons montré que cette différence semble due à la présence d'HPV dans les cellules apoptotiques transformantes, nous avons voulu vérifier s'il y avait des différences dans les cinétiques d'incorporation des cellules apoptotiques issues des trois lignées par les fibroblastes primaires en cytométrie en flux. Nous avons étudié deux paramètres : le pourcentage de cellules apoptotiques adhérentes aux fibroblastes et le pourcentage de fibroblastes ayant internalisé une ou plusieurs cellules apoptotiques (figure 37).

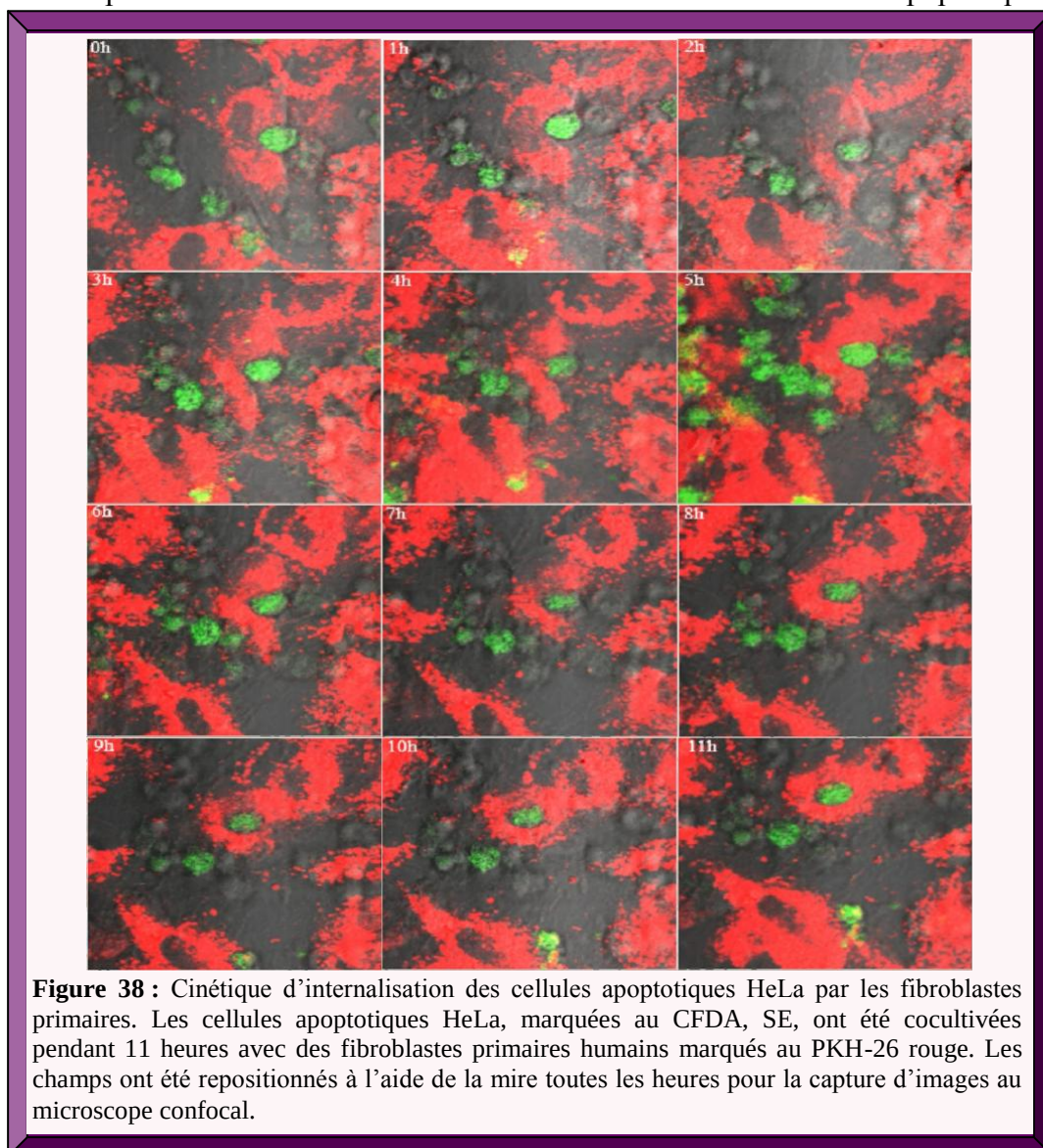


Comme pour les cellules HeLa et Ca Ski, l'adhérence et l'internalisation des cellules C-33 A commence dès 30 minutes. L'internalisation est maximale pour les trois types cellulaires après 8 à 12 heures de coculture et ne varie plus jusqu'à 48 heures tout comme l'adhérence.

Nous avons ainsi montré que le mécanisme d'internalisation est indépendant des caractéristiques intrinsèques de chaque type de cellules apoptotiques et que la transformation serait probablement due à la présence de séquences d'HPV. De plus, les cinétiques d'internalisation atteignent un plateau entre 8 et 12 heures de coculture. Cette durée

d'internalisation concorde avec les données de la littérature concernant le temps nécessaire à la phagocytose ou à la macropinocytose par les cellules non spécialisées. Cette durée est supérieure à celle qui serait nécessaire à l'endocytose dépendante des clathrines ou des cavéoles qui est de l'ordre de quelques minutes [Parnaik 2000, Kaksonen 2006, Conner 2003].

Afin de confirmer ces résultats, nous avons suivi l'internalisation des cellules apoptotiques en temps réel. Nous avons utilisé le système de repositionnement intégré ou mire précédemment décrit. Les cellules apoptotiques HeLa ont été marquées au CFDA, SE et les fibroblastes primaires humains au PKH 26 rouge (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker, Sigma), marqueur aspécifique qui se fixe aux lipides membranaires et qui permet de marquer des cellules vivantes. Les cellules ont été photographiées toutes les heures pendant 11 heures (figure 38). Le repositionnement des images prises à chaque temps grâce à la mire référencée en position a permis de créer un film montrant l'internalisation de la cellule apoptotique.



Les observations à l'aide du repositionnement indiquent que les cellules apoptotiques sont internalisées par les fibroblastes après plusieurs heures de contact (6 à 7 heures) par un processus durant au moins deux heures comme décrit par les travaux de Parnaik [Parnaik 2000]. Nous avons observé à nouveau le recrutement d'actine et la formation d'expansions membranaires se refermant en une vacuole, caractéristiques morphologiques spécifiques du mécanisme de phagocytose [Swanson 2008].

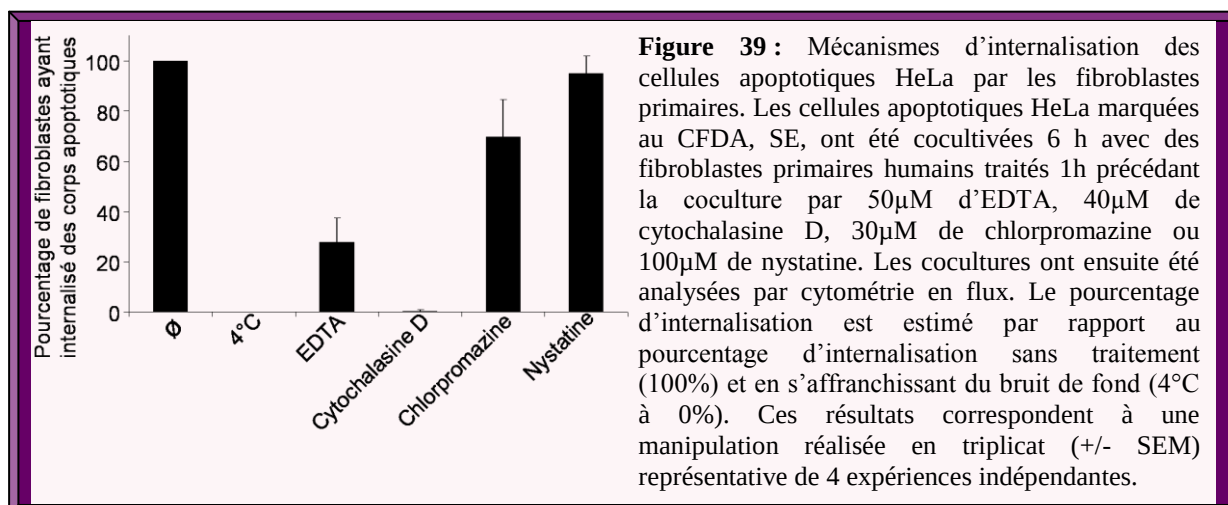
III/ Etude du mécanisme d'internalisation

Plusieurs mécanismes peuvent aboutir à l'internalisation d'un élément : la phagocytose, la macropinocytose, l'endocytose dépendante des clathrines et l'endocytose dépendante des cavéoles. La littérature décrit l'internalisation des cellules apoptotiques par des cellules phagocytaires spécialisées ou non en impliquant le mécanisme de phagocytose et dans certains cas le mécanisme de macropinocytose [Dini 1995, Hall 1994, Ogden 2001].

Au cours de nos travaux, nous avons constaté que l'internalisation des cellules apoptotiques dans les fibroblastes impliquait un mécanisme actif car il est inhibé à 4°C (publication n°1). En effet, les températures basses inhibent l'internalisation nécessitant de l'énergie (ATP). Tous les mécanismes d'endocytose sont ainsi bloqués car l'ATP est nécessaire aussi bien à la reconnaissance de la cellule apoptotique par les récepteurs qu'à la formation des différentes vacuoles. Nous avons donc recherché lequel ou lesquels de ces mécanismes actifs étaient impliqués dans l'internalisation des cellules apoptotiques par les fibroblastes. Afin de limiter du bruit de fond dû à l'internalisation non active (non inhibée à 4°C), représentant probablement une fluorescence aspécifique, nous avons soustrait le pourcentage d'internalisation non actif pour chaque condition et estimé l'internalisation en absence de drogue à 100%.

Nous avons réalisé une coculture de cellules apoptotiques HeLa marquées au CFDA, SE avec des fibroblastes primaires humains pendant 6 heures à 37°C ou 4°C et en présence ou non d'EDTA, de cytochalasine D, inhibiteur de la polymérisation d'actine et donc de la phagocytose, de chlorpromazine qui inhibe le recrutement des molécules de clathrine permettant l'endocytose ou de nystatine qui inhibe la formation des cavéoles (figure 39) [Ivanov 2008]. L'EDTA, un chélateur d'ions bivalents tels que le calcium (Ca^{2+}) ou le magnésium (Mg^{2+}) peut inhiber chacun des mécanismes d'endocytose car le calcium est nécessaire à l'interaction ligand/récepteur à l'origine de la reconnaissance de la cellule

apoptotique (telles que les phosphatidylsérines et leurs récepteurs) et à la polymérisation de l'actine permettant la formation des vacuoles d'endocytose.



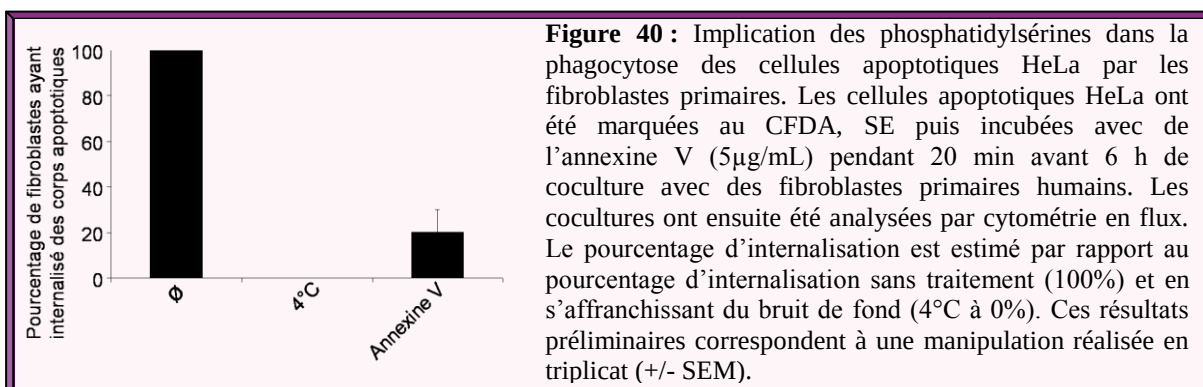
La formation d'expansions membranaires se refermant en vacuoles autour de la cellule apoptotique, observée aussi bien avec des FPH (publication n°1) que des NIH/3T3, nous a orienté vers un mécanisme de phagocytose impliquant le réseau de microfilaments d'actine. Conformément à nos attentes seules les conditions à 4°C, en présence d'EDTA ou de cytochalasine D permettent une inhibition de l'internalisation alors que la chlorpromazine ou la nystatine restent sans effet significatif suggérant que le mécanisme principal d'internalisation des cellules apoptotiques est la phagocytose.

La faible inhibition observée avec la chlorpromazine (30% +/- 7) est probablement due aux effets secondaires de cette drogue qui a tendance à induire la mort des fibroblastes à forte dose. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que certaines cellules apoptotiques de petites tailles puissent être internalisées par un mécanisme d'endocytose à clathrine.

IV/ Etudes des molécules impliquées dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par les fibroblastes

Nous nous sommes ensuite intéressée à l'identification des molécules permettant la reconnaissance des cellules apoptotiques par les fibroblastes et permettant la signalisation d'induction de la phagocytose. Les cellules apoptotiques étant phagocytées par les fibroblastes primaires, les phosphatidylsérines présentes sur les cellules apoptotiques pourraient être impliquées dans leur reconnaissance et leur internalisation [Fadok 1992]. Afin de vérifier cette hypothèse, des cocultures ont été réalisées comme précédemment avec ou sans incubation préalable des cellules apoptotiques avec de l'annexine V qui est une protéine

se fixant spécifiquement aux phosphatidylsérines des cellules apoptotiques, empêchant leur reconnaissance par leurs récepteurs spécifiques de la membrane de la cellule receveuse (figure 40).



La neutralisation des phosphatidylsérines par l'annexine V entraîne une diminution de la phagocytose de 80% +/- 1 montrant l'implication des phosphatidylsérines et de leurs récepteurs correspondants présents sur les fibroblastes.

La phagocytose des cellules apoptotiques par des cellules non spécialisées implique donc des récepteurs aux phosphatidylsérines. Nous avons par conséquent recherché chez les fibroblastes humains l'expression de récepteurs connus pour être présents dans les phagocytes spécialisés tels que BAI-1, stabiline 2, TIM1 et TIM4. Cette partie des travaux a été réalisée par une étudiante de l'école de l'INSERM, Charlotte Dollat, que nous avons co-encadrée en partenariat avec l'équipe INSERM UMR645, dirigée par le Professeur Philippe Saas.

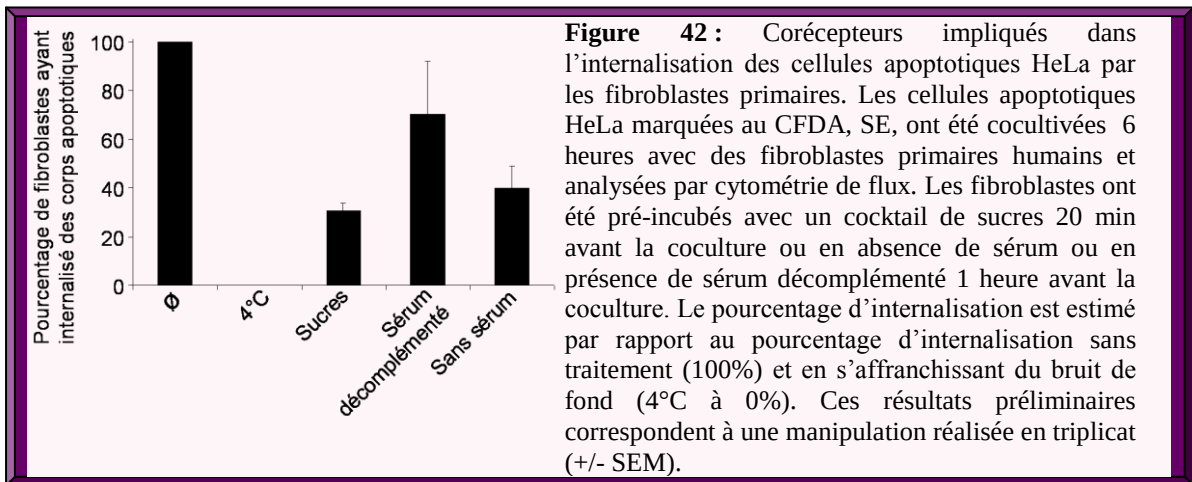
Nous avons extrait l'ARN des fibroblastes comme décrit dans la publication n°1. La « reverse transcription » a été réalisée à l'aide d'un mélange commercial, « High Capacity RNA-to-DNA Master Mix » (Applied Biosystems). Chaque PCR a été réalisé à l'aide d'Assay On Demand (AOD, Applied Biosystems). Les références des AOD ciblant BAI-1, la stabiline-2, TIM-1 et TIM-4 sont respectivement Hs01105174, Hs00213948, Hs00273334 et Hs00293315. Par ailleurs, la PCR de normalisation ciblant Abl est effectuée à partir des amorces Abl F (5'- TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT-3') et Abl R (5'- GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3'). Les 4 RT-PCR ont été aussi réalisées sur l'ARN de cellules phagocytaires spécialisées, monocytes et cellules dendritiques, fournis par l'UMR645. Les résultats sont présentés dans la figure 41.

	BAI-1	Stabiline-2	TIM 4	TIM 1	Abl
Fibroblastes	+	Limite	Limite	-	+
	(34,44 +/- 1,69)	(38,02 +/- 0,61)	(36,29 +/- 1,22)	-	(23,52 +/- 2,16)
Monocytes	+	-	+	Limite	+
	(35,20 +/- 0,50)	-	(33,52 +/- 0,06)	(38,51 +/- 0,07)	(29,94 +/- 0,31)
MoDC	+	+	+	-	+
	(35,73 +/- 0,13)	(33,72 +/- 0,15)	(36,29 +/- 1,22)	-	(23,52 +/- 2,16)

Figure 41 : Détection des ARNm codant les récepteurs aux phosphatidylsérines par RT-PCR dans des fibroblastes humains, des monocytes et des cellules dendritiques monocytoïdes (MoDC). La présence ou l'absence de bandes est notée + ou – respectivement. La détection qualitative est considérée comme limite si les différents Cp obtenus sont supérieurs à 37. Les ARN Abl sont utilisés comme transcrits de référence. Les expériences ont été réalisées 6 fois en duplicat. La moyenne des Cp obtenus est indiquée entre parenthèses.

Les fibroblastes expriment le récepteur BAI-1 à un taux similaire aux cellules spécialisées dans la phagocytose (monocytes et cellules dendritiques). Les ARNm de récepteurs stabiline-2 et TIM-4, exprimés par les macrophages sont présents à un faible taux dans les fibroblastes [Miyanishi 2007b]. Les ARNm codant le récepteur TIM 1 ne sont pas détectés dans nos cellules. Le récepteur BAI-1 pourrait être un bon candidat impliqué dans la phagocytose des cellules apoptotiques par les fibroblastes primaires humains. Une inhibition spécifique de ce récepteur ou une inhibition de son expression confirmerait son rôle dans le THG.

La phagocytose par des cellules non spécialisées diffère en partie de celle des cellules spécialisées dans la reconnaissance de la cellule apoptotique par l'importance des récepteurs ou corécepteurs autres que ceux des phosphatidylsérines. Nous avons alors testé l'implication d'un récepteur des fibroblastes décrit comme jouant un rôle dans leur phagocytose : le récepteur CD91 couplé à la calréticuline, qui reconnaît les sucres exposés à la surface de la membrane plasmique des cellules apoptotiques, reconnaissance facilitée par certaines protéines présentes dans le sérum (dont la protéine S) et des facteurs du complément, dont le facteur C1q [Dini 1995, Hall 1994]. Comme précédemment, nous avons réalisé une coculture de cellules apoptotiques HeLa marquées au CFDA, SE avec des fibroblastes primaires humains pendant 6 heures à 37°C, 4°C, et en pré-incubant ou non les fibroblastes avec un cocktail de sucres constitué de mannose, de galactose et N-acétylglucosamine à 5 mM. Le rôle des protéines du sérum et du complément a été évalué respectivement en cultivant les fibroblastes en absence de sérum ou avec du sérum décomplémenté. Les résultats sont présentés dans la figure 42.



Le récepteur CD91/calréticuline semble jouer un rôle important dans la phagocytose des cellules apoptotiques par les fibroblastes car le cocktail de sucres diminue la phagocytose de 70% +/- 3,5. Les protéines du sérum et du complément sont impliquées dans la phagocytose toutefois l'internalisation en présence de sérum décomplémenté ou en absence de sérum n'est diminuée que de 30 et 60% respectivement. Ces résultats seront à confirmer. Par ailleurs, d'autres molécules comme le MFG-8 liant les récepteurs à la vitronectine présente sur les cellules receveuses et l'annexine I devront être testées car elles ont été aussi décrites dans l'internalisation des cellules apoptotiques par les fibroblastes [Hall 1994, Savill 2007, Fan 2010].

V/ Conclusion

L'internalisation des cellules apoptotiques par les fibroblastes aboutissant à leur transformation par THG implique un mécanisme de phagocytose *via* les récepteurs aux phosphatidylsérines, en particulier le récepteur CD91 et probablement le récepteur BAI-1. De plus, certains cofacteurs qui facilitent la reconnaissance de CD91 à ses ligands, comme les facteurs du complément et certaines protéines du sérum semblent aussi impliqués dans ce processus.

Discussion et Perspectives

Discussion et perspectives

Les HPV à haut risque sont des acteurs essentiels de la transformation des cellules épithéliales du col de l'utérus mais aussi de cellules épithéliales de l'anus ou de l'amygdale. Les oncoprotéines d'HPV, surexprimées après intégration de l'ADN viral dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte, agissent à chaque étape de la transformation cellulaire. La cellule tumorale se divise et transmet aux cellules filles les informations génétiques et épigénétiques à l'origine du phénotype tumoral. Le transfert vertical d'oncogènes est à la base du développement d'une tumeur maligne.

L'ensemble de nos travaux tend à démontrer l'existence d'une voie alternative à la transformation de cellules saines à côté de la voie classique de carcinogenèse associée aux HPV. Ainsi des cellules apoptotiques dérivées d'un cancer du col de l'utérus sont capables de conserver un potentiel oncogénique et de transformer des cellules normales après leur phagocytose par ces dernières. Les cellules nouvellement transformées abritent alors des séquences d'oncogènes viraux transférées par les cellules cancéreuses donneuses. Ces résultats suggèrent qu'un nouveau mécanisme de carcinogenèse associée à des virus oncogènes infectant l'espèce humaine existe (figure 43).

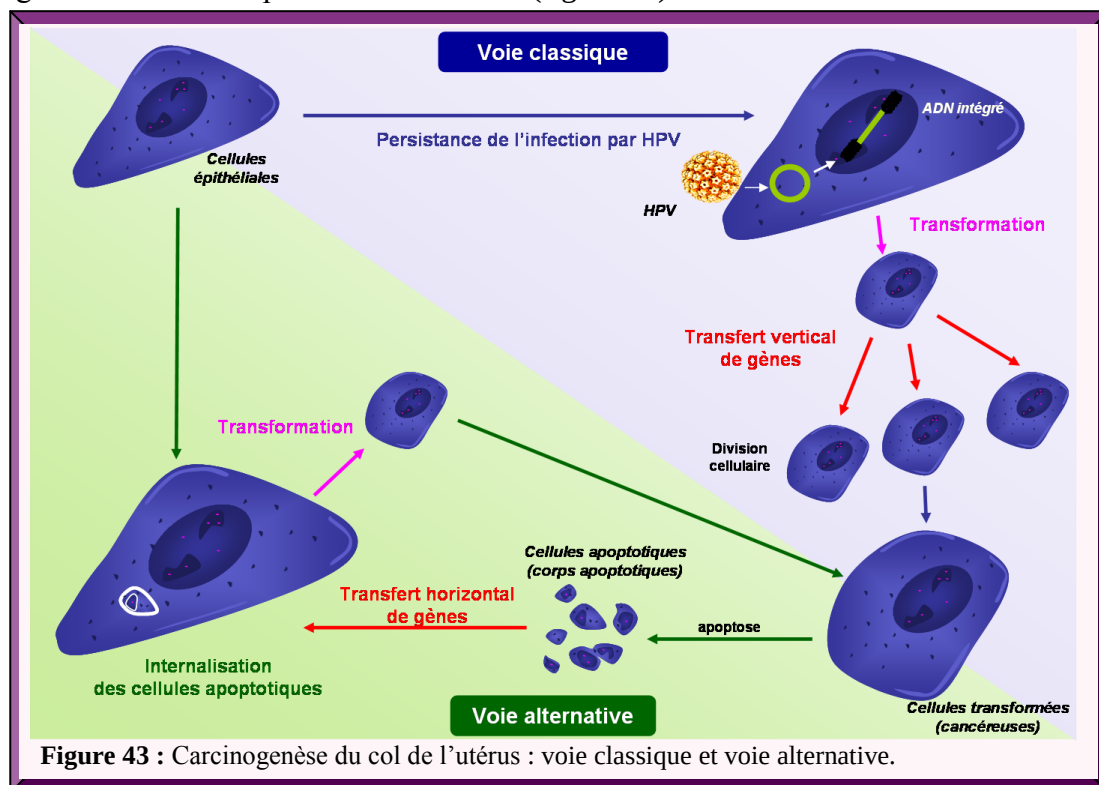


Figure 43 : Carcinogenèse du col de l'utérus : voie classique et voie alternative.

La transformation par transfert de gènes a été démontrée en 2001 par les travaux de Bergsmedh et coll. [Bergsmedh 2001]. Leur modèle d'étude, utilisant des cellules apoptotiques issues de cellules transformées exprimant les oncogènes c-myc et H-ras^{V12}, a permis de démontrer que le THG et la transformation par transfert d'oncogènes sont régulés par des voies de signalisation impliquant la protéine p53 dans la cellule receveuse. Ainsi, les auteurs sont parvenus à transformer uniquement des cellules receveuses déficientes en p53 (p53^{-/-}) [Holmgren 2010].

De plus, la transformation par THG démontrée par Bergsmedh et coll. a lieu entre des cellules murines, ne permettant pas de confirmer si un tel THG pouvait conduire à des résultats similaires dans des cellules humaines. S'il est démontré qu'un stress oncogénique aboutit à l'activation de la voie p53 par la protéine ARF chez la souris (p19^{ARF}) comme chez l'Homme (p14^{ARF}), les protéines c-myc et H-Ras mutée n'induisent pas la même réponse cellulaire au stress oncogénique car la transfection des oncogènes codant ces protéines permet la transformation des cellules murines mais pas des cellules humaines [Land 1983, Hahn 1999]. Il apparaît que l'expression de gènes « tumoraux » est mieux contrôlée dans les cellules humaines que dans les cellules murines, montrant l'importance d'étudier la transformation par THG dans un modèle utilisant des cellules d'origine humaine.

Plus récemment, cette même équipe a réussi à contourner le mécanisme de contrôle passant par p53 par transfert horizontal de l'oncogène viral SV40LT conjointement aux oncogènes *H-ras*^{V12} et *c-myc* [Ehnfors 2009]. L'importance de la protéine p53 a ainsi été confirmée et la possibilité de contourner ce mécanisme prouvée. Toutefois, la protéine SV40LT utilisée pour inactiver la voie p53, est, comme son nom l'indique, un virus simien qui n'infecte pas les souris donc éloigné du modèle cellulaire utilisé par les auteurs.

L'originalité de nos travaux repose sur deux particularités de notre modèle. Nous avons utilisé des cellules donneuses issues d'un cancer du col de l'utérus humain et des fibroblastes receveurs extraits à partir de fragments de peau humaine, prouvant que la transformation par THG est possible entre cellules humaines. Par ailleurs, comme Ehnfors et coll., nous avons démontré que la transformation de la cellule receveuse est possible après l'inhibition de la voie p53 par un virus à haut risque oncogénique. En l'occurrence, notre modèle comporte des cellules donneuses abritant des séquences d'HPV, naturellement impliquées dans la tumorigenèse de cellules humaines, notamment les oncogènes E6 d'HPV 16 et d'HPV18. Ainsi notre modèle se rapproche des conditions physiopathologiques d'un environnement tumoral chez l'humain.

Par ailleurs, les cellules apoptotiques utilisées dans nos expériences dérivent de cellules qui ont été transformées *in vivo*, suite à une infection naturelle par HPV et à l'intégration de son génome au sein du génome de la cellule donneuse. Ainsi, aucune modification n'a été réalisée sur les cellules donneuses, ni sur les cellules receveuses permettant de limiter les biais dus aux manipulations génétiques. Par exemple, les plasmides de part leurs structures et leurs fonctions sont plus facilement intégrées au génome des cellules. Leur utilisation dans des expériences de THG pour introduire un oncogène dans les cellules donneuses peut favoriser l'intégration du gène transféré au génome de la cellule receveuse. De plus, il a été démontré que les séquences activatrices d'un gène transfecté peuvent facilement réguler un autre gène co-transfecté multipliant les risques de biais dans l'expérience [Ishikawa 2004].

Nos résultats, nous ont permis d'émettre l'hypothèse d'un rôle clef d'HPV dans la transformation des cellules receveuses. Contrairement aux cellules apoptotiques issues des lignées de cancer du col de l'utérus abritant des HPV (Ca Ski HPV 16+, HeLa HPV 18+), les cellules apoptotiques C-33 A, issues d'une lignée de cancer du col de l'utérus dépourvue de séquences d'HPV, ne permettent pas la transformation de cellules receveuses. Le taux d'internalisation des cellules apoptotiques par les fibroblastes étant similaire quelle que soit la lignée d'origine des cellules apoptotiques, la capacité ou l'incapacité à transformer les fibroblastes receveurs ne sont vraisemblablement pas liées à l'internalisation des cellules apoptotiques. Une des différences majeures entre ces trois lignées cellulaires réside en la présence ou non de séquences d'HPV intégré, favorisant l'hypothèse de l'implication des séquences virales.

Les expériences d'hybridation *in situ* démontrent le transfert effectif de séquences d'ADN HPV, à partir des cellules apoptotiques Ca Ski et HeLa, et précisent leur localisation dans le noyau des cellules receveuses, suggérant leur intégration au matériel génétique de la cellule receveuse. Cette hypothèse, qui pourra être vérifiée par cytogénétique, est confortée par les travaux de Bergsmedh, qui a observé par l'analyse FISH des cellules receveuses en métaphase, l'intégration des séquences transférées dans les chromosomes de la cellule hôte [Bergsmedh 2001, Bergsmedh 2002]. De plus, la présence des oncogènes E6 d'HPV 16 et 18 dans les fibroblastes transformés, détectée par PCR, ainsi que la présence de leurs ARN messagers, détectée par RT-PCR (Reverse transcriptase-PCR), confirme le transfert de séquences virales fonctionnelles pouvant être responsables de la transformation des cellules receveuses. Afin de s'assurer de la dépendance aux oncogènes viraux dans la transformation des fibroblastes,

l'utilisation d'adénovirus abritant la séquence codant E2, une protéine inhibant l'expression de E6 et E7, ou de siRNA dirigés contre l'ARN codant E6 et E7 serait nécessaire (collaborations prévues avec Dr C. Demeret, Institut Pasteur, Paris et Dr F Deryckère et Dr. M Masson, ESBS, Strasbourg). Si la transformation des fibroblastes est liée à E6, son inhibition dans ces cellules doit provoquer un arrêt du cycle cellulaire, induire leur sénescence puis leur apoptose.

L'expression d'E6 des HPV à haut risque qui induit la dégradation de la protéine p53 par le protéasome, permet vraisemblablement d'abroger le mécanisme de contrôle de la cellule hôte abritant une p53 sauvage et fonctionnelle. Notre hypothèse est confortée par la non détection de la protéine p53 et de sa cible p21 dans les fibroblastes transformés. E6 est capable de favoriser la transformation en inhibant aussi l'apoptose dépendante de p53 aussi bien par la voie des récepteurs de mort que par la voie mitochondriale [Filippova 2002, Filippova 2004, Thomas 1998].

D'autres oncogènes d'HPV pourraient avoir un rôle dans le contournement de la voie de régulation de la transformation par THG. Les protéines E7 d'HPV 16 et 18 qui ont la propriété d'induire la dégradation de p105^{Rb} comme la protéine SV40LT pourraient empêcher une voie d'activation de p53 alternative induite par un stress oncogénique passant par l'activation de p16^{INK4a} et reliée à p53 par p14^{ARF} [Sherr 2000]. La présence de l'ADN et de l'ARN de E7 dans les fibroblastes transformés devra être vérifiée, dans la poursuite de ces travaux, ainsi que la disparition de sa protéine cible p105^{Rb} comme cela a été fait pour E6 et p53.

Les expériences de Bergsmedh ont réfuté l'implication de p19^{ARF} dans la régulation de la transformation par THG car l'utilisation de cellules receveuses p19^{ARF}^{-/-} dans les cocultures avec des cellules apoptotiques contenant *c-myc* et *H-ras*^{V12} n'ont pas permis la transformation des cellules receveuses [Bergsmedh 2002]. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure i) que des voies de régulation, autres que celles passant par p19^{ARF} puissent être activées par un stress oncogénique tel que la voie passant par la protéine p16^{INK4a}, et ii) que les oncogènes transférés, avant de pouvoir transformer la cellule receveuse, soient reconnus par celle-ci comme de l'ADN fragmenté qui déclenche la voie des dommages à l'ADN passant par la voie ATM/Chk2 induisant un arrêt de cycle chez la cellule receveuse. Dans notre modèle, E7 inactivant p105^{Rb}, pourrait favoriser l'arrêt de cycle en G1/S en association avec l'inhibition de p53 par la protéine E6 [Frolov 2004].

Certaines caractéristiques tumorales observées dans nos fibroblastes transformés pourraient être dues à l'action combinée des oncoprotéines virales E6 et E7 comme la prolifération aberrante (20 fois plus rapide que celle des fibroblastes primaires) [Munger 2004]. Cette hypothèse sera confirmée par l'inhibition de E6 et E7 par des adénovirus contenant le gène codant pour E2 et par des siRNA dirigés contre E6 et contre E7. L'utilisation de cellules donneuses C-33 A transduites à l'aide de vecteurs rétroviraux exprimant E6 et E7 devrait transformer les cellules receveuses. Les gènes viraux apportés en trans inhiberaient la voie p53 après leur transfert horizontal. De plus, l'utilisation d'autres modèles de cellules tumorales infectées par des virus dérégulant les voies p53 et p105^{Rb} comme les polyomavirus des cellules de Merkel devrait permettre la transformation de cellules receveuses (collaboration prévue avec Dr P. Coursaget, INSERM U618, Tours).

Une autre caractéristique de la transformation tumorale est l'acquisition d'une aneuploïdie [Duesberg 2004]. Nous avons constaté que la teneur en ADN des fibroblastes transformés par THG est aneuploïde, une caractéristique de la plupart des cancers chez l'Homme [Hanahan 2000, Bardelli 2001, Lengauer 1998, Rajagopalan 2004]. L'instabilité génomique décrite dans les lésions précancéreuses associées aux HPV à haut risque a été attribuée à l'effet synergique des protéines E6 et E7 (pour revue [zur Hausen 2002]). Ces deux oncoprotéines peuvent induire de l'instabilité génomique dans les cellules humaines normales, en provoquant des erreurs de duplication de l'ADN lors des divisions cellulaires et en inhibant les points de contrôle du cycle cellulaire [White 1994, Duensing 2004, Thomas 1998]. Une analyse des caryotypes des fibroblastes transformés est en cours et apportera des informations supplémentaires concernant les anomalies quantitatives et structurales des chromosomes.

La tumorigénicité des cellules transformées doit être évaluée. Nous injecterons des fibroblastes transformés par voie sous-cutanée à des souris nude. Nous mesurerons la croissance tumorale, les modifications morphologiques et l'activité mitotique des cellules transplantées. Ceci nous permettra de démontrer que certaines caractéristiques de cellules transformées (cellules HeLa ou Ca Ski dérivées de cancers du col de l'utérus) ont été conservées.

Même si le transfert des oncogènes d'HPV a été clairement identifié, il n'est pas exclu que d'autres oncogènes présents dans les cellules tumorales puissent être impliqués dans la transformation cellulaire.

In vitro, les cellules immortalisées par les oncogènes E6 et E7 des HPV à haut risque ne sont pas tumorigènes et d'autres événements oncogéniques permettent une transformation

complète. Dans le processus de carcinogenèse classique du col de l'utérus, il a été montré que c-myc, H-ras et c-fos sont impliqués dans l'immortalisation/transformation en association avec les oncogènes d'HPV [DiPaolo 1989, Slagle 1998, Wentzensen 2004]. Ces oncogènes cellulaires sont indispensables pour surmonter complètement la fonction anti-oncogénique de la voie p53 et aboutir au développement d'un cancer du col de l'utérus. De façon intéressante, le gène c-myc est très fréquemment surexprimé dans les cancers du col de l'utérus et dans des lignées cellulaires de carcinome, en particulier la lignée cellulaire HeLa [Couturier 1991, Durst 1987, Wentzensen 2004]. Le risque de rechute de la maladie est associé à la surexpression de cet oncogène. Par conséquent, nous ne pouvons pas exclure la participation de cet oncogène à la transformation de nos cellules. Néanmoins, le transfert des oncogènes d'HPV pourrait avoir un rôle plus important que celui considéré, car l'expression de l'oncogène E6 d'HPV16 dans les cellules C-33 A HPV négatives leur confère un phénotype plus agressif comme le montre leur résistance aux radiations dans des tumeurs transplantées [Hampson 2001].

Une analyse transcriptomique et protéomique permettra de mieux connaître les altérations génétiques à l'origine de la transformation des fibroblastes (collaboration en cours avec la plateforme Biopuces et transcriptome, Illkirch et la plateforme CLIPP, Dijon).

La progression tumorale provient non seulement de la coopération entre les cellules au sein de la tumeur mais aussi de la relation avec les cellules des tissus environnants, telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales [Hanahan 2000, Liotta 2001]. Des études ont montré que des changements dans le comportement de la niche stromale peuvent promouvoir la transformation épithéliale en sécrétant des facteurs de croissance ou des molécules chimiotactiques [Olumi 1999]. De plus, des mutations génétiques dans les cellules stromales sont observées dans de nombreux cancers [Jacoby 1997]. Par ailleurs, le transfert d'ADN tumoral à des cellules endothéliales vasculaires induit la formation de vaisseaux fonctionnels *in vivo* [Ehlfors 2009]. La communication par THG entre les cellules tumorales et les cellules environnantes favorise dans le cas des cellules endothéliales, l'angiogenèse, qui participe à la transition vers un phénotype invasif. Cette transition semble aussi impliquer les cellules souches cancéreuses [Liotta 2001]. Ainsi, la progression des tumeurs primaires peut être due au THG entre des cellules tumorales et des cellules souches conduisant à des cellules souches cancéreuses [Tysnes 2007]. Ces cellules qui possèdent la capacité à s'autorenouveler, provoquent des cancers très agressifs à développement rapide, avec une forte propension à une diffusion métastatique [Reya 2001, Glinsky 2005]. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de savoir si la coculture de cellules apoptotiques issues de cancers du col de

l'utérus (HeLa et Ca Ski) avec des cellules souches stromales/mésenchymateuses, induirait leur transformation en cellules souches cancéreuses.

Spetz et coll. ont démontré que le transfert des séquences du VIH entre des lymphocytes et des fibroblastes était possible. Parallèlement, Holmgren et coll. ont observé le transfert de séquences d'EBV entre les lymphocytes B et les cellules endothéliales par THG [Spetz 1999, Holmgren 1999]. Ces exemples de THG expliqueraient la présence de séquences virales dans des cellules qui ne possèdent pas les récepteurs nécessaires à l'infection par les virus. Dans nos expériences, le transfert de séquences d'HPV de cellules épithéliales cancéreuses à des fibroblastes primaires humains, rend compréhensible la propagation d'HPV dans les cellules mésenchymateuses environnant la tumeur comme observée par HIS dans des carcinomes indifférenciés du col de l'utérus [Unger 1999a, Grayson 1997]. Ce transfert permettrait aux cellules abritant l'ADN d'HPV d'échapper au mécanisme de surveillance immunitaire et ainsi de créer un réservoir d'HPV stromal facilitant la persistance du virus laquelle est le principal facteur de risque de développement/progression des lésions.

L'ADN fragmenté contenu dans les cellules apoptotiques peut aussi être internalisé par d'autres cellules tumorales qui ont des capacités phagocytaires plus importantes que des cellules primaires, ce qui a été vérifié avec des cellules de cancer de la prostate [Bjerknes 1987, de la Taille 1999]. La progression des lésions du col de l'utérus positives pour les HPV à haut risque est souvent un processus lent qui se produit à une fréquence faible et nécessite l'acquisition de mutations qui pourrait être renforcée par le THG. Dans le cas du cancer du col de l'utérus et dans le contexte général de la carcinogenèse, un tel transfert peut fournir une explication supplémentaire à la corrélation positive observée entre le taux d'apoptose intratumoral et plusieurs caractéristiques tumorales de mauvais pronostic comme la taille de la tumeur, le grade de la lésion, le phénotype métastatique et la survie des patients [Lowe 2000, Levine 1995, Tsang 1999a, Isacson 1996, Leoncini 1993, Naresh 2001].

De façon surprenante, l'apoptose peut promouvoir la tumorigenèse [Tang 2011]. Le récepteur de mort, Fas, est capable d'induire la croissance tumorale en activant la transcription de Fos et l'expression d'un récepteur à l'EGF (EGFR-1 : Epidermal Growth Factor Receptor 1) via la kinase JNK (c-Jun N-terminal Kinase). De plus, en absence de phagocytose par les cellules spécialisées, les cellules tumorales en apoptose tardive relâchent des molécules, les DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern) parmi lesquelles la

protéine HMGB1 (High-Mobility Group Box 1) qui est impliquée dans les différentes étapes de la transformation tumorale [Tang 2010].

Les traitements de chimio- et/ou radiothérapies augmentent le taux d'apoptose intratumoral et pourraient par conséquent favoriser le THG. Dans ce contexte, ces traitements pourraient être en partie responsables de récurrences induisant la transformation de nouvelles cellules, sur le même site ou sur un site différent, des mois ou des années après une rémission complète [Sommers 1989, Elit 2009]. Ces traitements peuvent de la même façon contribuer à la capacité des cellules cancéreuses à acquérir une chimiorésistance comme démontré *in vitro* par de la Taille et coll. après le transfert des gènes de résistance aux drogues entre des cellules cancéreuses de la prostate [de la Taille 1999].

La possibilité d'un THG lors des traitements classiques pourrait avoir des implications pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. La combinaison de molécules induisant l'apoptose et de molécules inhibant le THG pourrait être envisagée pour une efficacité anti-tumorale optimale. Cependant, ces inhibiteurs devraient cibler uniquement l'internalisation par les cellules non spécialisées afin d'assurer l'élimination des cellules apoptotiques par les cellules immunitaires spécialisées.

L'étude de la cinétique d'internalisation des cellules apoptotiques apporte des précisions sur le mécanisme impliqué. En effet, la quasi-totalité des cellules apoptotiques est internalisée après 8 heures de coculture ce qui correspond au temps nécessaire à la phagocytose ou à la macropinocytose par des cellules non spécialisées décrites dans la littérature [Parnaik 2000]. Par exemple, l'endocytose médiée par les cages de clathrine ou les cavéoles ne dure que quelques minutes [Kaksonen 2006, Conner 2003]. De plus, l'implication du réseau d'actine dans la formation d'expansions membranaires en interaction avec les cellules apoptotiques et formant des vacuoles qui les englobent, correspond à la description de Swanson de la phagocytose [Mayor 2007, Swanson 2008]. Le suivi de l'internalisation d'une cellule apoptotique après repositionnement grâce à la mire référencée en position nous a permis de décrire un mécanisme proche de celui décrit par Parnaik lors de l'internalisation de cellules apoptotiques par des cellules fibroblastiques de hamster : la cellule apoptotique peut rester adhérente au fibroblaste pendant un long moment (plus de deux heures) avant d'être internalisée [Parnaik 2000].

La mire nous a permis de caractériser partiellement l'internalisation des cellules apoptotiques, en suivant une même cellule au cours du temps. Cette observation n'aurait pas

pu être faite avec différentes cocultures fixées à chaque temps de cinétique, car elle ne représenterait qu'un montage des événements possibles à chaque point de cinétique. Cependant, ce microsystème référencé en position, bien qu'il soit d'une très grande précision, n'est pas le système de suivi en temps réel le plus adapté à nos expériences. Le temps nécessaire au repositionnement de la mire est d'environ 15 minutes pour le suivi de 5 à 6 champs optiques en même temps. Ce temps est relativement court mais il limite l'intervalle des prises de vue à une heure car les cellules doivent être conservées au moins 45 minutes par heure dans un environnement adapté (incubateur) pour ne pas mourir. Or, le mécanisme d'internalisation par les cellules non spécialisées est relativement court une fois que le processus est déclenché ce qui diminue les chances d'observer une internalisation pendant notre durée d'observation. Ce système prometteur aura davantage d'avenir pour des observations sur des temps plus longs.

Après avoir montré que le mécanisme impliqué était un mécanisme actif (inhibé à 4°C) nécessitant des ions bivalents (inhibé en présence d'EDTA), les expériences utilisant des drogues inhibant spécifiquement les différentes voies d'internalisation nous ont permis de confirmer notre hypothèse puisque seule la cytochalasine D, spécifique de la phagocytose et de la macropinocytose, est capable d'inhiber l'internalisation [Ivanov 2008]. Ces résultats et les observations microscopiques laissent supposer que les fibroblastes internalisent des cellules apoptotiques par phagocytose [Monks 2005].

La phagocytose des cellules apoptotiques passerait par la reconnaissance des phosphatidylsérines. En effet, la présence d'annexine V, qui se fixe aux phosphatidylsérines, dans les cocultures diminue fortement l'internalisation des cellules apoptotiques. De plus, les fibroblastes expriment le récepteur aux phosphatidylsérines, BAI-1 au même taux que les monocytes ou les cellules dendritiques, et expriment très faiblement la stabiline-2 et TIM-4, décrits comme renforçant la capacité d'internalisation des fibroblastes [Miyashita 2007a].

D'après nos résultats préliminaires, certains cofacteurs sont impliqués dans l'internalisation des cellules apoptotiques. Ainsi le récepteur CD91 exprimé par les fibroblastes ainsi que des récepteurs scavengers potentiels, semblent participer à l'internalisation puisque leur blocage par un cocktail de sucres (mannose, galactose, N-acétylglucosamine) diminue de près de 70% le taux d'internalisation [Dini 1995, Hall 1994]. D'autres cofacteurs solubles comme l'annexine I et le MFG-8 qui lie les récepteurs à la vitronectine, jouent un rôle clef dans la phagocytose par les cellules non spécialisées. Leur implication dans notre modèle pourrait être démontrée par des expériences utilisant par

exemple un anticorps anti-annexine I et un peptide RGDS qui bloque le récepteur à la vitronectine [Hall 1994, Savill 2007, Fan 2004].

L'internalisation des cellules apoptotiques n'est pas le seul mécanisme pouvant induire un transfert de gènes. En effet, plusieurs modes de communications intercellulaires ont été évoquées dans la littérature : la formation de nanotubes et de filipodes, la sécrétion de microvésicules et des mécanismes aboutissant, comme l'internalisation des cellules apoptotiques, à une structure « cell-in-cell ». Les nanotubes sont des expansions membranaires qui permettent la communication entre les cellules du système immunitaire, telles que les cellules NK (Natural Killer), les macrophages et les lymphocytes B transformés par EBV, en favorisant l'échange de protéines membranaires [Onfelt 2004]. Ces nanotubes peuvent s'étendre jusqu'à plus de 140 μm mais généralement mesurent entre 10 et 50 μm avec une moyenne de 30 μm et possèdent un diamètre de 50 à 200 nm [Rustom 2004]. Les nanotubes sont aussi observés entre des cellules embryonnaires humaines de rein et des cellules rénales de rat. Ils sont constitués de filaments qui permettent les échanges de protéines, de molécules cytoplasmiques et d'organites d'une cellule à une autre à une vitesse de 26 nm/s. Ils semblent similaires aux filopodes permettant les échanges de mélanosomes entre les mélanocytes et les kératinocytes [Scott 2002]. Une étude a démontré que des nanotubes pouvaient se former entre des progéniteurs de cellules endothéliales et des cardiomyocytes [Koyanagi 2005]. Cette connexion facilitant le transfert de protéines et d'organites cellulaires comme les mitochondries, il n'est pas impossible qu'elle permette l'échange d'ADN. Les microvésicules sont aussi connues pour participer à la transformation tumorale. Ces petits fragments de cellules contiennent des protéines membranaires, des molécules cytoplasmiques et des ARN provenant de la cellule d'origine et peuvent participer à la dédifférenciation des progéniteurs hématopoïétiques [Ratajczak 2006]. Les microvésicules dérivées de cellules de tumeur du cerveau sont capables de transmettre un récepteur oncogénique à l'EGF tronqué, l'EGFvIII, aux cellules cancéreuses environnantes ne le possédant pas [Al-Nedawi 2008]. Les microvésicules issues de cellules tumorales peuvent transmettre des ARNm codant le VEGF ou l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) aux cellules environnantes telles que des monocytes [Baj-Krzyworzeka 2006]. Ainsi les microvésicules participent à la propagation horizontale d'oncogènes.

D'autres mécanismes comparables à la phagocytose et aboutissant à une structure « cell-in-cell » sont proposés par la littérature : l'empéripolèse, l'entose et le cannibalisme [Overholtzer 2008]. L'empéripolèse est décrite pour les interactions « cell-in-cell » entre des

cellules de différents types cellulaires et peut intervenir dans des cellules normales et des cellules néoplasiques. Les cellules épithéliales, mésenchymateuses, neurales et hématopoïétiques sont capables d'empéripolèse et leurs cibles sont fréquemment des cellules d'origine hématopoïétique. La principale empéripolèse décrite est la migration transcellulaire des leucocytes à travers les cellules endothéliales aboutissant à une structure « cell-in-cell » transitoire et impliquant les intégrines telles que la LFA-1 (Leukocyte Function Associated protein 1) sur la membrane des leucocytes et la molécule d'adhérence I-CAM1 (Intracellular Adhesion Molecule 1) sur la surface des cellules endothéliales [Carman 2008]. La majorité des structures « cell-in-cell » homotypiques se produit entre cellules cancéreuses [Overholtzer 2008]. Un mécanisme récent d'internalisation d'une cellule dans une autre cellule a été décrit chez les cellules épithéliales après la perte de l'adhérence cellulaire à la matrice. Ce mécanisme, nommé entose, implique les cadhérines et les filaments d'actine activés par les petites Rho GTPases et leur kinase effectrice ROCK [Overholtzer 2007]. Les cellules internalisées par entose peuvent rester vivantes dans la cellule hôte et peuvent, soit se diviser et/ou être relâchées, soit mourir. Les conséquences de cette interaction entre les cellules sont multiples. La cellule internalisée peut i) fournir des éléments nutritifs à la cellule hôte, ce qui est considéré comme du cannibalisme, ii) être protégée par la cellule hôte, iii) se différencier et maturer grâce à la cellule hôte, iv) induire la destruction de la cellule hôte, v) être détruite par la cellule hôte et, vi) dans notre contexte fusionner avec la cellule hôte. Cette fusion provoque une instabilité génomique et favorise l'échange d'informations génétiques entre cellules tumorales mais aussi entre une cellule tumorale et une cellule normale au même titre que le THG [Krajcovic 2011]. Si le cannibalisme dans les cellules humaines survient entre cellules tumorales, il peut s'étendre à d'autres types cellulaires comme les neutrophiles, les lymphocytes et les érythrocytes [Lugini 2006]. Dans les travaux de Fais et coll., l'ingestion de lymphocytes T par des cellules métastatiques de mélanome permet leur survie en absence de nutriments mais permet aussi aux cellules tumorales de se protéger de leur destruction [Fais 2007]. Le cannibalisme entre cellules cancéreuses pourrait comme l'entose, aboutir au transfert d'ADN favorisant l'instabilité génomique et l'accumulation de mutations augmentant l'agressivité des cellules tumorales.

Nos travaux sont les premiers démontrant que des cellules tumorales apoptotiques issues de cancer du col de l'utérus conservent un pouvoir oncogénique lié à la présence de séquences d'HPV qu'elles peuvent transmettre après leur phagocytose à des cellules receveuses. L'étude du transfert horizontal de gènes, que ce soit après phagocytose d'une cellule apoptotique ou par un autre processus d'internalisation, pourrait jouer un rôle potentiel

dans le développement tumoral associé ou non à des virus oncogènes. Cependant il reste nécessaire de vérifier la pertinence de ces mécanismes *in vivo*.

Conclusion Générale

Conclusion générale

La compréhension des mécanismes intervenant dans la formation des cancers a permis, au cours des années, une amélioration constante de l'efficacité des traitements proposés aux malades. Cependant les tumeurs résultant d'un processus complexe comportant multiples étapes, nombre de questions restent encore sans réponses.

La transformation par transfert horizontal de gènes pourrait avoir de nombreuses implications dans la progression tumorale car elle est possible aussi bien entre cellules tumorales qu'entre cellules tumorales et cellules environnant la tumeur. Cette transformation se présente ainsi comme un mécanisme alternatif, voire complémentaire, de la carcinogenèse. Nos travaux inscrits dans une thématique prometteuse devraient permettre de répondre à de nombreuses questions qu'il s'agisse du transfert horizontal de gènes ou de la transformation tumorale.

Le transfert de gènes a été, et est encore, très étudié chez les bactéries. Il permet à ces dernières de s'adapter à un nouvel environnement, généralement hostile. Le sous-clone bactérien, qui acquiert les gènes nécessaires à sa survie, prolifère tandis que les autres clones disparaissent. Le THG participe ainsi à l'évolution des bactéries selon la théorie décrite par Darwin.

Chez l'Homme, et plus particulièrement dans le cas des cellules dérivées de cancer du col de l'utérus, le transfert horizontal de gènes permet aux cellules de s'adapter et de survivre à un nouvel environnement. Sous la pression de sélection créée par l'environnement tumoral, des sous-clones de cellules cancéreuses sont susceptibles de se développer indépendamment de l'homéostasie tissulaire. Comme chez la bactérie, le transfert horizontal de gènes entre cellules favoriserait leur évolution, non pas selon la théorie de Darwin mais selon la théorie du gène égoïste, et par extension de la cellule égoïste, de Dawkins.

Bibliographie

Bibliographie

A

- Adrain, C. & Martin, S. J. 2001. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*, 26, 390-7.
- Ahnesorg, P., Smith, P. & Jackson, S. P. 2006. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 124, 301-13.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A. & Rak, J. 2008. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*, 10, 619-24.
- Alarcon-Vargas, D. & Ronai, Z. 2002. p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis*, 23, 541-7.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. & Yuan, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87, 171.
- Anderson, H. A., Maylock, C. A., Williams, J. A., Paweletz, C. P., Shu, H. & Shacter, E. 2003. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol*, 4, 87-91.
- Aylon, Y. & Oren, M. 2007. Living with p53, dying of p53. *Cell*, 130, 597-600.

B

- Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Weglarczyk, K., Baran, J., Urbanowicz, B., Branski, P., Ratajczak, M. Z. & Zembala, M. 2006. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother*, 55, 808-18.
- Balmain, A., Gray, J. & Ponder, B. 2003. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet*, 33 Suppl, 238-44.
- Bardelli, A., Cahill, D. P., Lederer, G., Speicher, M. R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Lengauer, C. 2001. Carcinogen-specific induction of genetic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 5770-5.
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S. W., Luzio, J. P., Simari, R. & Weissberg, P. 1998. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science*, 282, 290-3.
- Bergsmedh, A., Ehnfors, J., Kawane, K., Motoyama, N., Nagata, S. & Holmgren, L. 2006. DNase II and the Chk2 DNA damage pathway form a genetic barrier blocking replication of horizontally transferred DNA. *Mol Cancer Res*, 4, 187-95.
- Bergsmedh, A., Szeles, A., Henriksson, M., Bratt, A., Folkman, M. J., Spetz, A. L. & Holmgren, L. 2001. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6407-11.
- Bergsmedh, A., Szeles, A., Spetz, A. L. & Holmgren, L. 2002. Loss of the p21(Cip1/Waf1) cyclin kinase inhibitor results in propagation of horizontally transferred DNA. *Cancer Res*, 62, 575-9.
- Bernard, B., Fest, T., Pretet, J. L. & Mouglin, C. 2001. Staurosporine-induced apoptosis of HPV positive and negative human cervical cancer cells from different points in the cell cycle. *Cell Death Differ*, 8, 234-44.
- Bernard, B., Pretet, J. L., Charlot, J. F. & Mouglin, C. 2003. Human papillomaviruses type 16+ and 18+ cervical carcinoma cells are sensitive to staurosporine-mediated apoptosis. *Biol Cell*, 95, 17-26.

- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H. & de Villiers, E. M. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401, 70-9.
- Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P. G. & Dejean, A. 2002. Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO J*, 21, 3358-69.
- Bisset, L. R., Boni, J., Lutz, H. & Schupbach, J. 2007. Lack of evidence for PERV expression after apoptosis-mediated horizontal gene transfer between porcine and human cells. *Xenotransplantation*, 14, 13-24.
- Bjarnadottir, T. K., Fredriksson, R., Hoglund, P. J., Gloriam, D. E., Lagerstrom, M. C. & Schioth, H. B. 2004. The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors. *Genomics*, 84, 23-33.
- Bjerknes, R., Bjerkvig, R. & Laerum, O. D. 1987. Phagocytic capacity of normal and malignant rat glial cells in culture. *J Natl Cancer Inst*, 78, 279-88.
- Boehm, J. S. & Hahn, W. C. 2005. Understanding transformation: progress and gaps. *Curr Opin Genet Dev*, 15, 13-7.
- Bose, J., Gruber, A. D., Helming, L., Schiebe, S., Wegener, I., Hafner, M., Beales, M., Kontgen, F. & Lengeling, A. 2004. The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J Biol*, 3, 15.
- Bourdon, J. C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D. P., Saville, M. K. & Lane, D. P. 2005. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev*, 19, 2122-37.
- Brehm, A., Nielsen, S. J., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J. & Kouzarides, T. 1999. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J*, 18, 2449-58.
- Broach, J. R. & Levine, A. J. 1997. Oncogenes and cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev*, 7, 1-6.
- Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C. & Wakeham, D. E. 2001. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 517-68.
- Buckbinder, L., Talbott, R., Velasco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B. R. & Kley, N. 1995. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature*, 377, 646-9.
- Bulavin, D. V., Saito, S., Hollander, M. C., Sakaguchi, K., Anderson, C. W., Appella, E. & Fornace, A. J., Jr. 1999. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J*, 18, 6845-54.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282, 1497-501.
- Burghoff, S., Ding, Z., Godecke, S., Assmann, A., Wirrwar, A., Buchholz, D., Sergeeva, O., Leurs, C., Hanenberg, H., Muller, H. W., Bloch, W. & Schrader, J. 2008. Horizontal gene transfer from human endothelial cells to rat cardiomyocytes after intracoronary transplantation. *Cardiovasc Res*, 77, 534-43.
- Burk, R. D., Chen, Z. & Van Doorslaer, K. 2009. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics*, 12, 281-90.

C

- Canman, C. E. & Lim, D. S. 1998. The role of ATM in DNA damage responses and cancer. *Oncogene*, 17, 3301-8.

- Capp, J. P., Boudsocq, F., Bertrand, P., Laroche-Clary, A., Pourquier, P., Lopez, B. S., Cazaux, C., Hoffmann, J. S. & Canitrot, Y. 2006. The DNA polymerase lambda is required for the repair of non-compatible DNA double strand breaks by NHEJ in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 34, 2998-3007.
- Carman, C. V. & Springer, T. A. 2008. Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 533-40.
- Charlot, J. F., Nicolier, M., Pretet, J. L. & Mouglin, C. 2006. Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin-alpha on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis*, 11, 813-27.
- Charlot, J. F., Pretet, J. L., Haughey, C. & Mouglin, C. 2004. Mitochondrial translocation of p53 and mitochondrial membrane potential ($\Delta \Psi$ m) dissipation are early events in staurosporine-induced apoptosis of wild type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis*, 9, 333-43.
- Chen, L., Wu, Y. Y., Liu, P., Wang, J., Wang, G., Qin, J., Zhou, J. & Zhu, J. 2011. Down-regulation of HPV18 E6, E7, or VEGF expression attenuates malignant biological behavior of human cervical cancer cells. *Med Oncol*.
- Chen, X., Ko, L. J., Jayaraman, L. & Prives, C. 1996. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev*, 10, 2438-51.
- Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D. D. & Green, D. R. 2005. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science*, 309, 1732-5.
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M. & Green, D. R. 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 303, 1010-4.
- Clere, N., Bermont, L., Fauconnet, S., Lascombe, I., Saunier, M., Vettoretti, L., Plissonnier, M. L. & Mouglin, C. 2007. The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces Vascular Endothelial Growth Factor 121 (VEGF121) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. *Exp Cell Res*, 313, 3239-50.
- Clifford, G. M., Smith, J. S., Aguado, T. & Franceschi, S. 2003. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 89, 101-5.
- Conner, S. D. & Schmid, S. L. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422, 37-44.
- Couturier, J., Sastre-Garau, X., Schneider-Maunoury, S., Labib, A. & Orth, G. 1991. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. *J Virol*, 65, 4534-8.

D

- Davids, W. & Zhang, Z. 2008. The impact of horizontal gene transfer in shaping operons and protein interaction networks--direct evidence of preferential attachment. *BMC Evol Biol*, 8, 23.
- de la Cruz, F. & Davies, J. 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol*, 8, 128-33.
- de la Taille, A., Chen, M. W., Burchardt, M., Chopin, D. K. & Buttyan, R. 1999. Apoptotic conversion: evidence for exchange of genetic information between prostate cancer cells mediated by apoptosis. *Cancer Res*, 59, 5461-3.
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. & zur Hausen, H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27.

- DeGregori, J. & Johnson, D. G. 2006. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr Mol Med*, 6, 739-48.
- DeLeo, A. B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G. C., Law, L. W. & Old, L. J. 1979. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 2420-4.
- Demers, G. W., Halbert, C. L. & Galloway, D. A. 1994. Elevated wild-type p53 protein levels in human epithelial cell lines immortalized by the human papillomavirus type 16 E7 gene. *Virology*, 198, 169-74.
- Desaintes, C. & Demeret, C. 1996. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin Cancer Biol*, 7, 339-47.
- Deshpande, A., Sicinski, P. & Hinds, P. W. 2005. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*, 24, 2909-15.
- Dimri, G. P., Itahana, K., Acosta, M. & Campisi, J. 2000. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol*, 20, 273-85.
- Dini, L., Lentini, A., Diez, G. D., Rocha, M., Falasca, L., Serafino, L. & Vidal-Vanaclocha, F. 1995. Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. *J Cell Sci*, 108 (Pt 3), 967-73.
- DiPaolo, J. A., Woodworth, C. D., Popescu, N. C., Notario, V. & Doniger, J. 1989. Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. *Oncogene*, 4, 395-9.
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S. & Bradley, A. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356, 215-21.
- Doolittle, W. F. 1998. You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends Genet*, 14, 307-11.
- Doolittle, W. F. 1999. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science*, 284, 2124-9.
- Doorbar, J., Campbell, D., Grand, R. J. & Gallimore, P. H. 1986. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J*, 5, 355-62.
- Du, M., Fan, X., Hong, E. & Chen, J. J. 2002. Interaction of oncogenic papillomavirus E6 proteins with fibulin-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 296, 962-9.
- Du, M., Singh, N., Husseuin, A., Isaacson, P. G. & Pan, L. 1996. Positive correlation between apoptotic and proliferative indices in gastrointestinal lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). *J Pathol*, 178, 379-84.
- Duensing, A., Liu, Y., Tseng, M., Malumbres, M., Barbacid, M. & Duensing, S. 2006. Cyclin-dependent kinase 2 is dispensable for normal centrosome duplication but required for oncogene-induced centrosome overduplication. *Oncogene*, 25, 2943-9.
- Duensing, S., Lee, L. Y., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S., Gonzalez, S., Crum, C. P. & Munger, K. 2000. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10002-7.
- Duensing, S. & Munger, K. 2002. Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. *Oncogene*, 21, 6241-8.
- Duensing, S. & Munger, K. 2004. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*, 109, 157-62.
- Duesberg, P., Fabarius, A. & Hehlmann, R. 2004. Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *IUBMB Life*, 56, 65-81.

Durst, M., Croce, C. M., Gissmann, L., Schwarz, E. & Huebner, K. 1987. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 1070-4.

E

- Edinger, A. L. & Thompson, C. B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 663-9.
- Ehnfors, J., Kost-Alimova, M., Persson, N. L., Bergsmedh, A., Castro, J., Levchenko-Tegnebratt, T., Yang, L., Panaretakis, T. & Holmgren, L. 2009. Horizontal transfer of tumor DNA to endothelial cells in vivo. *Cell Death Differ*, 16, 749-57.
- Elit, L., Fyles, A. W., Devries, M. C., Oliver, T. K. & Fung-Kee-Fung, M. 2009. Follow-up for women after treatment for cervical cancer: a systematic review. *Gynecol Oncol*, 114, 528-35.
- Erwig, L. P. & Henson, P. M. 2008. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*, 15, 243-50.
- Evans, C. J. & Aguilera, R. J. 2003. DNase II: genes, enzymes and function. *Gene*, 322, 1-15.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L. & Henson, P. M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 148, 2207-16.
- Fadok, V. A., Warner, M. L., Bratton, D. L. & Henson, P. M. 1998. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol*, 161, 6250-7.
- Fais, S. 2007. Cannibalism: a way to feed on metastatic tumors. *Cancer Lett*, 258, 155-64.
- Fan, X., Krahling, S., Smith, D., Williamson, P. & Schlegel, R. A. 2004. Macrophage surface expression of annexins I and II in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes. *Mol Biol Cell*, 15, 2863-72.
- Fan, X., Yu, Z., Liu, J., Liu, N., Hajjar, K. A., Furie, K. L., Lo, E. H. & Wang, X. 2010. Annexin A2: a tissue plasminogen activator amplifier for thrombolytic stroke therapy. *Stroke*, 41, S54-8.
- Filippova, M., Parkhurst, L. & Duerksen-Hughes, P. J. 2004. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem*, 279, 25729-44.
- Filippova, M., Song, H., Connolly, J. L., Dermody, T. S. & Duerksen-Hughes, P. J. 2002. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 277, 21730-9.

F

- Fink, S. L. & Cookson, B. T. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, 73, 1907-16.
- Flatt, P. M., Tang, L. J., Scatena, C. D., Szak, S. T. & Pietenpol, J. A. 2000. p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol Cell Biol*, 20, 4210-23.
- Frolov, M. V. & Dyson, N. J. 2004. Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci*, 117, 2173-81.
- Fuster, J. J., Sanz-Gonzalez, S. M., Moll, U. M. & Andres, V. 2007. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol Med*, 13, 192-9.
- Futreal, P. A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N. & Stratton, M. R. 2004. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*, 4, 177-83.

G

- Garnett, T. O. & Duerksen-Hughes, P. J. 2006a. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol*, 151, 2321-35.
- Garnett, T. O., Filippova, M. & Duerksen-Hughes, P. J. 2006b. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ*, 13, 1915-26.
- Genereux, D. P. & Logsdon, J. M., Jr. 2003. Much ado about bacteria-to-vertebrate lateral gene transfer. *Trends Genet*, 19, 191-5.
- Gentile, M., Ahnstrom, M., Schon, F. & Wingren, S. 2001. Candidate tumour suppressor genes at 11q23-q24 in breast cancer: evidence of alterations in PIG8, a gene involved in p53-induced apoptosis. *Oncogene*, 20, 7753-60.
- Gladyshev, E. A., Meselson, M. & Arkhipova, I. R. 2008. Massive horizontal gene transfer in bdelloid rotifers. *Science*, 320, 1210-3.
- Glinsky, G. V. 2005. Death-from-cancer signatures and stem cell contribution to metastatic cancer. *Cell Cycle*, 4, 1171-5.
- Gogarten, J. P., Doolittle, W. F. & Lawrence, J. G. 2002. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol Biol Evol*, 19, 2226-38.
- Gogarten, J. P. & Townsend, J. P. 2005. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Microbiol*, 3, 679-87.
- Grayson, W., Taylor, L. F. & Cooper, K. 1997. Adenoid basal carcinoma of the uterine cervix: detection of integrated human papillomavirus in a rare tumor of putative "reserve cell" origin. *Int J Gynecol Pathol*, 16, 307-12.
- Green, D. R. & Kroemer, G. 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 458, 1127-30.
- Guerrini, J. S., Bouvard, V., Oswald, E., Alonso, A., Pretet, J. L., Tommasino, M., Mougin, C. & Aubin, F. 2011. E6 and E7 proteins from different beta-papillomaviruses types do not interfere in UVB-induced apoptosis of HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol*, 20, 71-3.

H

- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W. & Weinberg, R. A. 1999. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400, 464-8.
- Hahn, W. C., Dessain, S. K., Brooks, M. W., King, J. E., Elenbaas, B., Sabatini, D. M., DeCaprio, J. A. & Weinberg, R. A. 2002. Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol Cell Biol*, 22, 2111-23.
- Hall, S. E., Savill, J. S., Henson, P. M. & Haslett, C. 1994. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J Immunol*, 153, 3218-27.
- Hampson, L., El Hady, E. S., Moore, J. V., Kitchener, H. & Hampson, I. N. 2001. The HPV16 E6 and E7 proteins and the radiation resistance of cervical carcinoma. *Faseb J*, 15, 1445-7.
- Han, X., Patters, A. B. & Chesney, R. W. 2003. Transactivation of TauT by p53 in MCF-7 cells: the role of estrogen receptors. *Adv Exp Med Biol*, 526, 139-47.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Harbour, J. W. & Dean, D. C. 2000. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*, 14, 2393-409.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*, 8, 3905-10.

- He, B., Lu, N. & Zhou, Z. 2009. Cellular and nuclear degradation during apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 900-12.
- Holmgren, L. 2010. Horizontal gene transfer: you are what you eat. *Biochem Biophys Res Commun*, 396, 147-51.
- Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavolgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I. & Falk, K. I. 1999. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood*, 93, 3956-63.
- Honda, R. & Yasuda, H. 1999. Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J*, 18, 22-7.
- Hoover, A. C., Spanos, W. C., Harris, G. F., Anderson, M. E., Klingelutz, A. J. & Lee, J. H. 2007. The role of human papillomavirus 16 E6 in anchorage-independent and invasive growth of mouse tonsil epithelium. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 133, 495-502.
- Howie, H. L., Katzenellenbogen, R. A. & Galloway, D. A. 2009. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, 384, 324-34.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M. & Howley, P. M. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J*, 10, 4129-35.

I

- Igney, F. H. & Krammer, P. H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2, 277-88.
- Isacson, C., Kesis, T. D., Hedrick, L. & Cho, K. R. 1996. Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type. *Cancer Res*, 56, 669-74.
- Ishikawa, T., Lee, E. J. & Jameson, J. L. 2004. Nonhomologous end-joining ligation transfers DNA regulatory elements between cointroduced plasmids. *Mol Cell Biol*, 24, 8323-31.
- Ivanov, A. I. 2008. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol*, 440, 15-33.

J

- Jacobson, M. D., Weil, M. & Raff, M. C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88, 347-54.
- Jacoby, R. F., Schlack, S., Cole, C. E., Skarbek, M., Harris, C. & Meisner, L. F. 1997. A juvenile polyposis tumor suppressor locus at 10q22 is deleted from nonepithelial cells in the lamina propria. *Gastroenterology*, 112, 1398-403.
- Jeon, S. & Lambert, P. F. 1995. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1654-8.

K

- Kabsch, K. & Alonso, A. 2002. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol*, 76, 12162-72.
- Kaksonen, M., Toret, C. P. & Drubin, D. G. 2006. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 404-14.
- Kanwal, R. & Gupta, S. 2010. Epigenetics and cancer. *J Appl Physiol*, 109, 598-605.
- Katich, S. C., Zerfass-Thome, K. & Hoffmann, I. 2001. Regulation of the Cdc25A gene by the human papillomavirus Type 16 E7 oncogene. *Oncogene*, 20, 543-50.

- Kato, M. V., Sato, H., Nagayoshi, M. & Ikawa, Y. 1997. Upregulation of the elongation factor-1 α gene by p53 in association with death of an erythroleukemic cell line. *Blood*, 90, 1373-8.
- Katz, L. A. 2002. Lateral gene transfers and the evolution of eukaryotes: theories and data. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, 1893-900.
- Katzenellenbogen, R. A., Egelkrout, E. M., Vliet-Gregg, P., Gewin, L. C., Gafken, P. R. & Galloway, D. A. 2007. NFX1-123 and poly(A) binding proteins synergistically augment activation of telomerase in human papillomavirus type 16 E6-expressing cells. *J Virol*, 81, 3786-96.
- Kavuri, S. M., Geserick, P., Berg, D., Dimitrova, D. P., Feoktistova, M., Siegmund, D., Gollnick, H., Neumann, M., Wajant, H. & Leverkus, M. 2011. Cellular FLICE-inhibitory Protein (cFLIP) Isoforms Block CD95- and TRAIL Death Receptor-induced Gene Induction Irrespective of Processing of Caspase-8 or cFLIP in the Death-inducing Signaling Complex. *J Biol Chem*, 286, 16631-46.
- Keeling, P. J. & Palmer, J. D. 2008. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet*, 9, 605-18.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- Kim, S., Elkon, K. B. & Ma, X. 2004. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity*, 21, 643-53.
- Kinchen, J. M. & Ravichandran, K. S. 2007. Journey to the grave: signaling events regulating removal of apoptotic cells. *J Cell Sci*, 120, 2143-9.
- Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1997. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 386, 761, 763.
- Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1998. Landscaping the cancer terrain. *Science*, 280, 1036-7.
- Kivi, N., Greco, D., Auvinen, P. & Auvinen, E. 2008. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene*, 27, 2532-41.
- Koonin, E. V. 2003. Horizontal gene transfer: the path to maturity. *Mol Microbiol*, 50, 725-7.
- Korotchikina, L. G., Leontieva, O. V., Bukreeva, E. I., Demidenko, Z. N., Gudkov, A. V. & Blagosklonny, M. V. 2010. The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. *Aging (Albany NY)*, 2, 344-52.
- Korzeniewska-Dyl, I. 2007. [Caspases--structure and function]. *Pol Merkur Lekarski*, 23, 403-7.
- Koyanagi, M., Brandes, R. P., Haendeler, J., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. 2005. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res*, 96, 1039-41.
- Krajcovic, M., Johnson, N. B., Sun, Q., Normand, G., Hoover, N., Yao, E., Richardson, A. L., King, R. W., Cibas, E. S., Schnitt, S. J., Brugge, J. S. & Overholtzer, M. 2011. A non-genetic route to aneuploidy in human cancers. *Nat Cell Biol*, 13, 324-30.
- Kroemer, G. & Martin, S. J. 2005. Caspase-independent cell death. *Nat Med*, 11, 725-30.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J. L. & Mignotte, B. 1995. The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J*, 9, 1277-87.
- Kruse, J. P. & Gu, W. 2009. Modes of p53 regulation. *Cell*, 137, 609-22.

L

- Land, H., Parada, L. F. & Weinberg, R. A. 1983. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science*, 222, 771-8.
- Lane, D. P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-6.

- Lechner, M. S. & Laimins, L. A. 1994. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol*, 68, 4262-73.
- Leng, R. P., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B., Chung, S., Parant, J. M., Lozano, G., Hakem, R. & Benchimol, S. 2003. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell*, 112, 779-91.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396, 643-9.
- Leoncini, L., Del Vecchio, M. T., Megha, T., Barbini, P., Galieni, P., Pileri, S., Sabattini, E., Gherlinzoni, F., Tosi, P., Kraft, R. & et al. 1993. Correlations between apoptotic and proliferative indices in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol*, 142, 755-63.
- Leu, J. I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E. & George, D. L. 2004. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol*, 6, 443-50.
- Levine, E. L., Renahan, A., Gossiel, R., Davidson, S. E., Roberts, S. A., Chadwick, C., Wilks, D. P., Potten, C. S., Hendry, J. H., Hunter, R. D. & et al. 1995. Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother Oncol*, 37, 1-9.
- Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A. Y., Qin, J. & Gu, W. 2002. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*, 416, 648-53.
- Linderholm, B., Karlsson, E., Klaar, S., Lindahl, T., Borg, A. L., Elmberger, G. & Bergh, J. 2004. Thrombospondin-1 expression in relation to p53 status and VEGF expression in human breast cancers. *Eur J Cancer*, 40, 2417-23.
- Liotta, L. A. & Kohn, E. C. 2001. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 411, 375-9.
- Lipponen, P., Aaltomaa, S., Kosma, V. M. & Syrjanen, K. 1994a. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer*, 30A, 2068-73.
- Lipponen, P. K. & Aaltomaa, S. 1994b. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *J Pathol*, 173, 333-9.
- Liu, A., Chen, L., Ngan, H. Y., Khoo, U. S., Zhao, Y. & Cheung, A. N. 2002. Apoptotic and proliferative activity in ovarian benign, borderline and malignant tumors. *Chin Med Sci J*, 17, 106-11.
- Liu, F. T., Newland, A. C. & Jia, L. 2003. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 310, 956-62.
- Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O. & Russell, P. 1999. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature*, 397, 172-5.
- Lopez-Ocejo, O., Vilorio-Petit, A., Bequet-Romero, M., Mukhopadhyay, D., Rak, J. & Kerbel, R. S. 2000. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene*, 19, 4611-20.
- Lowe, S. L., Rubinchik, S., Honda, T., McDonnell, T. J., Dong, J. Y. & Norris, J. S. 2001. Prostate-specific expression of Bax delivered by an adenoviral vector induces apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Gene Ther*, 8, 1363-71.
- Lowe, S. W. & Lin, A. W. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21, 485-95.
- Lugini, L., Matarrese, P., Tinari, A., Lozupone, F., Federici, C., Iessi, E., Gentile, M., Luciani, F., Parmiani, G., Rivoltini, L., Malorni, W. & Fais, S. 2006. Cannibalism of live lymphocytes by human metastatic but not primary melanoma cells. *Cancer Res*, 66, 3629-38.

Luthi, A. U. & Martin, S. J. 2007. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 14, 641-50.

M

- Maeno, K., Masuda, A., Yanagisawa, K., Konishi, H., Osada, H., Saito, T., Ueda, R. & Takahashi, T. 2006. Altered regulation of c-jun and its involvement in anchorage-independent growth of human lung cancers. *Oncogene*, 25, 271-7.
- Mallet, W. G. & Maxfield, F. R. 2000. Endocytosis. *Adv Nephrol Necker Hosp*, 30, 109-25.
- Marchenko, N. D. & Moll, U. M. 2007. The role of ubiquitination in the direct mitochondrial death program of p53. *Cell Cycle*, 6, 1718-23.
- Marchenko, N. D., Zaika, A. & Moll, U. M. 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*, 275, 16202-12.
- Mathur, R. S. & Mathur, S. P. 2005. Vascular endothelial growth factor (VEGF) up-regulates epidermal growth factor receptor (EGF-R) in cervical cancer in vitro: this action is mediated through HPV-E6 in HPV-positive cancers. *Gynecol Oncol*, 97, 206-13.
- Mattson, M. P. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430, 631-9.
- Mayor, S. & Pagano, R. E. 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 603-12.
- McCormack, C. J., Kelly, J. W. & Dorevitch, A. P. 1997. Differences in age and body site distribution of the histological subtypes of basal cell carcinoma. A possible indicator of differing causes. *Arch Dermatol*, 133, 593-6.
- Melchionna, R., Chen, X. B., Blasina, A. & McGowan, C. H. 2000. Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1. *Nat Cell Biol*, 2, 762-5.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. & Moll, U. M. 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, 11, 577-90.
- Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T. & Nagata, S. 2007a. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*, 450, 435-9.
- Miyanishi, N., Nishi, N., Abe, H., Kashio, Y., Shinonaga, R., Nakakita, S., Sumiyoshi, W., Yamauchi, A., Nakamura, T., Hirashima, M. & Hirabayashi, J. 2007b. Carbohydrate-recognition domains of galectin-9 are involved in intermolecular interaction with galectin-9 itself and other members of the galectin family. *Glycobiology*, 17, 423-32.
- Mollinedo, F. & Gajate, C. 2003. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis*, 8, 413-50.
- Monks, J., Rosner, D., Geske, F. J., Lehman, L., Hanson, L., Neville, M. C. & Fadok, V. A. 2005. Epithelial cells as phagocytes: apoptotic epithelial cells are engulfed by mammary alveolar epithelial cells and repress inflammatory mediator release. *Cell Death Differ*, 12, 107-14.
- Moore, P. S. & Chang, Y. 2010. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer*, 10, 878-89.
- Moreno-Herrero, F., de Jager, M., Dekker, N. H., Kanaar, R., Wyman, C. & Dekker, C. 2005. Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature*, 437, 440-3.
- Moss, D. K., Betin, V. M., Malesinski, S. D. & Lane, J. D. 2006. A novel role for microtubules in apoptotic chromatin dynamics and cellular fragmentation. *J Cell Sci*, 119, 2362-74.
- Mowat, M., Cheng, A., Kimura, N., Bernstein, A. & Benchimol, S. 1985. Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. *Nature*, 314, 633-6.

- Moynault, A., Luciani, M. F. & Chimini, G. 1998. ABC1, the mammalian homologue of the engulfment gene *ced-7*, is required during phagocytosis of both necrotic and apoptotic cells. *Biochem Soc Trans*, 26, 629-35.
- Munger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M. & Huh, K. 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*, 78, 11451-60.
- Munger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M. & Schlegel, R. 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*, 63, 4417-21.
- Murphy, M., Hinman, A. & Levine, A. J. 1996. Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule-associated protein. *Genes Dev*, 10, 2971-80.

N

- Nabi, I. R. & Le, P. U. 2003. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol*, 161, 673-7.
- Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-65.
- Nagata, S. 2005. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol*, 23, 853-75.
- Nagata, S., Hanayama, R. & Kawane, K. 2010. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell*, 140, 619-30.
- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N. & Fukuyama, H. 2003. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ*, 10, 108-16.
- Nakano, K. & Vousden, K. H. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 7, 683-94.
- Naresh, K. N., Lakshminarayanan, K., Pai, S. A. & Borges, A. M. 2001. Apoptosis index is a predictor of metastatic phenotype in patients with early stage squamous carcinoma of the tongue: a hypothesis to support this paradoxical association. *Cancer*, 91, 578-84.
- Narisawa-Saito, M., Yoshimatsu, Y., Ohno, S., Yugawa, T., Egawa, N., Fujita, M., Hirohashi, S. & Kiyono, T. 2008. An in vitro multistep carcinogenesis model for human cervical cancer. *Cancer Res*, 68, 5699-705.
- Nomine, Y., Masson, M., Charbonnier, S., Zanier, K., Ristriani, T., Deryckere, F., Sibler, A. P., Desplancq, D., Atkinson, R. A., Weiss, E., Orfanoudakis, G., Kieffer, B. & Trave, G. 2006. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Mol Cell*, 21, 665-78.
- Nowell, P. C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194, 23-8.

O

- Ochman, H., Lawrence, J. G. & Groisman, E. A. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405, 299-304.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. & Tanaka, N. 2000a. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288, 1053-8.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y. & Taya, Y. 2000b. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, 102, 849-62.
- Ogden, C. A., deCathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V. A. & Henson, P. M. 2001. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med*, 194, 781-95.

- Ohashi, K., Nemoto, T., Eishi, Y., Matsuno, A., Nakamura, K. & Hirokawa, K. 1997. Proliferative activity and p53 protein accumulation correlate with early invasive trend, and apoptosis correlates with differentiation grade in oesophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch*, 430, 107-15.
- Okada, H., Bakal, C., Shahinian, A., Elia, A., Wakeham, A., Suh, W. K., Duncan, G. S., Ciofani, M., Rottapel, R., Zuniga-Pflucker, J. C. & Mak, T. W. 2004. Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death. *J Exp Med*, 199, 399-410.
- Olendzenski, L. & Gogarten, J. P. 2009. Gene transfer: who benefits? *Methods Mol Biol*, 532, 3-9.
- Olumi, A. F., Grossfeld, G. D., Hayward, S. W., Carroll, P. R., Tlsty, T. D. & Cunha, G. R. 1999. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*, 59, 5002-11.
- Onfelt, B., Nedvetzki, S., Yanagi, K. & Davis, D. M. 2004. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol*, 173, 1511-3.
- Oren, M. 2003. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ*, 10, 431-42.
- Overholtzer, M. & Brugge, J. S. 2008. The cell biology of cell-in-cell structures. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 796-809.
- Overholtzer, M., Mailleux, A. A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S. J., King, R. W., Cibas, E. S. & Brugge, J. S. 2007. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*, 131, 966-79.
- Overmeer, R. M., Louwers, J. A., Meijer, C. J., van Kemenade, F. J., Hesselink, A. T., Daalmeijer, N. F., Wilting, S. M., Heideman, D. A., Verheijen, R. H., Zaal, A., van Baal, W. M., Berkhof, J., Snijders, P. J. & Steenbergen, R. D. 2010. Combined CADM1 and MAL promoter methylation analysis to detect (pre-)malignant cervical lesions in high-risk HPV-positive women. *Int J Cancer*.

P

- Park, D., Tosello-Tramont, A. C., Elliott, M. R., Lu, M., Haney, L. B., Ma, Z., Klibanov, A. L., Mandell, J. W. & Ravichandran, K. S. 2007. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature*, 450, 430-4.
- Parnaik, R., Raff, M. C. & Scholes, J. 2000. Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Curr Biol*, 10, 857-60.
- Perry, M. E. 2010. The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a000968.
- Petalcorin, M. I., Galkin, V. E., Yu, X., Egelman, E. H. & Boulton, S. J. 2007. Stabilization of RAD-51-DNA filaments via an interaction domain in *Caenorhabditis elegans* BRCA2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 8299-304.
- Pretet, J. L., Jacquard, A. C., Carcopino, X., Charlot, J. F., Bouhour, D., Kantelip, B., Soubeyrand, B., Leocmach, Y., Mougin, C. & Riethmuller, D. 2008. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. *Int J Cancer*, 122, 428-32.

R

- Rajagopalan, H. & Lengauer, C. 2004. Aneuploidy and cancer. *Nature*, 432, 338-41.
- Rangarajan, A., Hong, S. J., Gifford, A. & Weinberg, R. A. 2004. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell*, 6, 171-83.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P. & Ratajczak, M. Z. 2006. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20, 847-56.

- Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L. E., Madan, A., Semenza, G. L. & Bedi, A. 2000. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev*, 14, 34-44.
- Ravichandran, K. S. & Lorenz, U. 2007. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol*, 7, 964-74.
- Rey, O., Lee, S., Baluda, M. A., Swee, J., Ackerson, B., Chiu, R. & Park, N. H. 2000a. The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 interacts with F-actin in vitro and in vivo. *Virology*, 268, 372-81.
- Rey, O., Lee, S. & Park, N. H. 2000b. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein represses transcription of human fibronectin. *J Virol*, 74, 4912-8.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 105-11.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122, 735-49.
- Robertson, K. D. & Jones, P. A. 1998. The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. *Mol Cell Biol*, 18, 6457-73.
- Robles, A. I., Bemmels, N. A., Foraker, A. B. & Harris, C. C. 2001. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res*, 61, 6660-4.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. & Bonner, W. M. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273, 5858-68.
- Romanczuk, H. & Howley, P. M. 1992. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 3159-63.
- Rupinder, S. K., Gurpreet, A. K. & Manjeet, S. 2007. Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol*, 46, 383-93.
- Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P. & Gerdes, H. H. 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*, 303, 1007-10.

S

- Sanders, I. R. 2006. Rapid disease emergence through horizontal gene transfer between eukaryotes. *Trends Ecol Evol*, 21, 656-8.
- Sandoz, P. 2005. Nanometric position and displacement measurement of the six degrees of freedom by means of a patterned surface element. *Appl Opt*, 44, 1449-53.
- Sandoz, P., Bonnans, V. & Gharbi, T. 2002. High-accuracy position and orientation measurement of extended two-dimensional surfaces by a phase-sensitive vision method. *Appl Opt*, 41, 5503-11.
- Sandoz, P., Zeggari, R., Froehly, L., Pretet, J. L. & Mouglin, C. 2007. Position referencing in optical microscopy thanks to sample holders with out-of-focus encoded patterns. *J Microsc*, 225, 293-303.
- Savill, J. & Gregory, C. 2007. Apoptotic PS to phagocyte TIM-4: eat me. *Immunity*, 27, 830-2.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. & Howley, P. M. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 75, 495-505.
- Schlegel, R., Wade-Glass, M., Rabson, M. S. & Yang, Y. C. 1986. The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide. *Science*, 233, 464-7.

- Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. & zur Hausen, H. 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 314, 111-4.
- Scott, G., Leopardi, S., Printup, S. & Madden, B. C. 2002. Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. *J Cell Sci*, 115, 1441-51.
- Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J. & Breard, J. 2001. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*, 3, 346-52.
- Seo, Y. W., Shin, J. N., Ko, K. H., Cha, J. H., Park, J. Y., Lee, B. R., Yun, C. W., Kim, Y. M., Seol, D. W., Kim, D. W., Yin, X. M. & Kim, T. H. 2003. The molecular mechanism of Noxa-induced mitochondrial dysfunction in p53-mediated cell death. *J Biol Chem*, 278, 48292-9.
- Shanahan, T. 1999. Evolutionary progress from Darwin to Dawkins. *Endeavour*, 23, 171-4.
- Sherr, C. J. & Weber, J. D. 2000. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev*, 10, 94-9.
- Shpak, M., Kugelman, J. R., Varela-Ramirez, A. & Aguilera, R. J. 2008. The phylogeny and evolution of deoxyribonuclease II: an enzyme essential for lysosomal DNA degradation. *Mol Phylogenet Evol*, 47, 841-54.
- Slagle, B. L., Kaufman, R. H., Reeves, W. C. & Icenogle, J. P. 1998. Expression of ras, c-myc, and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer*, 83, 1401-8.
- Slee, E. A., O'Connor, D. J. & Lu, X. 2004. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene*, 23, 2809-18.
- Sommers, G. M., Grigsby, P. W., Perez, C. A., Camel, H. M., Kao, M. S., Galakatos, A. E. & Lockett, M. A. 1989. Outcome of recurrent cervical carcinoma following definitive irradiation. *Gynecol Oncol*, 35, 150-5.
- Soussi, T. 2003. Focus on the p53 gene and cancer: advances in TP53 mutation research. *Hum Mutat*, 21, 173-5.
- Soussi, T. & Wiman, K. G. 2007. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell*, 12, 303-12.
- Spardy, N., Covella, K., Cha, E., Hoskins, E. E., Wells, S. I., Duensing, A. & Duensing, S. 2009. Human papillomavirus 16 E7 oncoprotein attenuates DNA damage checkpoint control by increasing the proteolytic turnover of claspin. *Cancer Res*, 69, 7022-9.
- Spetz, A. L., Patterson, B. K., Lore, K., Andersson, J. & Holmgren, L. 1999. Functional gene transfer of HIV DNA by an HIV receptor-independent mechanism. *J Immunol*, 163, 736-42.
- Stubenrauch, F., Zobel, T. & Iftner, T. 2001. The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol*, 75, 4139-49.
- Swanson, J. A. 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 639-49.

T

- Tang, D., Lotze, M. T., Kang, R. & Zeh, H. J. 2011. Apoptosis promotes early tumorigenesis. *Oncogene*, 30, 1851-4.
- Tang, D., Loze, M. T., Zeh, H. J. & Kang, R. 2010. The redox protein HMGB1 regulates cell death and survival in cancer treatment. *Autophagy*, 6, 1181-3.
- Tannapfel, A., Hahn, H. A., Katalinic, A., Fietkau, R. J., Kuhn, R. & Wittekind, C. W. 1997. Incidence of apoptosis, cell proliferation and P53 expression in renal cell carcinomas. *Anticancer Res*, 17, 1155-62.
- Tao, W. & Levine, A. J. 1999. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6937-41.

- Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 231-41.
- Terui, T., Murakami, K., Takimoto, R., Takahashi, M., Takada, K., Murakami, T., Minami, S., Matsunaga, T., Takayama, T., Kato, J. & Niitsu, Y. 2003. Induction of PIG3 and NOXA through acetylation of p53 at 320 and 373 lysine residues as a mechanism for apoptotic cell death by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res*, 63, 8948-54.
- Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 3, 711-21.
- Thomas, J. T. & Laimins, L. A. 1998. Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *J Virol*, 72, 1131-7.
- Thomas, M., Laura, R., Hepner, K., Guccione, E., Sawyers, C., Lasky, L. & Banks, L. 2002. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene*, 21, 5088-96.
- Tinel, A. & Tschoopp, J. 2004. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*, 304, 843-6.
- Todd, D., Yang, G., Brown, R. W., Cao, J., D'Agati, V., Thompson, T. S. & Truong, L. D. 1996. Apoptosis in renal cell carcinoma: detection by in situ end-labeling of fragmented DNA and correlation with other prognostic factors. *Hum Pathol*, 27, 1012-7.
- Tomlinson, I. P., Novelli, M. R. & Bodmer, W. F. 1996. The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14800-3.
- Tsang, R. W., Fyles, A. W., Li, Y., Rajaraman, M. M., Chapman, W., Pintilie, M. & Wong, C. S. 1999a. Tumor proliferation and apoptosis in human uterine cervix carcinoma I: correlations between variables. *Radiother Oncol*, 50, 85-92.
- Tsang, R. W., Wong, C. S., Fyles, A. W., Levin, W., Manchul, L. A., Milosevic, M., Chapman, W., Li, Y. Q. & Pintilie, M. 1999b. Tumour proliferation and apoptosis in human uterine cervix carcinoma II: correlations with clinical outcome. *Radiother Oncol*, 50, 93-101.
- Tysnes, B. B. & Bjerkvig, R. 2007. Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochim Biophys Acta*, 1775, 283-97.

U

- Ueda, S., Masutani, H., Nakamura, H., Tanaka, T., Ueno, M. & Yodoi, J. 2002. Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal*, 4, 405-14.
- Unger, E. R., Vernon, S. D., Hewan-Lowe, K. O., Lee, D. R., Thoms, W. W. & Reeves, W. C. 1999a. An unusual cervical carcinoma showing exception to epitheliotropism of human papillomavirus. *Hum Pathol*, 30, 483-5.
- Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E., Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., Oren, M. & Haupt, Y. 1999b. Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J*, 18, 1805-14.
- Ura, S., Masuyama, N., Graves, J. D. & Gotoh, Y. 2001. Caspase cleavage of MST1 promotes nuclear translocation and chromatin condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10148-53.
- Uren, A. G. & Vaux, D. L. 1996. Molecular and clinical aspects of apoptosis. *Pharmacol Ther*, 72, 37-50.
- Ustav, M. & Stenlund, A. 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J*, 10, 449-57.

V

- Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T. K., Hampton, G. M. & Wahl, G. M. 2002. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell*, 9, 1031-44.
- Vairapandi, M., Balliet, A. G., Hoffman, B. & Liebermann, D. A. 2002. GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol*, 192, 327-38.
- Van Doorslaer, K. & Burk, R. D. 2010. Evolution of human papillomavirus carcinogenicity. *Adv Virus Res*, 77, 41-62.
- Van Dyck, E., Stasiak, A. Z., Stasiak, A. & West, S. C. 1999. Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature*, 398, 728-31.
- Van Ranst, M., Tachezy, R., Pruss, J. & Burk, R. D. 1992. Primary structure of the E6 protein of *Micromys minutus* papillomavirus and *Mastomys natalensis* papillomavirus. *Nucleic Acids Res*, 20, 2889.
- Vande Pol, S. B., Brown, M. C. & Turner, C. E. 1998. Association of Bovine Papillomavirus Type 1 E6 oncoprotein with the focal adhesion protein paxillin through a conserved protein interaction motif. *Oncogene*, 16, 43-52.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. & Kroemer, G. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 700-14.
- von Lintig, F. C., Dreilinger, A. D., Varki, N. M., Wallace, A. M., Casteel, D. E. & Boss, G. R. 2000. Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 62, 51-62.
- Vousden, K. H. & Lu, X. 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2, 594-604.
- Vousden, K. H. & Ryan, K. M. 2009. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer*, 9, 691-700.

W

- Waite, K. A. & Eng, C. 2002. Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet*, 70, 829-44.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J. & Munoz, N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189, 12-9.
- Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J. & Bar-Sagi, D. 1999. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol*, 1, 20-6.
- Wentzensen, N., Vinokurova, S. & von Knebel Doeberitz, M. 2004. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*, 64, 3878-84.
- White, A. E., Livanos, E. M. & Tlsty, T. D. 1994. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev*, 8, 666-77.
- Whitehead, T. D., Brownstein, B. H., Parry, J. J., Thompson, D., Cha, B. A., Moros, E. G., Rogers, B. E. & Roti Roti, J. L. 2005. Expression of the proto-oncogene Fos after exposure to radiofrequency radiation relevant to wireless communications. *Radiat Res*, 164, 420-30.
- Wiman, K. G. 2010. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene*, 29, 4245-52.
- Wood, C. K., Turner, C. E., Jackson, P. & Critchley, D. R. 1994. Characterisation of the paxillin-binding site and the C-terminal focal adhesion targeting sequence in vinculin. *J Cell Sci*, 107 (Pt 2), 709-17.

- Wood, W., Turmaine, M., Weber, R., Camp, V., Maki, R. A., McKercher, S. R. & Martin, P. 2000. Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development*, 127, 5245-52.
- Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., Hamilton, S. R., Spinner, N. B., Markowitz, S., Wu, G. & el-Deiry, W. S. 1997. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet*, 17, 141-3.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie, A. R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68, 251-306.

Y

- Yan, B., Wang, H., Li, F. & Li, C. Y. 2006. Regulation of mammalian horizontal gene transfer by apoptotic DNA fragmentation. *Br J Cancer*, 95, 1696-700.

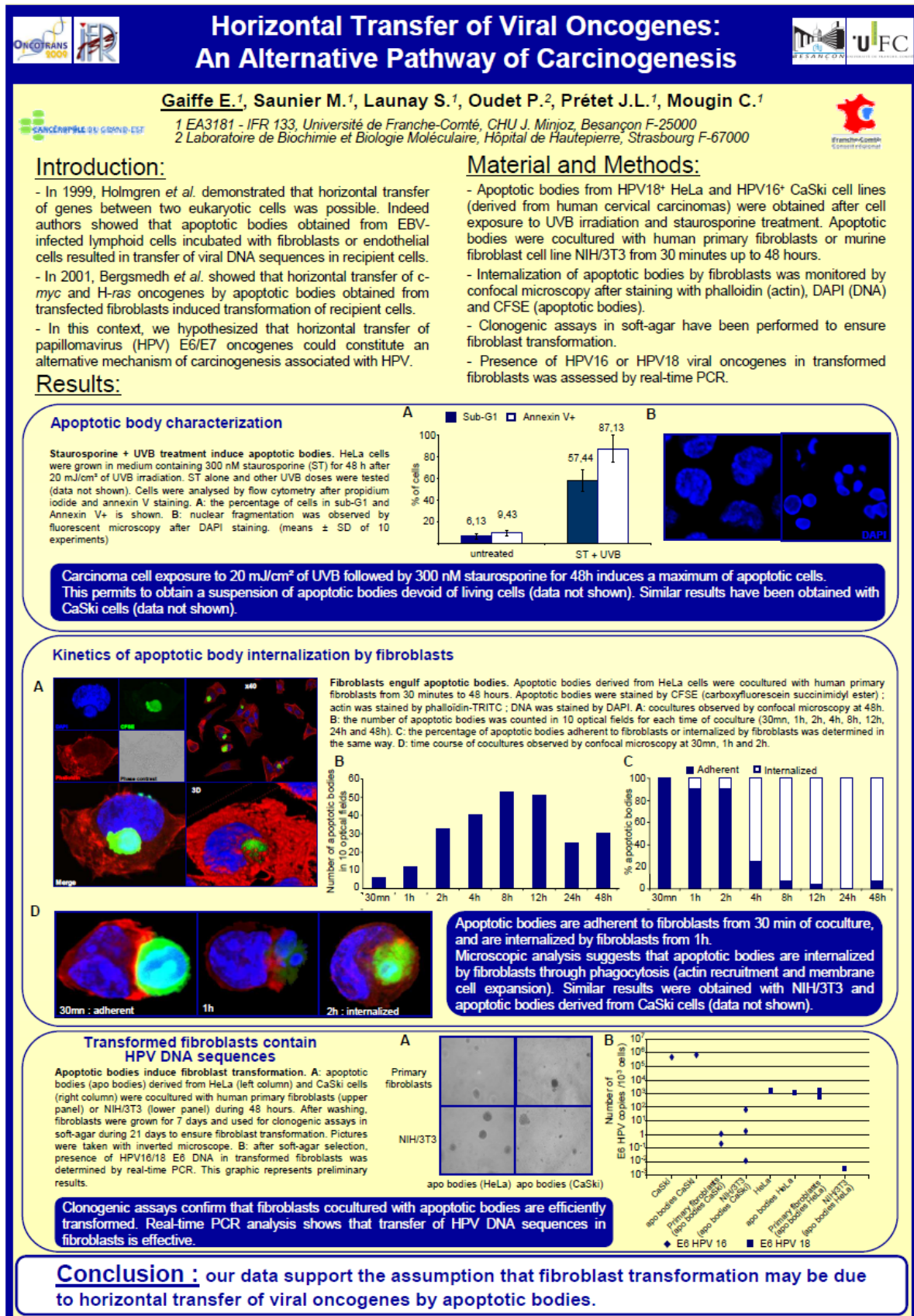
Z

- Zhang, B., Srirangam, A., Potter, D. A. & Roman, A. 2005. HPV16 E5 protein disrupts the c-Cbl-EGFR interaction and EGFR ubiquitination in human foreskin keratinocytes. *Oncogene*, 24, 2585-8.
- Zimmermann, H., Koh, C. H., Degenkolbe, R., O'Connor, M. J., Muller, A., Steger, G., Chen, J. J., Lui, Y., Androphy, E. & Bernard, H. U. 2000. Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *J Gen Virol*, 81, 2617-23.
- zur Hausen, H. 1999. Viruses in human cancers. *Eur J Cancer*, 35, 1174-81.
- zur Hausen, H. 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 92, 690-8.
- zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2, 342-50.

Annexes

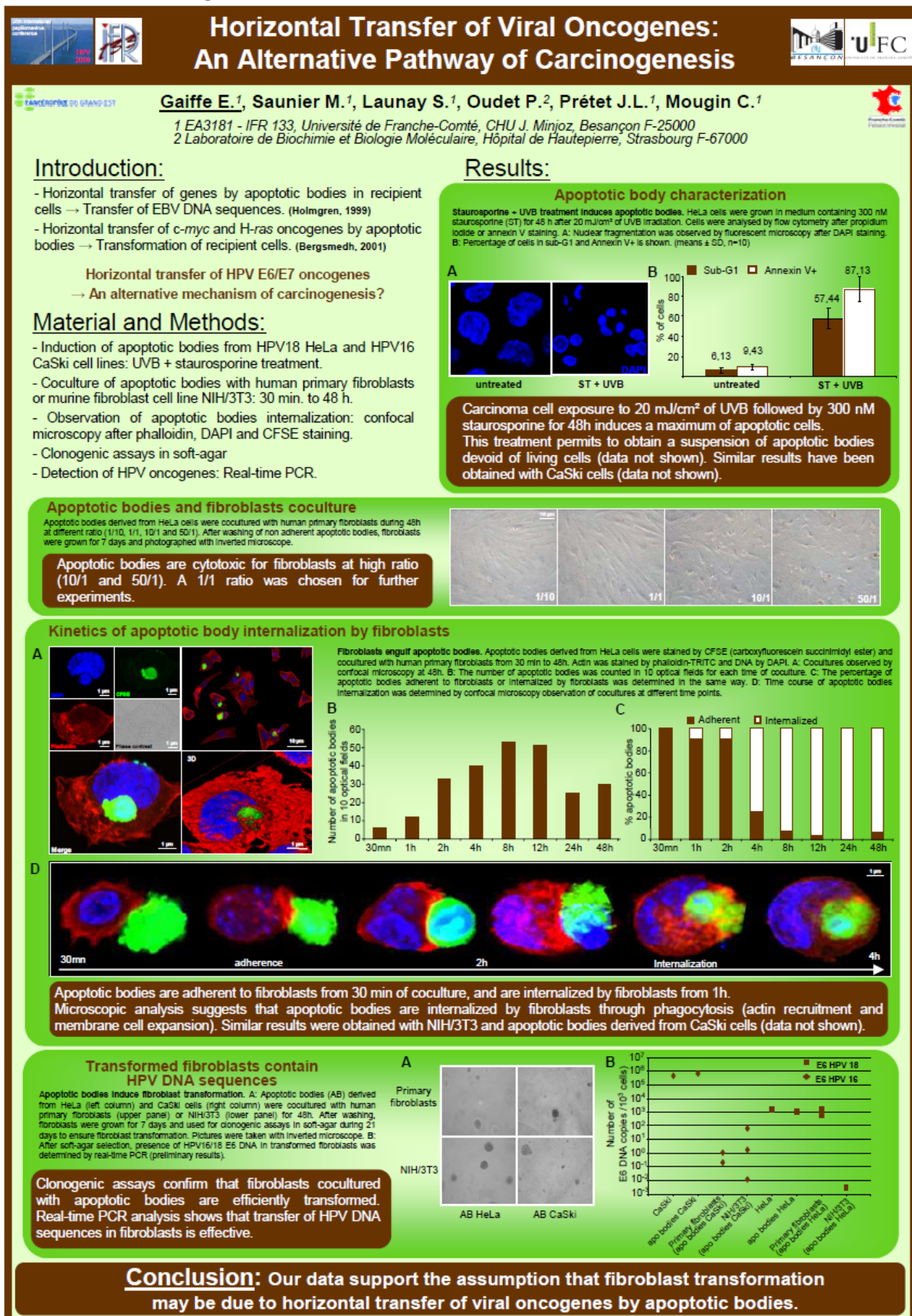
Annexe 1 : poster 1

Présenté à l'occasion d'Oncotrans 2009



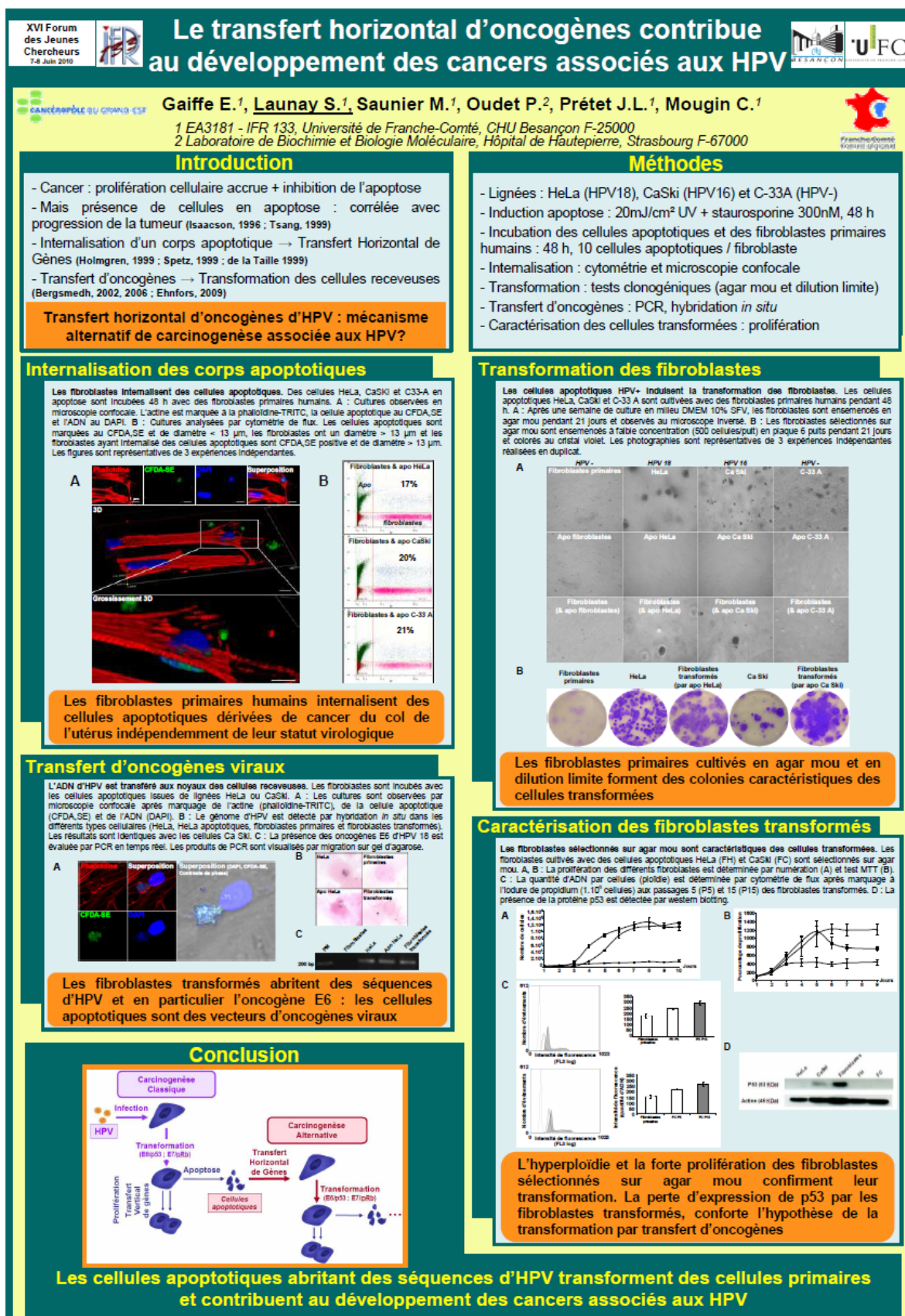
Annexe 2 : poster 2

Présenté lors du congrès IPV2009



Annexe 3 : poster 3

Présenté lors du Forum des jeunes chercheurs 2010 (1er prix poster)



Annexe 4 : Encadrements, enseignements, formations et responsabilités collectives.

Co-encadrements :

- **2009** : Master 1 de Biochimie à l'Université de Franche-Comté. « *Transfert horizontal d'oncogènes viraux par les corps apoptotiques : mécanisme d'incorporation* ». (8 semaines)
- **2009** : ERASMUS en collaboration avec l'université de Portsmouth. « *Transfert horizontal d'oncogènes viraux par les corps apoptotiques : mécanisme d'incorporation* ». (16 semaines)
- **2009/2010** : Master 2 de Biochimie à l'Université de Franche-Comté. « *Mécanismes d'internalisation des corps apoptotiques dérivés de cellules de cancer du col de l'utérus par des fibroblastes humains* ». (6 mois)
- **2009/2010** : 3^{ème} année de médecine, dans le cadre de l'école de l'INSERM de Paris. « *Quantification des ARNm de récepteurs aux phosphatidylsérines dans des cellules épithéliales et des fibroblastes humains* ». (6 mois)
- **2010** : 5^{ème} année de pharmacie, à l'université de Franche-Comté, 2010. « *Amplification de la tumorigénèse par transfert horizontal d'oncogènes viraux* ». (3 mois)

Enseignements :

- **2007-2010** : Moniteur pour la faculté de Médecine Pharmacie (SMP) de Besançon. Enseignement de travaux dirigés en Biologie Cellulaire pour les étudiants en première année de médecine. Enseignement de travaux pratiques pour une unité d'enseignement de première année de master intégrée par des étudiants en médecine à partir de la deuxième année et des étudiants en pharmacie à partir de la troisième année.
- **2010-2011** : Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche à temps plein pour la faculté de Médecine Pharmacie (SMP) de Besançon. Enseignements des travaux pratiques de Biochimie pour les étudiants de 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} année de Pharmacie. Enseignement pour une unité d'enseignement de première année de master intégrée par des étudiants en médecine à partir de la deuxième année et des étudiants en pharmacie à partir de la troisième année.

Formations :

- **2008** : Diplôme « attestation de formation aux premiers secours »
- **2008** : Diplôme Universitaire d'expérimentation animale de niveau 1 (permettant l'établissement de protocole et l'expérimentation animale) à la Faculté de Pharmacie Henri-Poincaré de Nancy
- **2010** : Passage du TOEIC

Responsabilités collectives :

- **2007-2010** : Représentante des doctorants pour l'Ecole Doctorale Homme, Environnement, Santé (Université de Franche comté)
- **2008** : Organisation du XIV^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs à Besançon (Juin 2008)