



HAL
open science

Régulation de l'apoptose dépendante de p53 par le FGF1 intracellulaire : caractérisation des mécanismes d'action

Elisabeth Delmas

► To cite this version:

Elisabeth Delmas. Régulation de l'apoptose dépendante de p53 par le FGF1 intracellulaire : caractérisation des mécanismes d'action. Biologie cellulaire. Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, 2014. Français. NNT : 2014VERS0037 . tel-01339857

HAL Id: tel-01339857

<https://theses.hal.science/tel-01339857>

Submitted on 30 Jun 2016

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 VERSAILLES SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES

École doctorale des Génomes Aux Organismes

THESE DE DOCTORAT

pour l'obtention du diplôme de Docteur
de l'Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines
Spécialité biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement le 8 Décembre 2014

Élisabeth DELMAS

**Régulation de l'apoptose dépendante de p53 par le FGF1
intracellulaire: caractérisation des mécanismes d'action**

Jury :

Docteur Alicia Torriglia	Rapporteur
Professeur Hervé Prats	Rapporteur
Docteur Bruno Blondel	Examineur
Docteur Frédérique Braun	Examineur
Docteur Flore Renaud	Co-Directrice de thèse
Professeur Jean-Luc Vayssière	Directeur de thèse

Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire EA4589 UVSQ/EPHE

UFR des Sciences de la Santé – Simone Veil
2 avenue de la Source de la Bièvre
78180 Montigny-le-Bretonneux

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Bruno Blondel, Frédérique Braun, Hervé Prats et Alicia Torriglia d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de bien vouloir juger mon travail.

Je remercie également Bernard Mignotte de m'avoir accueillie au sein du LGBC, et Jean-Luc Vayssière d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse.

Mes aventures au LGBC ont commencé il y a six ans maintenant... Le temps passe vite, surtout quand on travaille sur des sujets passionnants, entouré de collègues formidables. Il y a dix ans, je rêvais d'être chercheuse et aujourd'hui c'est devenu une réalité ! Qui l'eût cru ?

En premier lieu, un très grand merci à Flore, tout d'abord pour m'avoir acceptée comme stagiaire puis pour m'avoir proposé de faire une thèse. Merci Flore, de m'avoir donné les moyens de concrétiser mon rêve. Merci pour ta patience, tes conseils, ton encadrement et ton implication et merci d'avoir cru en moi. Merci enfin d'avoir pris le temps de relire et de corriger ce manuscrit.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe Bio Cell. La Dream Team c'est nous ! Nadège, merci pour ta bonne humeur, ton optimisme, ton énergie. Merci pour toutes ces manip en binôme, j'ai adoré travailler avec toi. Et merci aussi pour toutes ces discussions moins scientifiques. Grâce à toi je suis incollable sur les vernis à ongles, les Louboutins et les collections H&M. Je te souhaite une très belle carrière d'Ingénieur.

Merci également à Caro, pour toutes ces IP (plus ou moins foireuses), ces heures en pièces de culture et leurs playlist plus ou moins récentes, et pour ton acharnement sur les Western Blot au cours de ces dernières semaines. Merci pour ta bonne humeur constante, ton humour et ta positive attitude. Grâce à toi j'ai appris à relativiser (un peu !). Merci enfin pour tous ces vendredis qui n'en étaient pas vraiment, et pour toutes ces tasses de Nesquik ! Force et courage pour la fin de ta thèse !

Je remercie également Nathalie, ma première voisine de bureau au LGBC. Merci pour tes conseils, ton soutien et tous ces morceaux de chocolat. C'est en partie grâce à toi que j'ai souvent évité l'inanition ! Merci enfin d'avoir pris le temps de relire ce manuscrit ainsi que l'article. Merci à Sylvina pour ses conseils, sa patience et son implication dans ma recherche du protocole d'IP parfait. Tu ne baisses jamais les bras, et toi aussi tu m'as aidée à relativiser.

Merci enfin à Arnaud pour son aide, son humour et ses conseils techniques. J'en profite pour souhaiter la bienvenue à Sevasti au sein de la Dream Team, bon courage pour ta thèse !

Je remercie aussi les membres de l'équipe Bio Cell qui sont depuis partis vers d'autres horizons : Vincent, pour ses conseils et sa rigueur scientifique, Marie B. pour son soutien et sa gentillesse, Tiphane pour sa joie de vivre et son enthousiasme, et Aida pour ses connaissances et son soutien.

Je tiens ensuite à remercier tous les autres thésards et post-doc du LGBC pour la bonne humeur, le soutien et l'entraide qu'ils entretiennent au sein du LGBC. Merci à Cécile et à Gérald pour leurs conseils et leurs encouragements, à Angéline (que la Force soit avec toi !), à Yohan (il doit rester quelques Schokobons dans mon bureau...), à Amandine pour sa complicité et son soutien, à Jessica pour son humour et le covoiturage, à Laurine pour son sourire et à Vincent, toujours prêt à partager ses chips. Merci à vous tous, grâce à votre amitié et votre soutien, les phases « down » ne durent jamais !

Je remercie enfin tous les membres du labo, qui, grâce à leur humour et leurs conseils entretiennent une ambiance agréable au LGBC. Merci donc à Isabelle et Aurore le duo de choc, Seb G. pour tes corrections d'anglais et pour les stats, à Jean-Marc et Seb S. les hommes-mouches, à Sophie, Marcelle et Christine les piliers du labo : que ferait-on sans vous ?

Je tiens à remercier mes ami-e-s et en particulier Marie S. et Charlotte pour leur présence et leurs encouragements tout au long de ma thèse. Merci également à Brice, Laura, Mathieu, Hélène, David et Émilie pour qui mon sujet de recherche est parfois un peu obscur, mais qui ont toujours cru en moi.

Je remercie ma famille : ma grand-mère, mes oncles et tantes et surtout mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée. Merci à Flo, toujours là pour moi !

Enfin, un très grand merci à Sambou, qui m'a supportée avec une patience et une sérénité sans faille tout au long de la rédaction de ma thèse. Tu mérites une médaille !

Sommaire

SOMMAIRE.....	1
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION.....	11
I. La famille des Fibroblast Growth Factors (FGFs) : modes d'action et activités biologiques.....	12
1 La famille des FGFs.....	12
1.1 Généralités	12
1.2 Structure des FGFs	14
1.3 Mode d'action	14
1.4 Classification.....	14
1.5 Activités biologiques	16
2 Les récepteurs aux FGFs et leurs voies de signalisation	16
2.1 Les récepteurs de haute affinité : les FGFRs	18
a) Structure des FGFRs	18
b) Activation des FGFRs	18
2.2 Les récepteurs de basse affinité : les HSPG.....	20
a) Structure.....	20
b) Partenaires protéiques.....	20
c) Rôles biologiques	20
d) HSPGs : récepteurs ou co-récepteurs des FGFs	22
2.3 Voies de signalisation induites par les FGFRs.....	22
3 Rôles physiologiques et pathologiques des FGFs et FGFRs	24
3.1 Rôles physiologiques des FGFs	24
3.2 Pathologies associées à des altérations de la signalisation des FGFs.....	26
II. Le FGF1 : un facteur de croissance intracellulaire.....	27
1 Découverte et caractérisation du FGF1	28
2 Gène, promoteurs et régulations transcriptionnelles du FGF1	30
2.1 Les différents promoteurs du gène <i>fgf1</i>	30
2.2 Régulation des promoteurs du gène <i>fgf1</i>	30
a) Les promoteurs 1.A, 1.C et 1.D.....	30

b)	Le promoteur 1.B	32
3	Structure du FGF1 et modifications post-traductionnelles	34
3.1	Structure du FGF1	34
3.2	Modifications post-traductionnelles du FGF1	34
4	Modes d'action du FGF1	36
4.1	Activités extracellulaires du FGF1	36
a)	La voie de sécrétion atypique du FGF1	36
b)	Internalisation du FGF1 extracellulaire	38
4.2	Activités du FGF1 intracellulaire.....	39
a)	Implication du FGF1 intracellulaire dans le développement et la différenciation cellulaire	39
b)	Rôle du FGF1 intracellulaire dans la survie cellulaire	40
c)	Le FGF1 intracellulaire : activités mitogéniques et oncogéniques	41
d)	Les partenaires protéiques du FGF1 intracellulaire	42
III.	Les facteurs de croissance intracellulaires	46
1	Les FGFs intracellulaires.....	46
1.1	Le FGF2	46
a)	Le FGF2 de faible poids moléculaire.....	47
b)	Les FGF2 de haut poids moléculaire.....	47
1.2	Le FGF3	47
1.3	Les FGFs 11 à 14	48
2	Internalisation des facteurs de croissance et de leurs récepteurs	48
2.1	Internalisation des FGFRs	49
2.2	Internalisation du NGF et de ses récepteurs	49
2.3	Internalisation du VEGF et de ses récepteurs	50
2.4	Internalisation de l'EGF et de ses récepteurs.....	50
IV.	La protéine p53	52
1	Structure et localisation de p53.....	52
1.1	Structure de la protéine p53	52
1.2	Localisation de la protéine p53	54
2	Modifications post-traductionnelles de p53.....	54
2.1	Ubiquitinylation.....	56
2.2	Phosphorylation	56
2.3	Acétylation	57
3	Activités oncosuppressives de la protéine p53.....	57
3.1	p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire	58
3.2	p53 et la réparation de l'ADN.....	58
a)	Activités non transcriptionnelles de p53.....	58

b)	Activités transcriptionnelles de p53	60
3.3	p53 et l'apoptose	60
a)	Activités non transcriptionnelles de p53	61
b)	Activités transcriptionnelles de p53	61
V.	L'apoptose	64
1	Généralités sur l'apoptose	64
2	Les Caspases	64
2.1	Structure, activation et activités des caspases	66
a)	Structure et activation des caspases	66
b)	Activités et substrats des caspases	68
2.2	Les protéines IAP : inhibiteurs des caspases	68
3	Les voies de signalisation de l'apoptose	70
3.1	La voie extrinsèque de l'apoptose	70
a)	Le récepteur Fas et le complexe DISC	72
b)	Le récepteur TNF-R1 et le Complexe II	72
3.2	La voie intrinsèque de l'apoptose	72
a)	La famille Bcl-2	74
b)	Évènements mitochondriaux et formation de l'apoptosome	76
VI.	Projet de recherche	78
1	Travaux précédemment menés dans l'équipe	78
2	Projet de thèse	80

RESULTATS **83**

I. Caractérisation des activités neurotrophique et anti-apoptotique intracellulaires du FGF1 dans les cellules PC12. **85**

II. Étude de l'interaction entre la protéine p53 et les différentes formes de FGF1 dans les cellules PC12 111

1	Stratégie d'étude	113
2	Le FGF1 ^{K132E} interagit-il avec la protéine p53 ?	113
3	Les formes mutantes FGF1 ^{S130A} et FGF1 ^{S130D} interagissent-elles avec la protéine p53 ?	115
4	Conclusion	116

DISCUSSION **118**

1	Localisation subcellulaire des différentes formes de FGF1	120
2	Activités intracellulaires du FGF1 ^{K132E}	122
2.1	La mutation K132E inhibe l'activité neurotrophique du FGF1	122

2.2	La mutation K132E inhibe l'activité anti-apoptotique du FGF1	124
3	Activités intracellulaires des formes FGF1 ^{S130A} et FGF1 ^{S130D}	125
3.1	Les formes mutantes FGF1 ^{S130A} et FGF1 ^{S130D} induisent la différenciation des cellules PC12.	125
3.2	Le FGF1 ^{S130A} présente une activité anti-apoptotique contrairement au FGF1 ^{S130D}	126
4	Interaction des différentes formes de FGF1 avec la protéine p53	128
4.1	Implication du FGF1 dans un complexe protéique régulateur de la transcription.	128
4.2	Implication du FGF1 dans des complexes protéiques régulateurs de la voie de signalisation de l'apoptose dépendante de p53.	130
5	Conclusions et perspectives.....	131

BIBLIOGRAPHIE134

ANNEXES163

Liste des Figures

Figure 1 : Représentation de la structure primaire des FGFs.....	13
Figure 2 : Les différents modes d'action des FGFs.	13
Figure 3 : Arbre phylogénétique de la famille des FGFs.	15
Figure 4 : Structure des FGFRs.....	17
Figure 5 : Structure des HSPGs membranaires.	19
Figure 6 : Voies de signalisation activées par les FGFRs.	21
Figure 7 : Le FGF1, du gène à la protéine.	29
Figure 8 : Régulations transcriptionnelles du gène <i>fgf1</i>	31
Figure 9 : Représentation des structures primaire, secondaire et tertiaire du FGF1.	33
Figure 10 : Activités du FGF1.	35
Figure 11 : Les différents modes d'action du FGF1.	35
Figure 12 : Sécrétion atypique du FGF1.	37
Figure 13 : Internalisation du FGF1.....	37
Figure 14 : Isoformes du FGF2.....	45
Figure 15 : Activités de p53.	51
Figure 16 : Structure de p53.....	51
Figure 17 : Modifications post -traductionnelles de p53.	53
Figure 18 : Régulation du niveau et de l'activité de p53.	55
Figure 19 : Phosphorylations de p53 : de nombreux stimuli et de nombreuses kinases.	55
Figure 20 : p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire.....	59
Figure 21 : Les deux voies principales de l'apoptose.	63
Figure 22 : Structure des caspases.....	65
Figure 23 : Clivage des caspases effectrices.	65
Figure 24 : Structure des protéines de la famille des IAPs.	67
Figure 25 : Induction de la formation du complexe DISC par FasL.....	69
Figure 26 : Induction de la formation du complexe I et II par le TNF α	71
Figure 27 : Structure des membres de la famille Bcl-2.....	73
Figure 28 : Formation de l'apoptosome.	75
Figure 29 : Le FGF1 intracellulaire a une activité anti-apoptotique dans les cellules REtsAF.	79

Figure 30 : La localisation nucléaire du FGF1 est nécessaire à son activité anti-apoptotique dans les cellules PC12.	79
Figure 31 : Le FGF1 est phosphorylé par la PKC δ	81
Figure 32: Activités intracellulaires des différentes formes de FGF1.	84
Figure 33: La protéine p53 interagit avec le FGF1 ^{K132E}	112
Figure 34: La phosphorylation du FGF1 semble inhiber son interaction avec p53.	114

Liste des abréviations

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AIF : Apoptosis Inducing Factor
Anx2 : Annexine 2
Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor -1
APE1 : Apurinic Endonuclease 1
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
ATM : Ataxia Telangectasia Mutated
ATP : Adénosine Tri Phosphate
ATR : Ataxia Telangectasia and Rad3 related

B

Bad : Bcl-2 antagonist of cell death
Bak : Bcl-2 antagonist killer
Bax : Bcl-2 Associated X protein
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
BER : Base Excision Repair
BH : Bcl-2 Homology
Bid : Bh3 Interacting Death domain agonist
BIR : Baculovirus IAP Repeat

C

Ca²⁺ : Calcium
CAD : Caspase Activated DNase
CARD : Caspase Recruitment Domain
Caspase : Cysteiny Aspartate Protease
CBP : CREB Binding Protein
Cdk : Cycline-dependent kinase
Chk1 : Checkpoint kinase 1
Chk2 : Checkpoint kinase 2
CK2 : Casein Kinase 2
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CREB : C-AMP Response Element-binding protein
C-Ter : Carboxy-Terminal

D

DAG : Diacylglycérol
DD : Death Domain
DED : Death Effector Domain
DIABLO : Direct IAP-Binding protein with Low PI

DISC : Death Inducing Signaling Complex
DNA-PK : DNA-Protein Kinase
 $\Delta\psi_m$: potentiel membranaire mitochondrial

E

EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EndoG : Endonuclease G

F

FADD : Fas-Associated Death Domain Protein
FGF : Fibroblast Growth Factor
FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor
FHF : Fibroblast growth factor Homologous Factors
FIBP : FGF Intracellular Binding Protein
FIF : FGF2 Interacting Factor
FRS2 α : FGFR Substrate 2

G

GAB1 : Grb2-Associated Binding protein
GADD45 : Growth Arrest and DNA Damage 45
GlcN : α -D Glucosamine
Grb2 : Growth Factor Receptor-bound protein 2

H

HS : Héparane Sulfate
Hsp : Heat Shock Protein
HSPG : Héparanes Sulfate Protéoglycanes

I

IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein
IB2 : Islet Brain 2
ICAD : Inhibitor of Caspase Activated DNase
IGFR : Insulin-like Growth Factor Receptor
Ig-like : Immunoglobuline-like
IL-1 : Interleukine-1
IL-6 : Interleukine-6
IP₃ : Inositol 1,4,5-trisphosphate

K

Kb : Kilobase
kDa : kiloDalton
Kpn : Kariophérine

L

LRRC59 : Leucine Rich Repeat Containing 59

M

MAPK : Mitogen Associated Protein Kinase

MDM2 : Mouse Double Minute 2

MLH1 : MutL Homolog 1

MMR : Mismatch Repair

MSH2 : MutS protein homolog 2

N

NER : Nucleotide Excision Repair

NES : Nuclear Export Sequence

NFκB : Nuclear Factor Kappa B

NGF : Nerve Growth Factor

NHEJ : Non Homologous End-Joining

NLS : Nuclear Localization Sequence

NoBP : Nucleolar FGF3 Binding Protein

N-Ter : amino-terminal

O

OGG1 :8-Oxoguanine DNA Glycosylase

P

p40 Syt1 : fragment p40 de la Synaptotagmine 1

p48XPE : p48 Xeroderma Pigmentosum E

PARP : Poly-ADP Ribose Polymerase

PDK : Pyruvate Dehydrogenase Kinase

PI3K : Phosphatidylinositide 3-kinase

PIP₂ : Phosphatidylinositol (4,5) biPhosphate

PIP₃ : Phosphatidylinositol (3,4,5) triPhosphate

PKC δ : Protein Kinase C delta

PKC : Protein Kinase C

PLC γ : PhosphoLipase C gamma

PMS2 : Postmeiotic Segregation increased 2

PTB : PhosphoTyrosine Binding

R

Ras : Rat Sarcoma

RBA : Récepteur de Basse Affinité

RE : Reticulum Endoplasmique

Ref1 : Redox-Factor 1

RFX : Regulator Factor of X-Box
RING : Really Interesting New Gene
RIP1 : Receptor-Interacting Protein kinase 1
RpS2 : Ribosomal protein S2
RSK : Ribosomal protein S6 kinase
RTK : Récepteurs à activité Tyrosine Kinase

S

Sef : Similar Expression of *fgf* gene
SH2 : Src Homology 2
Shp-2 : SH2 domain-containing phosphate-2
SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
Smac : Second Mitochondria-derived Activator of Caspase
SMN : Survival Motor Neuron
SNC : Système Nerveux Central
SOS : Son of Sevenless
SphK1 : Sphingosine Kinase 1
Spry : Sprouty
Src : Gène du virus du Sarcome de Rous
SRE : Serum Response Element

T

TGF-R : Transforming Growth Factor Receptor
TGFβ : Transforming Growth Factor Beta
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNF-R : Tumor Necrosis Factor Receptor
TRADD : TNF-R1-Associated Death Domain protein
TRAF : TNF-R-Associated Factor
TRAIL-R : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor
Trk : Tyrosine kinase receptor
Tyr : Tyrosine

U

UBF : Upstream Binding Factor

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

X

XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis
XPC : Xeroderma Pigmentosum C

Introduction

I. La famille des Fibroblast Growth Factors (FGFs) : modes d'action et activités biologiques

1 La famille des FGFs

1.1 Généralités

Les premiers membres de la famille des FGFs (Fibroblast Growth Factor) à avoir été identifiés sont le FGF1 et le FGF2. Ils ont été purifiés à partir d'hypophyse de bovin et décrits comme des facteurs mitogéniques des fibroblastes (Gospodarowicz, 1974). Actuellement, on dénombre 22 membres de la famille des FGFs chez les mammifères, les FGFs 1 à 23 ; les gènes *fgf9* chez la souris et *fgf15* chez l'humain étant orthologues (Itoh and Ornitz, 2011). Les FGFs sont exprimés dans tous les organismes pluricellulaires. Ainsi, la famille des FGFs comprend 28 membres chez le poisson-zèbre (Itoh, 2007). On retrouve dans cet organisme tous les FGFs présents chez les mammifères, à l'exclusion du FGF9. Cette multiplication des membres de la famille des FGFs chez le poisson-zèbre s'explique par la duplication partielle de son génome. D'autre part, il existe deux FGFs chez *C.elegans* : Egl-17 et Let-756, et trois chez *D.melanogaster* : Branchless, Thisbe et Pyramus (Tulin and Stathopoulos, 2010).

Les FGFs sont pour la plupart des facteurs de croissance extracellulaires qui agissent *via* la liaison et l'activation de leurs récepteurs, les FGFRs (Fibroblast Growth Factor Receptor). L'activation des FGFRs induit différentes cascades de signalisation, en fonction du FGF impliqué et du récepteur activé.

Les FGFs sont impliqués dans un grand nombre de mécanismes cellulaires physiologiques ou pathologiques, que ce soit au cours du développement ou à l'âge adulte. En effet, les FGFs et leurs différentes voies de signalisation peuvent contrôler la prolifération, la différenciation ou la survie cellulaire. Ils sont également impliqués dans le développement embryonnaire et la morphogenèse, mais également dans les processus d'angiogenèse (physiologique, au cours du développement ou pathologique dans les cas de cancer) et de tumorigenèse (Wiedlocha and Sorensen, 2004; Itoh, 2007; Wesche et al., 2011).

Toutefois, les mécanismes d'action des FGFs restent encore pour certains mal connus. C'est le cas notamment pour les FGFs intracellulaires comme les FGFs 1 et 2, certaines isoformes du FGF3, ainsi que les FGFs 11 à 14.

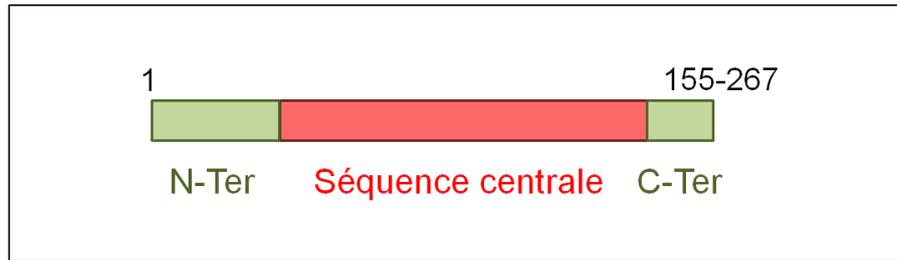


Figure 1 : Représentation de la structure primaire des FGFs.

Les FGFs sont composés d'une séquence centrale conservée d'environ 120 acides aminés et de domaines variables en positions N-terminale (N-Ter) et C-terminale (C-Ter). Cette séquence centrale est composée de 12 feuillets β antiparallèles. Le domaine N-Ter peut contenir des séquences signal permettant la sécrétion ou la localisation nucléaire des FGFs. Le domaine C-Ter peut contenir des sites d'interaction avec l'héparine. D'après (Dailey et al., 2005; Itoh and Ornitz, 2011).

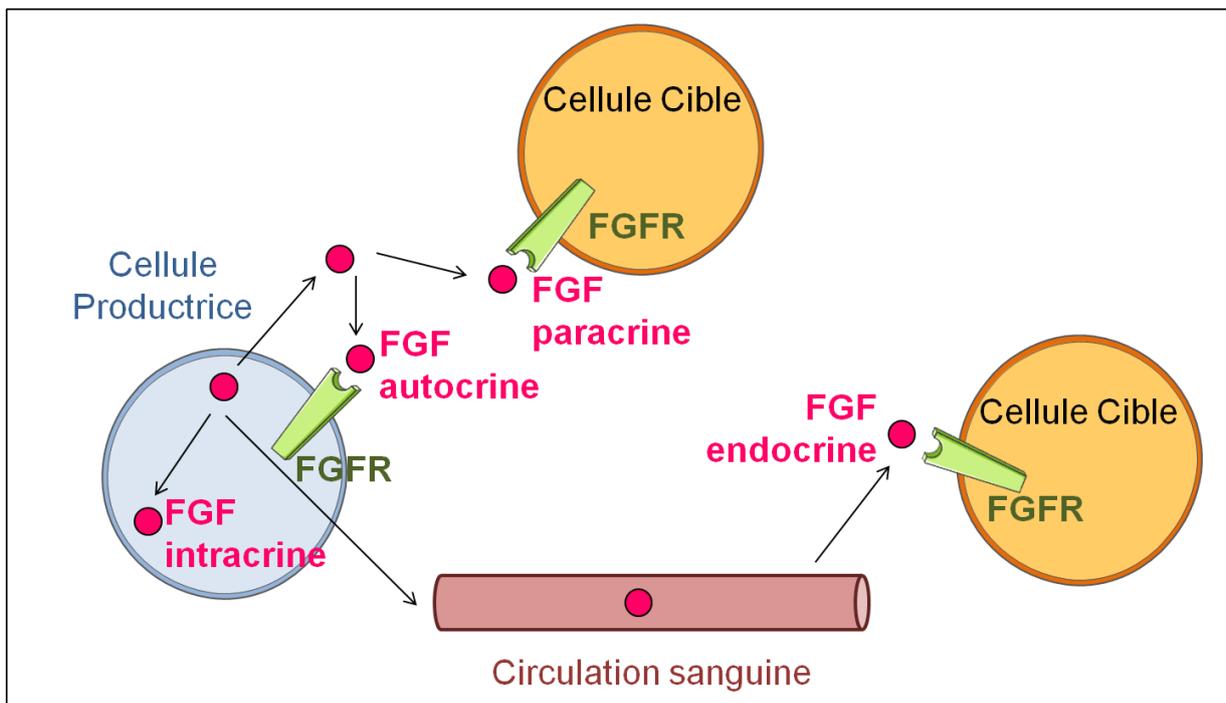


Figure 2 : Les différents modes d'action des FGFs.

4 modes d'action ont été principalement décrits. Les FGFs paracrines sont sécrétés et agissent sur les cellules cibles voisines (mode d'action paracrine) ou productrices (mode d'action autocrine) *via* leurs récepteurs FGFRs. Les FGFs endocrines sont également sécrétés, mais transitent par la circulation sanguine avant d'agir sur des cellules cibles éloignées. Ils agissent *via* les FGFRs. Les FGFs intracrines ne sont pas sécrétés. Leur activité s'exerce uniquement dans les cellules qui les synthétisent. Ce mode d'action est indépendant des FGFRs. D'après (Sasaki, 2011).

1.2 Structure des FGFs

Les FGFs sont de petites protéines dont la taille est comprise entre 17 kDa et 34 kDa. Tous les membres de la famille des FGFs possèdent une séquence centrale d'environ 120 acides aminés fortement conservée (entre 30% et 60% d'identité). Ce domaine central est constitué de 12 feuillets β antiparallèles (Mohammadi et al., 2005; Oulion et al., 2012). Les domaines N-terminaux et C-terminaux des FGFs sont variables et peuvent contenir ou non des séquences d'adressage comme des peptides signal de sécrétion ou des séquences de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localization Sequence) (**Figure 1**). Le domaine C-terminal des FGFs leur permet d'interagir avec les FGFRs et les HSPGs (Héparanes Sulfates ProtéoGlycanes).

1.3 Mode d'action

La plupart des FGFs sont sécrétés et agissent *via* leur fixation sur des récepteurs transmembranaires de haute affinité, les FGFRs. Ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase, qui peuvent induire un grand nombre de voies de signalisation différentes suite à la liaison de leurs ligands spécifiques, les FGFs.

Toutefois, tous les FGFs ne sont pas sécrétés et certains d'entre eux peuvent agir *via* des voies strictement intracellulaires. Ainsi, on distingue quatre mécanismes d'action possibles pour les FGFs (Itoh and Ornitz, 2011) (**Figure 2**) :

- Paracrine et autocrine : modes d'action les plus couramment décrits. Les FGFs, produits par des cellules sécrétrices, se fixent sur les FGFRs de cellules voisines (mode d'action paracrine) ou des cellules productrices (mode d'action autocrine) et les activent.
 - Endocrine : les FGFs sont sécrétés puis passent par la circulation sanguine pour aller se fixer sur les FGFRs de leurs cellules cibles.
 - Intracrine : activité intracellulaire de FGFs non sécrétés, indépendamment des FGFRs.
- Les FGFs peuvent ainsi être classés en fonction de leurs modes d'action.

1.4 Classification

La grande diversité des membres de la famille des FGFs a conduit à l'élaboration de plusieurs méthodes de classification au cours de ces dernières années, en fonction de leurs modes d'action ou de la phylogénie des gènes *fgf* (Popovici et al., 2005; Itoh and Ornitz, 2011).

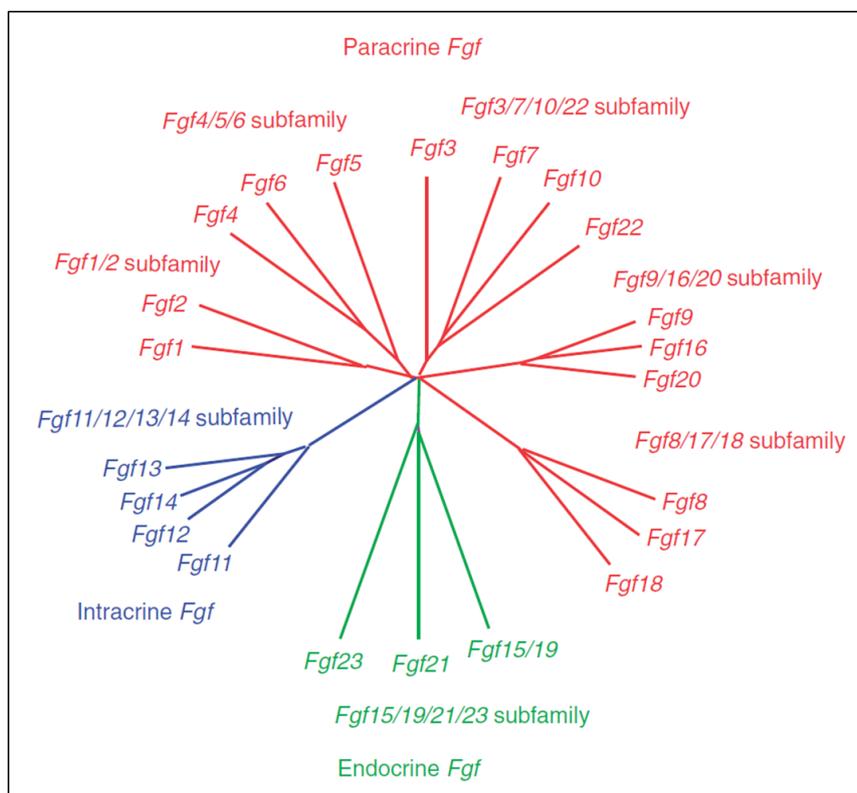


Figure 3 : Arbre phylogénétique de la famille des FGFs.

Les FGFs sont classés en plusieurs sous-familles en fonction de leur mode d'action et de leur proximité phylogénétique (Itoh and Ornitz, 2011).

Suite à une analyse phylogénétique, N.Itoh et DM.Ornitz distinguent, dans l'une des classifications les plus récentes, 7 sous-familles de FGFs : les sous-familles **FGF1/2** ; **FGF4/5/6** ; **FGF3/7/10/22** ; **FGF9/16/20** et **FGF8/17/18** regroupent les FGF **paracrines**; la sous-famille **FGF15/19/21/23** comprend les FGFs **endocrines** et les FGFs **intracrines** comprennent la sous-famille **FGF11/12/13/14** (**Figure 3**) (Itoh and Ornitz, 2011).

Les FGFs **intracrines** de type FHF (Fibroblast growth factor Homologous Factor), les FGFs 11 à 14 ne sont pas sécrétés et agissent de façon strictement intracellulaire, indépendamment des FGFRs. Ces FGFs peuvent réguler l'excitabilité électrique des neurones.

Les FGFs **paracrines** sont pour la plupart sécrétés et agissent *via* les FGFRs présents sur des cellules avoisinantes (activité paracrine) ou sur les cellules productrices (activité autocrine). Toutefois, il est à noter que les FGFs 1 et 2, généralement classés dans ce groupe, sont dépourvus de peptide signal de sécrétion. Les FGFs 1, 2 et 3 peuvent être transloqués dans le noyau et avoir des activités intracrines.

Les FGFs **endocrines** agissent également *via* les FGFRs. Ils passent par la circulation sanguine pour atteindre leurs cellules cibles, qui sont généralement éloignées.

La caractérisation de nouvelles activités biologiques des FGFs ou la mise en évidence de nouveaux modes d'action pourraient faire évoluer cette classification.

1.5 Activités biologiques

La signalisation des FGFs (extracellulaires ou intracellulaires) est impliquée dans un grand nombre de processus physiologiques ou pathologiques. Les FGFs peuvent notamment induire la prolifération, la différenciation ou la survie cellulaire. Ils sont également impliqués dans la migration cellulaire, le développement embryonnaire, la réparation tissulaire. Mais les FGFs peuvent aussi, suite à une surexpression ou à une dérégulation de leurs voies de signalisation, entraîner la tumorigenèse et la vascularisation des tumeurs (Ornitz and Itoh, 2001; Wiedlocha and Sorensen, 2004; Eswarakumar et al., 2005).

2 Les récepteurs aux FGFs et leurs voies de signalisation

Il existe deux types de récepteurs extracellulaires aux FGFs : les récepteurs de haute affinité (FGFRs) et les récepteurs de basse affinité (RBA). Ces derniers peuvent agir soit indépendamment des FGFRs, soit comme des co-récepteurs des complexes FGFs, notamment en renforçant l'interaction FGF/FGFR et en prolongeant le signal médié par les FGFs.

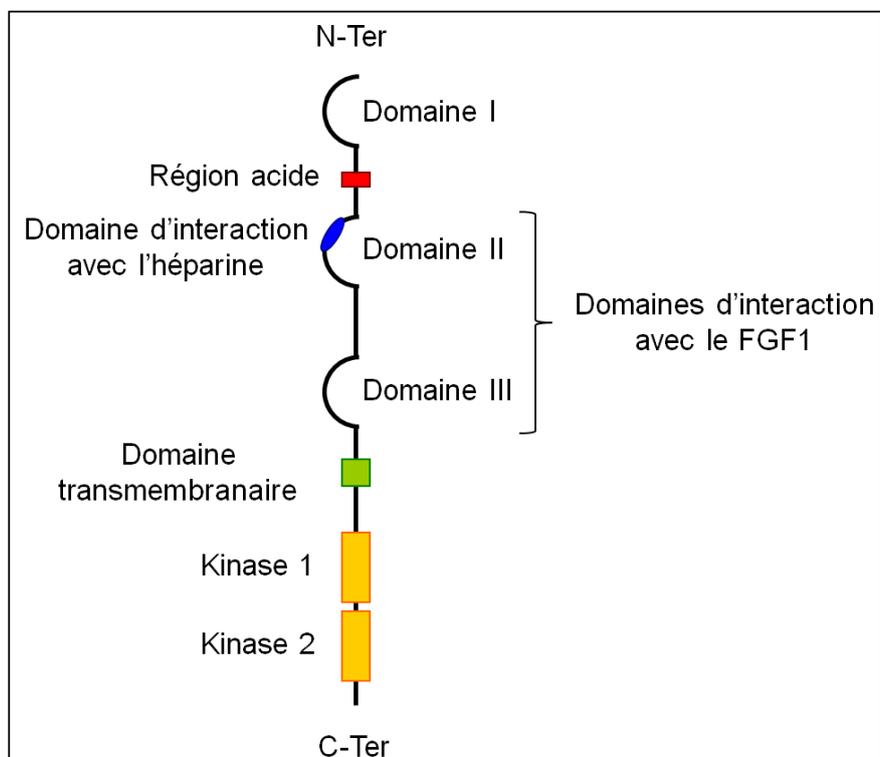


Figure 4 : Structure des FGFRs.

Les FGFRs sont constitués d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique. Le domaine extracellulaire comprend 2 ou 3 domaines Ig-like (domaines I à III), une région acide (en rouge) et un domaine d'interaction avec les HSGPs sur le domaine II (en bleu). Le domaine cytoplasmique contient 2 domaines à activité tyrosine kinase (en jaune), qui sont phosphorylés et activés suite à la liaison des FGFs aux FGFRs. D'après (Powers et al., 2000).

2.1 Les récepteurs de haute affinité : les FGFRs

a) Structure des FGFRs

Les FGFs sécrétés exercent leurs activités biologiques en se fixant à leurs récepteurs de haute affinité, les FGFRs et en les activant. Ce sont des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (RTK). Ils ont été mis en évidence et caractérisés au cours des années 1980 (Friesel et al., 1986; Moenner et al., 1986; Neufeld and Gospodarowicz, 1986; Moscatelli, 1987; Blanquet et al., 1989).

Il existe 4 FGFRs, les FGFR1 à 4, présentant entre 55% et 72% d'homologie (Powers et al., 2000). Les FGFRs sont codés par 4 gènes, les gènes *fgfr1* à *fgfr4* (Itoh and Ornitz, 2011). Des épissages alternatifs permettent d'obtenir différentes isoformes des FGFRs dont le nombre ou la séquence des domaines extracellulaires Ig-like varient. Les FGFs ne se fixent pas tous sur les différentes isoformes des FGFRs : la spécificité des interactions FGF-isoformes des FGFRs permettent l'activation d'un grand nombre de voies de signalisation différentes (Zhang et al., 2006). Les FGFRs sont composés (Zhang et al., 2006; Polanska et al., 2009) :

- d'un **domaine extracellulaire**, permettant notamment la fixation du ligand (FGFs)
- d'un domaine transmembranaire
- d'un **domaine cytoplasmique** présentant le domaine à activité tyrosine kinase.

Le **domaine extracellulaire** est composé de 2 ou 3 domaines appelés Ig-like (Immunoglobuline-like), nommés D1 à D3 (ou I à III) qui contrôlent la reconnaissance du ligand par le récepteur, et d'une région riche en acides aminés acides située entre les domaines D1 et D2 (Polanska et al., 2009). De plus, la région D2 comporte une séquence riche en acides aminés chargés positivement, c'est le site d'interaction avec l'héparine et les HSPGs (Powers et al., 2000) (**Figure 4**).

Le **domaine cytoplasmique** contient une région présentant une activité tyrosine kinase. Sur le FGFR1, ce domaine comprend 7 tyrosines (Tyr) pouvant être phosphorylées, dont les tyrosines en position 653 et 654, qui jouent un rôle majeur dans l'activité catalytique du récepteur (Wiedlocha and Sorensen, 2004).

b) Activation des FGFRs

Les récepteurs des FGFs possèdent un domaine à activité tyrosine kinase bipartite. Ce domaine est activé par transphosphorylation suite à la dimérisation des récepteurs. Ce mécanisme de dimérisation est indispensable à l'activation des FGFRs. Il requiert la liaison de FGF (ligand) aux FGFRs, ainsi que la présence des chaînes HS (Héparane Sulfate) de

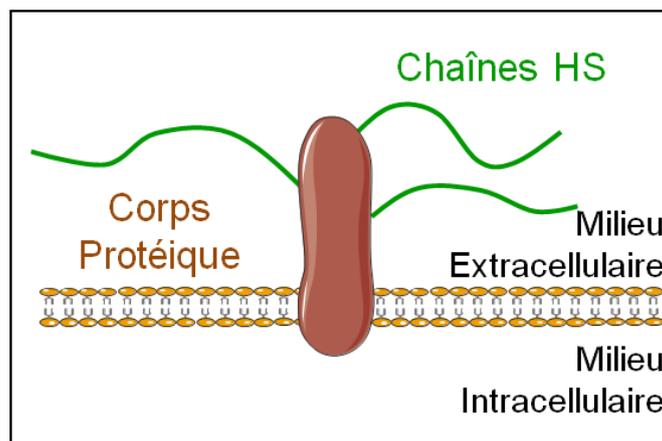


Figure 5 : Structure des HSPGs membranaires.

Les HSPGs membranaires sont constitués d'un corps protéique ancré dans la membrane plasmique, lié covalamment à des chaînes héparane sulfate (HS) (Sarrazin et al., 2011).

l'héparine ou des HSPGs, (Dailey et al., 2005; Lemmon and Schlessinger, 2010). Il a été montré que les récepteurs interagissent avec les FGFs *via* leurs domaines extracellulaires Ig-like D2 et D3 et la région qui les lie (région D2-D3). En outre, les FGFRs et les FGFs possèdent une affinité pour les HSPGs, qui contribuent à stabiliser les complexes FGF-FGFR (Plotnikov et al., 1999; Stauber et al., 2000).

2.2 Les récepteurs de basse affinité : les HSPG

a) Structure

Les HSPGs sont les récepteurs de basse affinité des FGFs les plus décrits. Ce sont des glycoprotéines contenant une ou plusieurs chaînes héparane sulfate. Les HSPGs sont constitués d'un corps protéique, comme les syndecans ou les glypicans, auquel sont liées covalamment une ou plusieurs chaînes héparane sulfate (HS) (**Figure 5**). Les corps protéiques présentent des résidus sérine, permettant la fixation d'un tétrasaccharide à partir duquel des glycosyltransférases vont permettre l'élongation des chaînes HS. Ces chaînes héparane sulfate sont des polymères linéaires composés d'une alternance d' α -D-Glucosamine (GlcN) et d'acide uronique qui peuvent être N-sulfatés ou N-acétylés (Dreyfuss et al., 2009; Sarrazin et al., 2011). Les HSPGs sont classés en trois groupes en fonction de leur localisation subcellulaire :

- les HSPGs membranaires (syndecans, glypicans)
- les HSPGs sécrétés dans la matrice extracellulaire (agrine, perlecan, collagène XVIII)
- les HSPGs présents dans les vésicules de sécrétion (serglycine)

b) Partenaires protéiques

La grande diversité structurelle des chaînes HS leur permet d'interagir avec un grand nombre de protéines comme par exemple des facteurs de croissance (FGF, VEGF...) ou des cytokines. Les chaînes HS ont une forte affinité pour les séquences riches en acides aminés basiques présentes au sein de ces protéines (Dreyfuss et al., 2009). Les chaînes HS permettent ainsi de créer des « stocks » de facteurs de croissance ou de cytokines au niveau de la matrice extracellulaire, les protégeant de la dégradation (Sarrazin et al., 2011).

c) Rôles biologiques

Les HSPGs jouent des rôles importants dans la modulation de la fonction cellulaire, notamment au cours du développement embryonnaire (Chu et al., 2005). Les HSPGs situés au

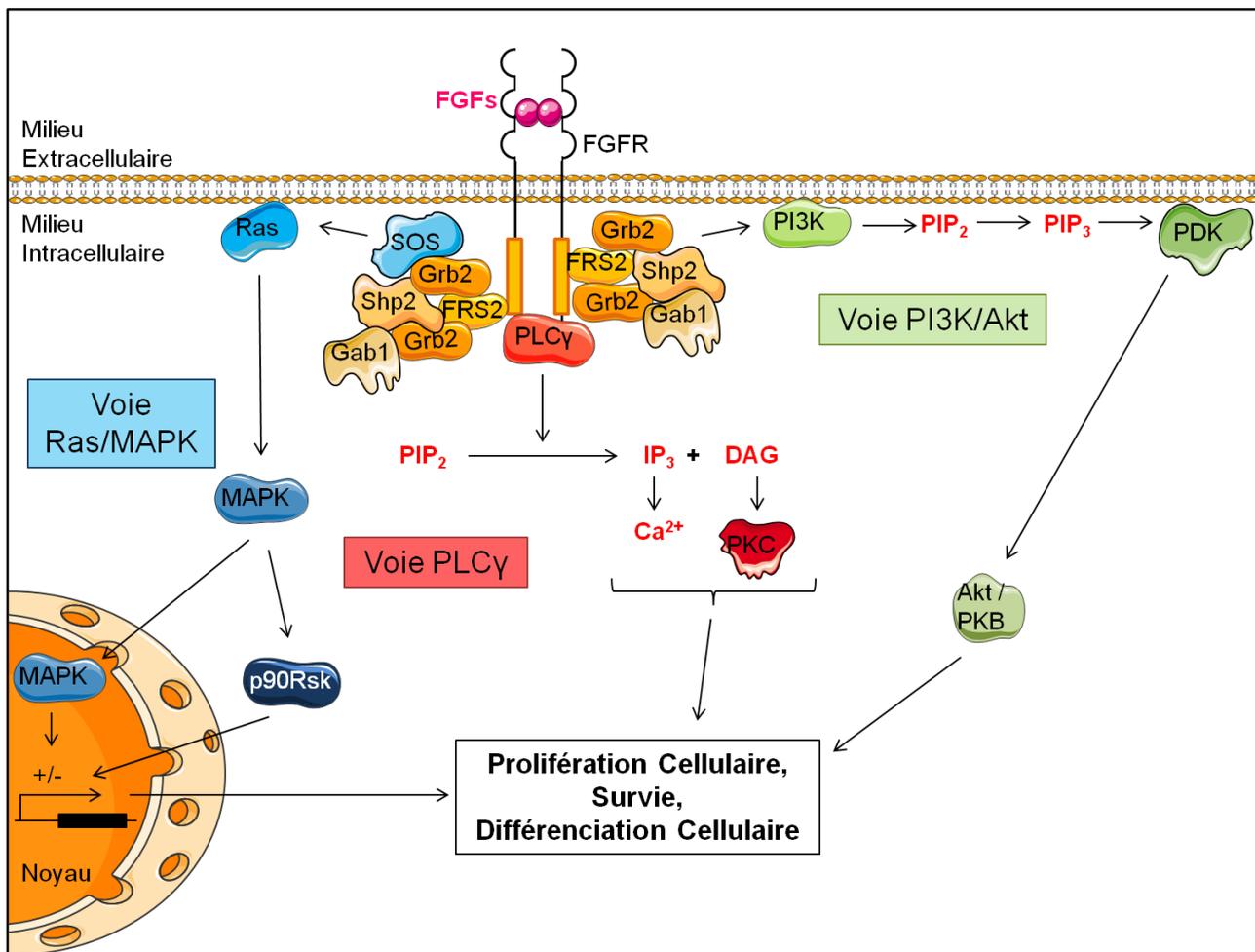


Figure 6 : Voies de signalisation activées par les FGFRs.

L'activation des voies Ras/MAPK et PI3K/Akt nécessite la formation du complexe d'activation FRS2. La PLC γ peut se lier directement aux domaines intracellulaires des FGFRs *via* les résidus tyrosine phosphorylés. L'activation de ces voies de signalisation conduit à la survie, la prolifération et la différenciation cellulaires. D'après (Powers et al., 2000; Dailey et al., 2005).

niveau de la membrane plasmique peuvent avoir différentes activités biologiques (Dreyfuss et al., 2009) :

- création d'un gradient extracellulaire de facteurs de croissance,
- prévention de la dégradation des facteurs de croissance,
- rôle de récepteurs ou de co-récepteurs des facteurs de croissance,

d) HSPGs : récepteurs ou co-récepteurs des FGFs

Les HSPGs peuvent interagir avec les FGFs indépendamment de la présence des FGFRs. Cette interaction permettrait de protéger les FGFs de la dégradation au niveau de la matrice extracellulaire (Dreyfuss et al., 2009).

Toutefois, le rôle des HSPGs le plus décrit reste celui de co-récepteur des complexes FGF-FGFRs. Les HSPGs favoriseraient la formation de ces complexes et prolongeraient le signal induit par les FGFs en stabilisant les interactions FGF-FGFR (Sarrazin et al., 2011).

2.3 Voies de signalisation induites par les FGFRs

Suite à la fixation des FGFs sur leurs récepteurs, ceux-ci sont activés par transphosphorylation, permettant l'initiation de différentes voies de signalisation. Les voies mises en jeu dépendent du type cellulaire, des ligands, des récepteurs impliqués et des messagers intracellulaires. Les trois voies de signalisation majoritairement activées par les FGFRs sont (Wiedlocha and Sorensen, 2004; Dailey et al., 2005) :

- la voie **PI3K** (Phosphatidylinositide 3-kinases) / **Akt**,
- la voie **Ras** (Rat sarcoma) / **MAP Kinases** (Mitogen-activated protein kinases),
- la voie **PLC γ** (PhosphoLipase C gamma)

Ces voies de signalisation vont notamment permettre la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.

Les résidus tyrosines présents au niveau du domaine intracellulaire des FGFRs sont phosphorylés lors de l'activation des récepteurs. Ces phosphorylations vont induire le recrutement et l'activation de protéines adaptatrices *via* leurs domaines SH2 (Src Homology 2) ou PTB (Phospho Tyrosine Binding) comme les protéines FRS2 α (Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2) ou Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2). La protéine FRS2 α va permettre la formation d'un complexe activateur, le complexe FRS2, qui comprend la tyrosine phosphatase Shp2 (SH2 domain-containing phosphatase-2) et les protéines

adaptatrices Grb2 et GAB1 (GRB2-associated-binding protein 1). Ce complexe permet notamment d'activer les voies de signalisation PI3K / Akt ou Ras / MAP Kinases (Dailey et al., 2005) (**Figure 6**).

- [La voie Ras / MAP Kinases](#)

L'activation de cette voie nécessite la formation du complexe FRS2, qui permet de recruter le facteur SOS (Son Of Sevenless), conduisant à l'activation de la protéine Ras. La protéine Ras activée va ensuite permettre d'activer la cascade de signalisation des MAPK. Cette cascade de signalisation aboutit à la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes cibles, induisant notamment la prolifération et la survie cellulaire (Tsang and Dawid, 2004; Dailey et al., 2005).

- [La voie PI3K / Akt](#)

Les protéines PI3K sont recrutées et activées par le complexe FRS2. Les protéines PI3K actives vont permettre la phosphorylation des PIP₂ (Phosphatidylinositol (4,5) biPhosphate) en PIP₃ (Phosphatidylinositol (3,4,5) triPhosphate). Cela permet d'activer les protéines PDK (Pyruvate Dehydrogenase Kinase) qui activent à leur tour la protéine Akt par phosphorylation. Les rôles d'Akt sont multiples. Suite à son activation indirecte par les FGFRs, Akt peut inhiber des protéines pro-apoptotiques comme la protéine BAD (membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2) ou la caspase-9 (caspase initiatrice de la voie intrinsèque de l'apoptose), permettant ainsi la survie cellulaire (Dailey et al., 2005; Hemmings and Restuccia, 2012). Akt est également un activateur du facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor Kappa B), qui va activer la transcription de gènes codant notamment pour des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ou pour des protéines inhibant les caspases (Sun et al., 2006).

- [La voie PLCγ](#)

Contrairement aux deux voies précédemment décrites, la voie de signalisation induite par la PLCγ ne met pas en jeu le complexe FRS2. La PLCγ est recrutée et activée par les résidus tyrosine phosphorylés des FGFRs *via* son domaine SH2. Elle permet l'hydrolyse du PIP₂ en IP₃ (Inositol 1,4,5-trisphosphate) et diacylglycérol (Tekin et al.). Ces messagers secondaires vont respectivement permettre le relargage du calcium (Ca²⁺) intracellulaire du RE (Réticulum Endoplasmique) ou de la mitochondrie dans le cytosol et l'activation de la PKC (Protein Kinase C). Cette voie de signalisation est impliquée dans un grand nombre de mécanismes, notamment dans la prolifération cellulaire (Powers et al., 2000; Dailey et al., 2005; Choi et al., 2007).

Ces différentes voies de signalisation peuvent être activées simultanément ou non dans la cellule en réponse à la liaison des FGFs sur leurs récepteurs. Elles peuvent également interagir : la PKC peut par exemple activer la voie Ras/MAPK.

Les différentes voies de signalisation activées par les FGFRs peuvent être régulées négativement par des protéines comme Sef (Similar expression of *fgf* genes) ou Spry (Sprouty). La protéine Sef est une protéine transmembranaire qui peut agir à différents niveaux de la cascade de signalisation induite par les FGFRs en fonction du contexte cellulaire. En effet, Sef peut interagir avec le domaine intracellulaire des FGFRs, bloquant la phosphorylation des résidus tyrosine kinase. Sef inhibe ainsi le recrutement des protéines adaptatrices et donc l'activation des voies Ras/MAPK et PI3K/Akt (Kovalenko et al., 2003). La protéine Sef peut également inhiber la phosphorylation des MAPK, en aval de l'activation de Ras (Torii et al., 2004). Les protéines Spry sont également des inhibiteurs de la signalisation FGF-FGFR. Il a été montré que les protéines Spry peuvent interagir avec la protéine adaptatrice Grb2, bloquant ainsi son recrutement au sein du complexe FRS2, inhibant ainsi les voies Ras/MAPK (Hanafusa et al., 2002) et PI3K/Akt. Les protéines Spry peuvent également inhiber la phosphorylation des protéines activées en aval de Ras, inhibant ainsi la voie Ras/MAPK (Sasaki et al., 2003).

3 Rôles physiologiques et pathologiques des FGFs et FGFRs

3.1 Rôles physiologiques des FGFs

Les FGFs et leurs voies de signalisation sont impliqués dans de nombreux mécanismes du développement. Ils contrôlent notamment la formation de l'axe dorso-ventral au cours de l'embryogenèse, la migration cellulaire, la morphogenèse, la différenciation neuronale ou encore la formation des os (Thisse and Thisse, 2005).

De nombreuses études visant à caractériser les activités biologiques des différents membres de la famille des FGFs ont été menées, notamment grâce à l'utilisation de souris ayant un gène *fgf* invalidé (souris « knock-out »). L'invalidation de certains des gènes codant pour les FGFs conduit à une létalité plus ou moins précoce des embryons ou des nouveau-nés (Itoh and Ornitz, 2011). Les effets de ces différentes invalidations sont présentés dans le **Tableau 1**.

Ces études ont permis de montrer que les membres de cette famille protéique sont impliqués à des degrés divers dans le développement embryonnaire. Certains FGFs interviennent de façon précoce dans l'embryogenèse au cours de la gastrulation (FGF8) ou de

Gène invalidé	Viabilité	Phénotype
<i>fgf</i>		
<i>fgf1</i>	Viable	Diabète agressif, développement adipeux aberrant
<i>fgf2</i>	Viable	Défauts cardiovasculaires, squelettiques et neuronaux légers
<i>fgf3</i>	Viable	Défauts légers de l'oreille interne et du système nerveux central
<i>fgf4</i>	Létal (embryon 4-5 jours)	Défaut de formation du blastocyste
<i>fgf5</i>	Viable	Poils longs anormaux (mutation <i>angora</i>)
<i>fgf6</i>	Viable	Défauts régénération musculaire
<i>fgf7</i>	Viable	Altération développement poils et reins
<i>fgf8</i>	Létal (embryon 8 jours)	Défauts de gastrulation, du développement des membres et de l'organogenèse
<i>fgf9</i>	Létal (naissance)	Altérations du développement de nombreux organes
<i>fgf10</i>	Létal (naissance)	Altérations du développement de nombreux organes
<i>fgf11</i>	<i>non décrit</i>	<i>non décrit</i>
<i>fgf12</i>	Viable	Aucun phénotype identifié
<i>fgf13</i>	<i>non décrit</i>	<i>non décrit</i>
<i>fgf14</i>	Viable	Ataxie
<i>fgf15/19</i>	Létal (embryon 13,5 jours - 7 jours post-naissance)	Altération morphogenèse cardiaque et du métabolisme de l'acide biliaire
<i>fgf16</i>	Létal (embryon 11,5 jours)	Altérations du développement cardiaque et facial
<i>fgf17</i>	Viable	Altérations du développement du cerveau
<i>fgf18</i>	Létal (naissance)	Altérations du développement de nombreux organes
<i>fgf20</i>	Viable	Altérations du développement de l'oreille interne
<i>fgf21</i>	Viable	Altérations du métabolisme lipidique
<i>fgf22</i>	Viable	Altérations de la différenciation synaptique
<i>fgf23</i>	Létal (4-13 semaines post-naissance)	Altérations du métabolisme du phosphate et de la vitamine D
<i>fgfr</i>		
<i>fgfr1</i>	Létal (embryon 7,5-9,5 jours)	Développement aberrant
<i>fgfr2</i>	Létal (stades très précoces embryon)	Développement aberrant
<i>fgfr3</i>	Viable	Dysplasie osseuse
<i>fgfr4</i>	Viable	Problèmes biliaires

Tableau 1 : Effets de l'inactivation chez la souris des différents gènes codant pour les FGFs et les FGFRs.

L'inactivation de gènes codant pour certains FGFs (FGFs 4 ou 8) ou pour certains récepteurs (FGFR1 et FGFR2) conduit à une létalité précoce de l'embryon ou du nouveau-né, démontrant ainsi l'importance de la signalisation FGF dans le développement embryonnaire. D'après (Gizang-Ginsberg and Ziff, 1990; Yamaguchi et al., 1994; Deng et al., 1996; Arman et al., 1998; Yu et al., 2000; Dorey and Amaya, 2010; Itoh and Ornitz, 2011) la formation du blastocyste (FGF4), tandis que d'autres sont impliqués plus tardivement dans le contrôle de différents métabolismes (FGF1, FGF21, FGF23). Certains FGFs peuvent

présenter des activités redondantes au cours du développement embryonnaire ainsi que chez l'adulte (Dorey and Amaya, 2010; Itoh and Ornitz, 2011).

3.2 Pathologies associées à des altérations de la signalisation des FGFs

Des mutations des acteurs de la signalisation FGF ou leur surexpression peuvent conduire à l'émergence de certaines pathologies comme l'hypochondroplasie et au développement de cancers (seins, ovaires, prostate etc.). Une liste non exhaustive des effets de ces différentes mutations chez l'Homme est présentée dans le **Tableau 2**.

Les mutations affectant les différents acteurs de la signalisation FGF-FGFR peuvent être activatrices ou inhibitrices. La perte de fonction du FGF3 entraîne la surdité (Tekin et al., 2007) et la perte de fonction du FGFR1 est impliquée dans le syndrome de Kallmann, qui correspond à une fusion prématurée des soudures crâniennes (Dode et al., 2003).

Les mutations gain de fonction des FGFRs conduisent à leur activation en absence de ligand. Ces mutations sont notamment retrouvées dans un grand nombre de syndromes affectant les soudures des os : on retrouve des mutations gains de fonction des FGFR1 et FGFR2 chez les patients atteints du syndrome de Pfeiffer (Schell et al., 1995; Kan et al., 2002). Les patients atteints du syndrome de Muenke présentent des mutations gain de fonction du FGFR3 (Muenke et al., 1997). Ce type de mutation des FGFRs est également retrouvé dans certains cancers comme les glioblastomes, qui présentent des mutations du FGFR1 (Rand et al., 2005) ou des cancers de la prostate qui peuvent présenter des mutations du FGFR1 ou du FGFR4 (Giri et al., 1999; Wang et al., 2004).

Les FGFs sont eux surexprimés dans différents types de cancers. Ainsi, le FGF1 est surexprimé dans des cancers du sein (La Rosa et al., 2001) et des ovaires (Smith et al., 2012) ainsi que dans des gliomes (Takahashi et al., 1990) et des astrocytomes (Maxwell et al., 1991). Les FGF2 et 3 sont quant à eux surexprimés dans certains cancers comme le cancer du sein (Fioravanti et al., 1997; Relf et al., 1997). La surexpression des FGFs peut être un marqueur de l'agressivité des tumeurs et être corrélée à un mauvais pronostic vital pour les patients. C'est notamment le cas pour la surexpression du FGF1 dans certains cancers des ovaires (Smith et al., 2012).

Mutations	Pathologies associées	Références
Perte de fonction des FGFs		
FGF3	Aplasie de Michel (surdité car pas de structure auditive interne)	(Tekin et al., 2007)
FGF8	Syndrome de Kallman (hypogonadisme, déficit odorat)	(Falardeau et al., 2008)
FGF10	Aplasie des glandes lacrymales et salivaires	(Entesarian et al., 2007)
FGF13	Syndrome B�rjeson-Forssman-Lehmann (retard mental lié à l'X)	(Gecz et al., 1999)
FGF14	Ataxie spinocérébelleuse	(van Swieten et al., 2003)
Perte de fonction des FGFRs		
FGFR1	Syndrome de Kallman (fusion prématurée soudures crâniennes)	(Dode et al., 2003)
Surexpression des FGFs		
FGF1	Cancers : sein, ovaire, prostate, gliome, astrocytome, pancréas, colon	(Takahashi et al., 1990; Maxwell et al., 1991; Yamanaka et al., 1993; Payson et al., 1998; La Rosa et al., 2001; Henriksson et al., 2011; Smith et al., 2012)
FGF2	Cancers : prostate, gliomes, sein	(Bredel et al., 1997; Relf et al., 1997; Giri et al., 1999)
FGF3	Cancers : sein, vessie, ovaires, sarcome de Kaposi	(Rosen et al., 1993; Fioravanti et al., 1997; Kiuru-Kuhlefelt et al., 2000; Zaharieva et al., 2003)
FGF4	Cancer de la vessie, sarcome de Kaposi	(Kiuru-Kuhlefelt et al., 2000; Zaharieva et al., 2003)
FGF5	Cancer : pancréas	(Kornmann et al., 1997)
FGF6	Cancer : prostate	(Ropiquet et al., 2000)
FGF19	Cancer : foie	(Sawey et al., 2011)
Gain de fonction des FGFRs		
FGFR1	Syndrome de Pfeiffer (fusion prématurée soudures crâniennes) Cancers : Glioblastomes, prostate	(Schell et al., 1995; Giri et al., 1999; Rand et al., 2005)
FGFR2	Syndromes d'Apert, de Pfeiffer, de Crouzon. Cancers : endomètre, sein	(Kan et al., 2002; Pollock et al., 2007; Schneider et al., 2008)
FGFR3	Syndrome de Muenke (fusion prématurée de certains os), Hypochondroplasie (maladie des os), Dysplasie Cancers : vessie, col de l'utérus	(Muenke et al., 1997; Tavormina et al., 1999; Tomlinson et al., 2007)
FGFR4	Cancer : prostate	(Wang et al., 2004)

Tableau 2 : Pathologies associées chez l'Homme à des modulations de l'expression des FGFs ou de leurs récepteurs.

II. Le FGF1 : un facteur de croissance intracellulaire

1 Découverte et caractérisation du FGF1

En 1973, Armelin met en évidence la présence, dans des extraits hypophysaires bovins, d'un facteur induisant la croissance des fibroblastes de souris ou des cellules ovariennes de rat cultivées *in vitro*. Son étude montre que ce facteur de croissance des fibroblastes (FGF) est non dialysable, thermolabile et sensible aux protéases (Armelin, 1973).

Au cours des années suivantes, des nombreuses études confirment que le FGF présent dans les extraits hypophysaires est capable d'induire *in vitro* la croissance cellulaire de fibroblastes de souris ou de cellules ovariennes de rat (Gospodarowicz et al., 1974; Jones and Gospodarowicz, 1974; Rudland et al., 1974a; Rudland et al., 1974b; Gospodarowicz, 1975; Gospodarowicz et al., 1975). Il a également été montré que le FGF présent dans les extraits hypophysaires peut induire la synthèse d'ADN dans différents types cellulaires comme des fibroblastes de souris, des fibroblastes humains ou encore des cellules surrénales de souris (Gospodarowicz and Moran, 1974a; Gospodarowicz and Moran, 1974b; Holley and Kiernan, 1974; Rudland et al., 1974a; Rudland et al., 1974b; Gospodarowicz and Handley, 1975; Gospodarowicz and Moran, 1975).

Les premiers protocoles de purification utilisés ont permis d'identifier deux facteurs de croissance différents ayant une forte affinité pour l'héparine : le FGF1 (ou aFGF) et le FGF2 (ou bFGF) (Abraham et al., 1986a; Abraham et al., 1986b; Jaye et al., 1986). Initialement, la purification du FGF1 a permis d'obtenir une protéine d'environ 140 acides aminés (Esch et al., 1985; Gimenez-Gallego et al., 1985). Des mises au point ont ensuite permis d'obtenir la protéine FGF1 totale, de 154 acides aminés (Burgess et al., 1986). Cette nomenclature ne comprend pas la méthionine initiatrice, qui porte le nombre d'acides aminés du FGF1 à 155. La nomenclature la plus utilisée reste celle de 154 acides aminés. L'activité mitogénique du FGF1 a été constatée sur un grand nombre de types cellulaires à la fois dans des cultures primaires et des lignées immortalisées : cultures primaires de fibroblastes ou de myoblastes, cellules du muscle lisse ou encore cellules gliales (Gospodarowicz and Moran, 1976; Gospodarowicz et al., 1986). D'autre part, le FGF1 est un facteur de différenciation pour certains types cellulaires comme les cellules PC12 (issues d'un phéochromocytome de rat), qui se différencient en neurones de type sympathique sous l'effet du FGF1 (Togari et al., 1985).

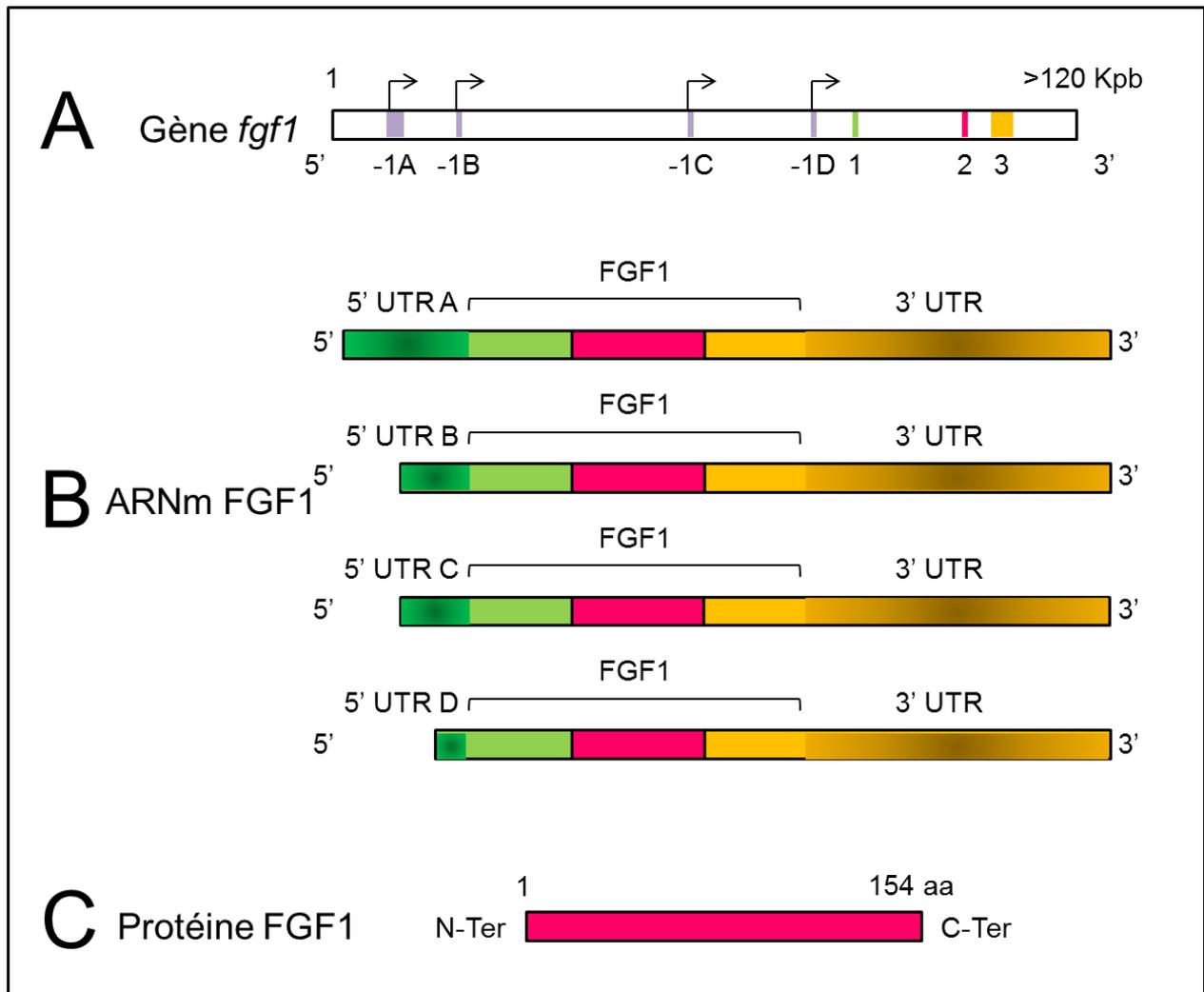


Figure 7 : Le FGF1, du gène à la protéine.

A. Le gène *fgf1* s'étend sur plus de 120 Kb. Il est composé de 3 exons codants (en vert, rose et jaune) et de 4 exons non codants (en vert foncé) qui sont alternativement épissés. **B.** Cet épissage alternatif génère 4 ARNm différents qui codent tous pour une même protéine FGF1 (en C.) de 154 acides aminés.

2 Gène, promoteurs et régulations transcriptionnelles du FGF1

Le gène *fgf1* humain est un grand gène de plus de 120 Kb localisé sur le chromosome 5. Il est composé de 3 exons contenant la région codante, d'une longue région non transcrite en 3' (comprise dans l'exon 3) et de 4 exons alternatifs (-1A à -1D) situés dans la région 5' du gène (**Figure 7A**) (Jaye et al., 1986; Myers et al., 1993; Payson et al., 1993; Chiu et al., 2001).

2.1 Les différents promoteurs du gène *fgf1*

La transcription du gène *fgf1* est assurée par quatre promoteurs différents (1.A à 1.D) dont les activités sont tissus-spécifiques. Les promoteurs 1.A et 1.B sont majoritairement actifs respectivement dans les reins et le système nerveux central (Myers et al., 1993) tandis que les promoteurs 1.C et 1.D sont eux inductibles (sérum, facteurs de croissance...) et sont actifs dans différents types cellulaires tels que des cellules issues de glioblastome ou dans des fibroblastes (Alam et al., 1996). Ce mode de transcription abouti à la formation de différents transcrits (fgf-1A à fgf-1D) qui peuvent ensuite subir des épissages alternatifs des différents exons non traduits ainsi que des terminaisons alternatives. Ces différents mécanismes, conservés dans plusieurs espèces, permettent d'obtenir différents ARN messagers dont les tailles varient de 2 à 9 Kb (**Figure 7B**) (Jaye et al., 1986; Dragunow et al., 2000). La traduction de ces différents ARNm permet l'obtention d'une seule protéine FGF1 de 154 acides aminés (**Figure 7C**).

2.2 Régulation des promoteurs du gène *fgf1*

a) Les promoteurs 1.A, 1.C et 1.D

Les régulations des promoteurs 1.A, 1.C et 1.D du gène *fgf1* sont mal connues, particulièrement en ce qui concerne le promoteur 1.A : il a été montré qu'il est majoritairement actif dans les reins (Myers et al., 1993), mais ses régulations ne sont pas décrites.

En ce qui concerne les promoteurs 1.C et 1.D, il a été montré qu'ils sont inductibles, notamment par le sérum ou par le TGFβ (Transforming Growth Factor Beta) (Alam et al., 1996; Chotani and Chiu, 1997). Le promoteur 1.D est régulé par des protéines de la famille des GTPases comme les protéines Ras, Rac1 et Cdc42 *via* son motif SRE (Serum Response Element) (Chotani et al., 2000).

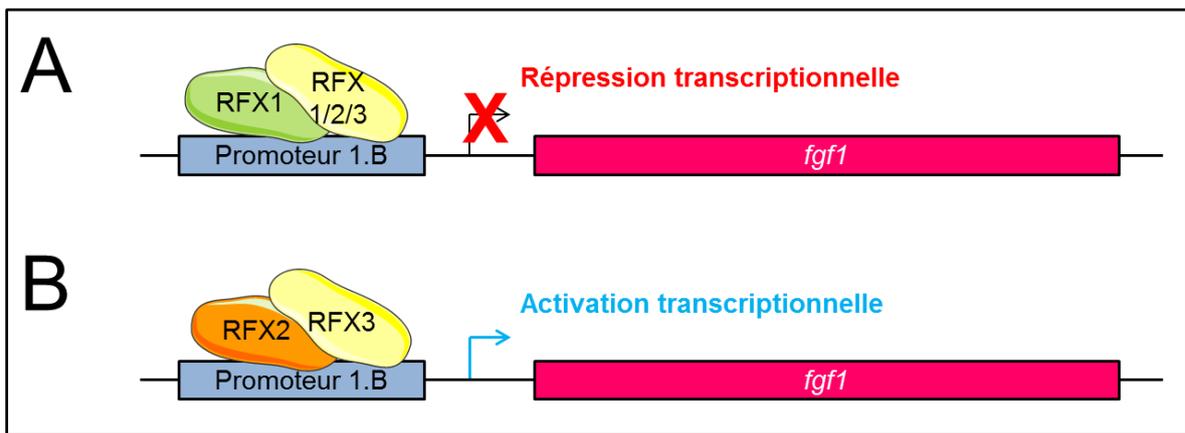


Figure 8 : Régulations transcriptionnelles du gène *fgf1*.

Les facteurs de transcription de la famille RFX agissent sous forme d'homo- ou d'hétérodimères. La présence de RFX1 dans ces complexes induit une répression transcriptionnelle tandis que les complexes RFX2/RFX3 induisent une activation transcriptionnelle du gène *fgf1*.

b) Le promoteur 1.B

Le FGF1 joue un rôle dans le développement du système nerveux et peut être impliqué dans la formation et le développement de tumeurs cérébrales (cf. 5 Activités du FGF1). Le promoteur 1.B du gène *fgf1* est actif dans le cerveau, et l'ARNm résultant de son activité transcriptionnelle (fgf-1B) est détecté chez les souris au niveau des centres sensoriels et moteurs du système nerveux central (Alam et al., 1996), ainsi que dans des cellules tumorales issues de gliomes ou de glioblastomes (Myers et al., 1993).

Le promoteur 1B du gène *fgf1*, s'il ne contient pas de séquence de type « TATA », contient en revanche 3 sites d'initiation de la transcription (Myers et al., 1995). Il a également été montré que ce promoteur possède deux séquences régulatrices, RR1 et RR2 localisées respectivement entre les nucléotides -145 et -114 et les nucléotides -507 et -467. Ces régions cis-régulatrices seraient impliquées dans la régulation de l'expression de l'ARNm FGF-1B (Myers et al., 1995; Ray et al., 1997; Chiu et al., 2001). La région RR2 constitue un site de fixation pour les facteurs de transcription de la famille RFX (Regulator Factor of X-box) (Hsu et al., 2010; Hsu et al., 2012).

Les protéines de la famille RFX ont été caractérisées au début des années 1990 (Reith et al., 1990). Ce sont des facteurs de transcription reconnaissant le motif « X-Box » présent notamment sur les promoteurs régulant l'expression des protéines de classe II du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Les facteurs de transcription RFX1 à 3 peuvent se fixer sur le promoteur 1.B du gène *fgf1*. Toutefois, de récentes études ont permis de montrer que tous ces facteurs ne jouaient pas le même rôle sur la régulation de l'expression du gène *fgf1*. Il a été montré que le facteur RFX1, soit sous forme d'homo-dimère (RFX1/RFX1) soit sous forme d'hétéro-dimères (RX1/RFX2 ou RFX1/RFX3), est un répresseur transcriptionnel du promoteur 1.B du gène *fgf1* (**Figure 8A**) (Hsu et al., 2010; Hsu et al., 2012; Kao et al., 2013). A l'inverse, le complexe hétéro-dimérique formé par les facteurs RFX2 et RFX3 est un activateur transcriptionnel du promoteur 1.B du gène *fgf1* (**Figure 8B**) (Hsu et al., 2010; Hsu et al., 2012; Kao et al., 2013).

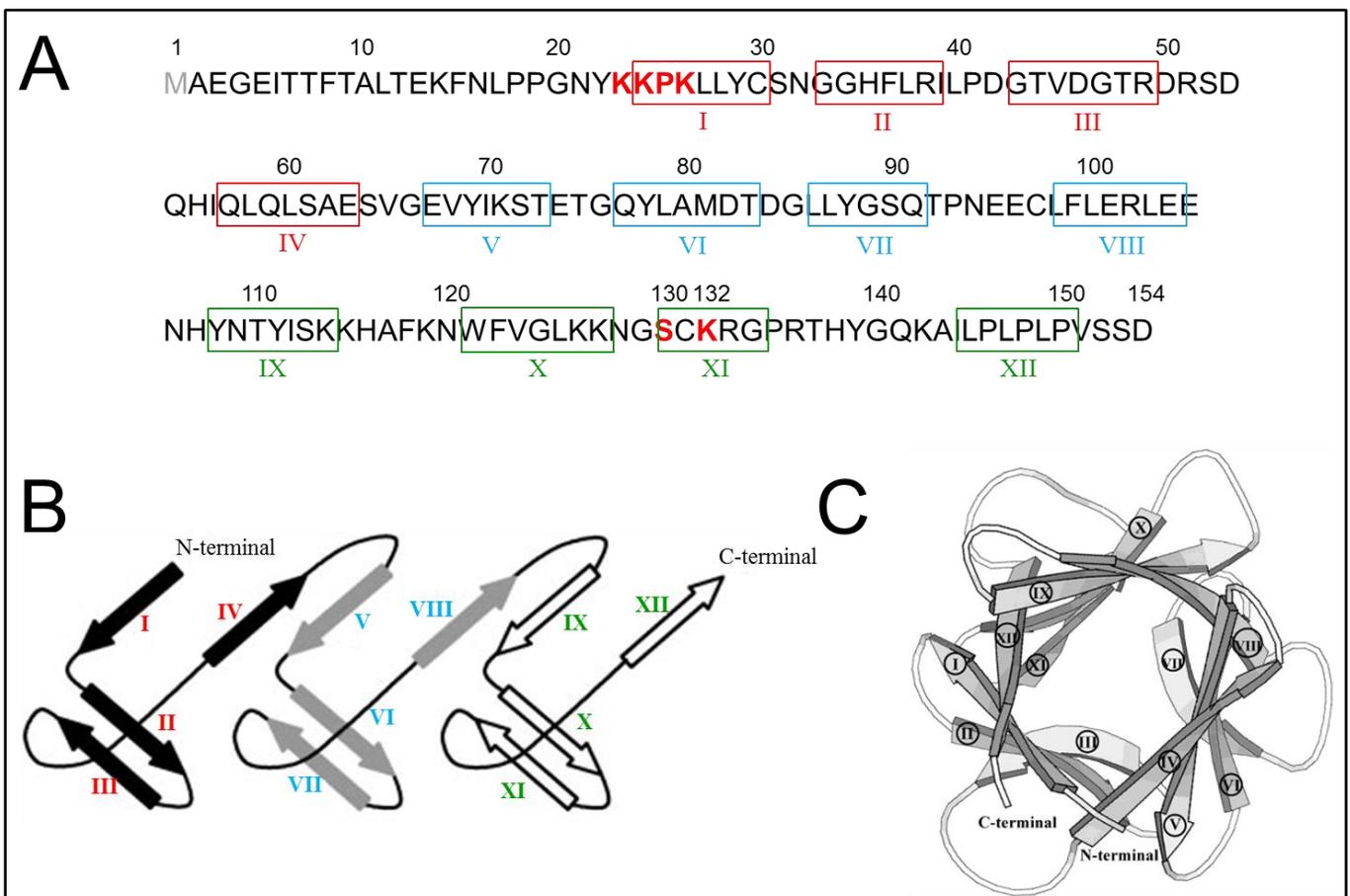


Figure 9 : Représentation des structures primaire, secondaire et tertiaire du FGF1.

A. Séquence en acides aminés du FGF1 (forme de 154 aa) : identification des feuillets β (de I à XII) et de la séquence NLS (KKPK, en rouge). D'après (Romero et al., 1996) B. Représentation de la structure secondaire du FGF1, composée de 12 feuillets β . D'après (Bernett et al., 2004; Olsson et al., 2007). L'association de 4 feuillets β forme l'une des trois unités de la structure tertiaire. C. Représentation de la structure tertiaire du FGF1, le repliement en « trèfle », stabilisé par des liaisons hydrogène. Issu de (Chi et al., 2002).

3 Structure du FGF1 et modifications post-traductionnelles

3.1 Structure du FGF1

Le FGF1 comporte 154 acides aminés (**Figure 9A**). Sa structure secondaire comporte 12 feuillets β , numérotés de I à XII (**Figure 9B**) qui s'organisent en 3 unités comportant 4 feuillets chacune. La structure tertiaire du FGF1 correspondant au repliement de ces 3 unités est appelée « repliement en trèfle » (**Figure 9C**). Le maintien de la structure tertiaire du FGF1 est assuré par des liaisons hydrogènes (Chi et al., 2002; Bennett et al., 2004; Longo et al., 2012).

Le FGF1, contrairement à la plupart des facteurs de croissance, ne possède pas de peptide signal de sécrétion (Jaye et al., 1986). En revanche, une séquence d'adressage au noyau (Nuclear Localization Sequence, NLS) de séquence KKPK (acides aminés 23 à 26) a été identifiée sur son premier feuillet β (**Figure 9A**) (Imamura et al., 1990). Lorsque cette séquence NLS est mutée ou délétée, le FGF1 conserve sa capacité à se lier à l'héparine et aux FGFRs. En revanche, la plupart de ses activités, comme la prolifération cellulaire ou son activité mitogénique sont inhibées, ce qui montre que la localisation nucléaire du FGF1 est importante pour ses activités biologiques (Imamura et al., 1990).

3.2 Modifications post-traductionnelles du FGF1

Bien que les modifications post-traductionnelles du FGF1 soient peu décrites, il a toutefois été montré que celui-ci peut être méthylé sur son résidu Lysine 132 ou bien phosphorylé sur son résidu Sérine 130 (Harper and Lobb, 1988).

La méthylation du résidu Lysine 132 affecte les propriétés et activités du FGF1. La forme méthylée du FGF1 présente une affinité réduite pour l'héparine ainsi que pour les FGFRs. Cette méthylation diminue également l'activité mitogénique du FGF1 (Harper and Lobb, 1988).

Un seul site de phosphorylation a été identifié à ce jour sur le FGF1. En 1989, Mascarelli et al. montrent que le FGF1 peut être phosphorylé (Mascarelli et al., 1989). Il s'agit d'un site consensus de phosphorylation pour la PKC : Ser¹³⁰-Cys-Lys. En 2005, une étude de Wiedlocha et al. montre que le FGF1 est phosphorylé *in vivo* par la PKC δ et que cette phosphorylation a lieu dans le compartiment nucléaire. Cette phosphorylation induirait l'export du FGF1 du noyau vers le cytoplasme où il serait dégradé (Wiedlocha et al., 2005). Toutefois, le rôle de la phosphorylation du FGF1 reste peu décrit.

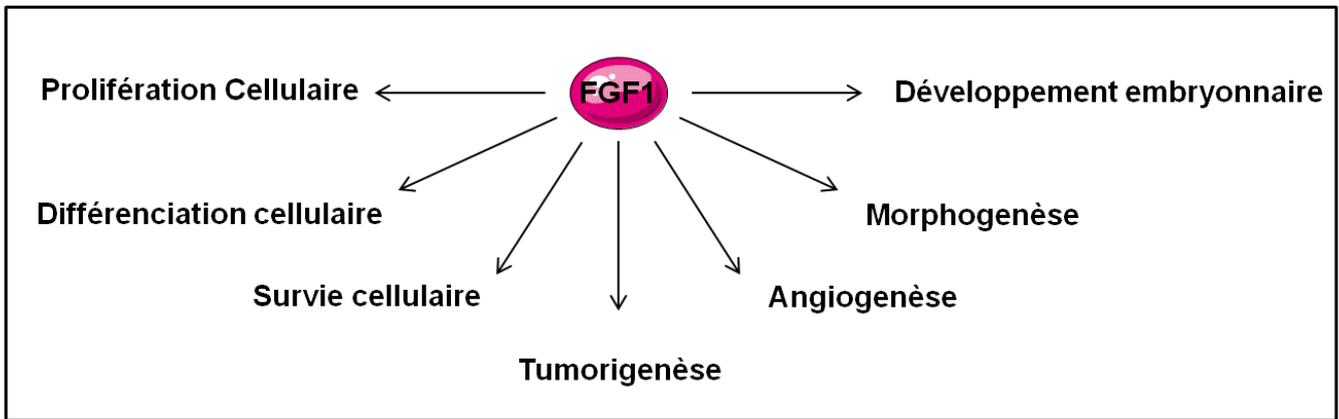


Figure 10 : Activités du FGF1.

Le facteur de croissance FGF1 régule de nombreux mécanismes cellulaires. Il régule notamment la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires, le développement embryonnaire et la morphogenèse mais peut également induire la tumorigenèse et l'angiogenèse.

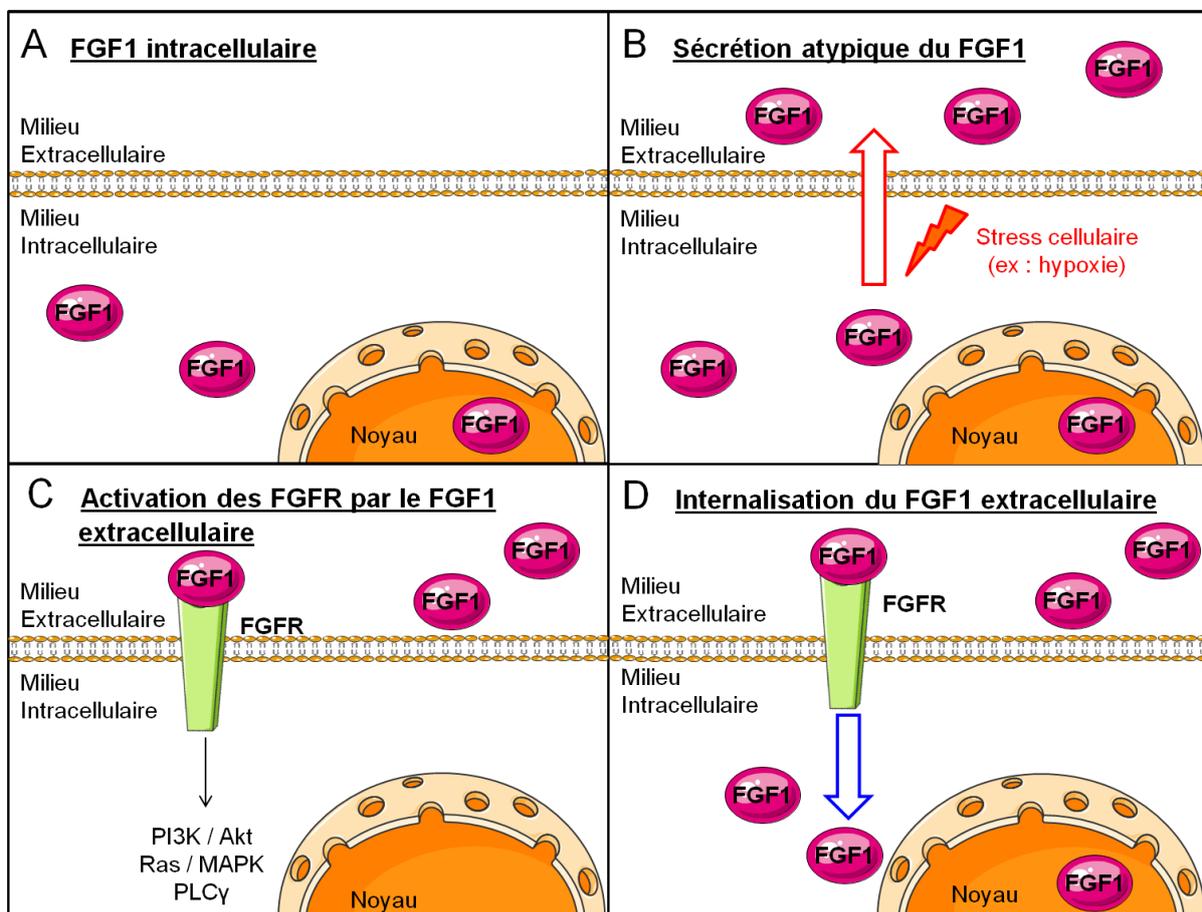


Figure 11 : Les différents modes d'action du FGF1.

Le FGF1 est un facteur de croissance intracellulaire qui possède une séquence NLS. Il est donc localisé à la fois dans le cytosol et le noyau (A). Lors d'un stress cellulaire, le FGF1 peut être libéré dans le milieu extracellulaire via une voie de sécrétion atypique indépendante de la voie régulée par le RE et l'appareil de Golgi (B). Le FGF1 extracellulaire peut alors se lier aux FGFRs et activer les voies de signalisation PI3K/Akt, Ras/MAPK ou PLC γ (C). Suite à sa liaison aux FGFRs, le FGF1 peut également être internalisé et transloqué dans le noyau (D).

4 Modes d'action du FGF1

4.1 Activités extracellulaires du FGF1

Il a été montré que le FGF1 intervient dans un grand nombre de processus cellulaires comme le développement embryonnaire et la morphogenèse, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires ou encore l'oncogenèse et l'angiogenèse (**Figure 10**).

Contrairement à la plupart des facteurs de croissance, le FGF1 ne possède pas de peptide signal de sécrétion (Jaye et al., 1986). Le FGF1 est donc un facteur de croissance principalement intracellulaire (**Figure 11A**) à la fois cytosolique et nucléaire puisqu'il possède une séquence NLS (Imamura et al., 1990). La double localisation nucléaire et cytosolique du FGF1 (Huang et al., 1987; Sano et al., 1990; Cao et al., 1993) semble jouer un rôle important sur ses nombreuses activités intracellulaires.

Toutefois, en cas de stress cellulaire (hypoxie), le FGF1 peut être externalisé indépendamment de la voie de sécrétion classique modulée par le RE et l'appareil de Golgi (Jackson et al., 1992) (**Figure 11B**). Le FGF1 externalisé peut se lier aux FGFRs et activer classiquement les voies de signalisation Ras/MAPK, PI3K/Akt ou encore PLC γ (**Figure 11C**). Le FGF1 peut également, suite à sa liaison aux FGFRs, être internalisé puis transloqué dans le noyau, activant ainsi des voies de signalisation intracellulaires (**Figure 11D**) (Imamura et al., 1990; Zhan et al., 1992; Zhan et al., 1993; Imamura et al., 1994; Wiedlocha et al., 1994; Munoz et al., 1997; Klingenberg et al., 1998).

a) La voie de sécrétion atypique du FGF1

Certaines protéines dépourvues de peptide signal de sécrétion comme les cytokines IL-1 α et IL-1 β (Interleukine-1), les protéines de la famille S100 ou les FGF 1 et 2 peuvent présenter à la fois des activités intra- et extra-cellulaires. Ces protéines sont sécrétées par une voie indépendante de celle du RE/Golgi.

La sécrétion du FGF1, quasiment indétectable en conditions physiologiques, augmente fortement lorsque la cellule est soumise à différents types de stress comme un choc thermique (Jackson et al., 1992; Mouta Carreira et al., 1998), l'hypoxie (Mouta Carreira et al., 2001) ou la privation de sérum (Shin et al., 1996; Matsunaga and Ueda, 2006).

Suite à ces différents stress, le FGF1 est alors relargué dans le milieu extracellulaire sous forme d'homodimère (Jackson et al., 1995).

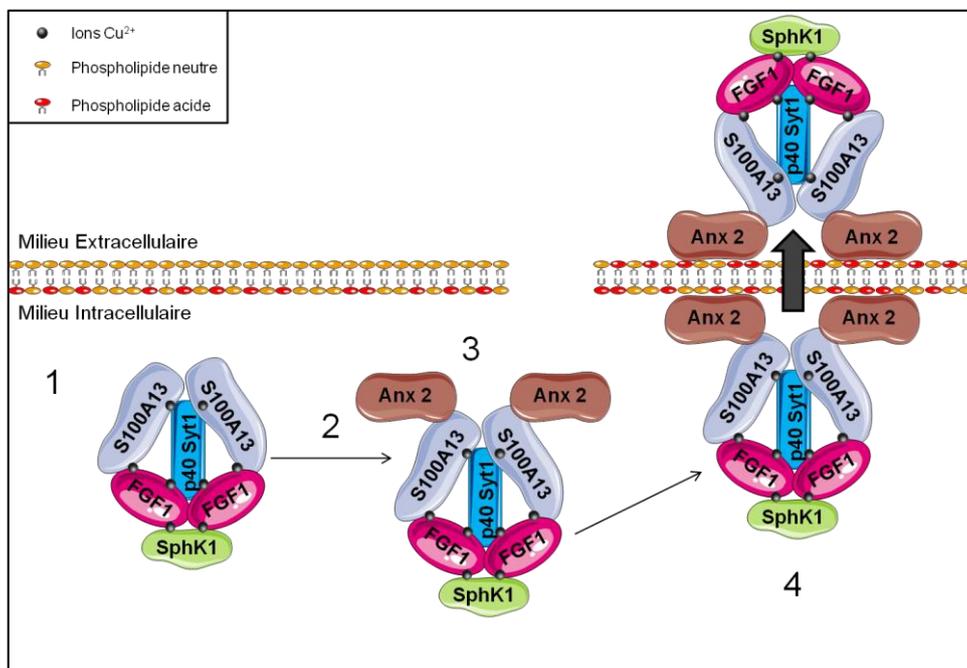


Figure 12 : Sécrétion atypique du FGF1.

Le complexe de relargage du FGF1 (1), composé du FGF1, de la protéine S100A13, de la Sphingosine Kinase 1 (SphK1), du fragment p40 de la Synaptotagmine 1 (p40 Syt1) et contenant des ions Cu^{2+} (en noir) est localisé à proximité de la membrane plasmique (2). La protéine S100A13 interagit alors avec l'Annexine 2 (Anx2) présente au niveau de la surface interne de la membrane plasmique (3). Le complexe est ensuite relargué à l'extérieur de la cellule lors de la translocation des phospholipides acides de la membrane plasmique (4). D'après (Prudovsky et al., 2013).

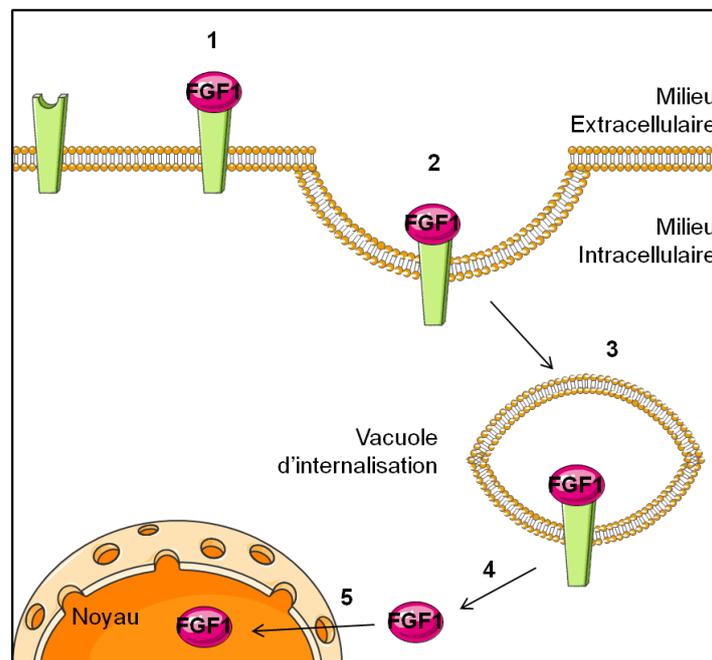


Figure 13 : Internalisation du FGF1.

Suite à sa liaison aux récepteurs FGFR1 ou FGFR4 (1), le FGF1 peut être internalisé (2). Cette internalisation est indépendante des vésicules à manteau de clathrine ou des cavéoles. Les complexes FGF1-FGFR1/4 sont pris en charge par des vacuoles d'internalisation (3) semblables aux endosomes. Le FGF1 est ensuite libéré dans le cytoplasme (4) grâce notamment à la chaperonne Hsp90, puis adressé au noyau *via* un mécanisme impliquant les Ran GTPases, la protéine LRRC59 et les importines Kpn α 1 et Kpn β 1 (5).

Avant sa sécrétion, le FGF1 s'associe sous forme d'homodimère au sein d'un complexe protéique plus large, le complexe de relargage du FGF1 (Prudovsky et al., 2013), composé du domaine extravésiculaire de la Synaptotagmine 1 (Tarantini et al., 1998), de la protéine S100A13 (LaVallee et al., 1998; Mouta Carreira et al., 1998; Landriscina et al., 2001), de la Sphingosine Kinase 1 (Soldi et al., 2007). Ce complexe interagirait ensuite avec l'Annexine 2 *via* les protéines S100A13, permettant ainsi sa libération dans le milieu extracellulaire (Prudovsky et al., 2013). Certaines interactions de ce complexe font intervenir des ions Cu^{2+} (Di Serio et al., 2008) (**Figure 12**). Un stress cellulaire tel qu'un choc thermique induit la formation du complexe de relargage du FGF1, qui est ensuite relocalisé à proximité de la membrane plasmique. L'externalisation de ce complexe dépendrait ensuite de la translocation des phospholipides acides de la membrane plasmique (Kirov et al., 2012).

b) Internalisation du FGF1 extracellulaire

Suite à sa liaison aux FGFRs, le FGF1 extracellulaire (ou le FGF1 recombinant ajouté au milieu de culture) peut être internalisé par un mécanisme encore mal connu mais qui semble dépendre de la phase du cycle cellulaire et du domaine intracellulaire des récepteurs.

Des études ont montré que l'internalisation du FGF1 dépend du FGFR auquel il est lié : les FGFR 1 et 4 permettent l'internalisation du FGF1, contrairement aux FGFR 2 et 3 (Haugsten et al., 2005; Sorensen et al., 2006a; Sorensen et al., 2006b). C'est plus précisément le domaine intracellulaire du FGFR qui semble important pour cette internalisation, toutefois, ce mécanisme est indépendant de l'activité tyrosine kinase des récepteurs (Sorensen et al., 2006b).

Les complexes FGF1-FGFR sont internalisés indépendamment des vésicules à manteau de clathrine ou des cavéoles (Citores et al., 1999; Citores et al., 2001) : ils sont retrouvés dans des vacuoles semblables aux endosomes. Ces vacuoles possèdent un potentiel de membrane et font intervenir les PI3 Kinases (Klingenberg et al., 2000; Malecki et al., 2002; Malecki et al., 2004; Zakrzewska et al., 2011). Le FGF1 est ensuite libéré dans le cytoplasme grâce à un mécanisme mal défini impliquant la protéine Hsp90 (Wesche et al., 2006), puis transloqué dans le noyau grâce à sa séquence NLS (Imamura et al., 1990). La translocation nucléaire du FGF1 requiert également les Ran GTPases, la protéine LRRC59 (Leucin Rich Repeat Containing 59) ainsi que les importines Kpn α 1 et Kpn β 1 (Kariophérines α 1 et β 1) (Zhen et al., 2012) (**Figure 13**). L'internalisation du FGF1 aurait lieu préférentiellement au cours de la phase G1 du cycle cellulaire (Imamura et al., 1994; Malecki et al., 2004).

4.2 Activités du FGF1 intracellulaire

Le FGF1 est un facteur de croissance atypique, dépourvu de peptide signal de sécrétion. Il n'est libéré dans le milieu extracellulaire que dans de rares cas de stress cellulaire, indépendamment de la voie de sécrétion classiquement médiée par le RE et l'appareil de Golgi. Le FGF1 est donc un facteur de croissance **majoritairement intracellulaire**, impliqué dans un grand nombre de mécanismes cellulaires que nous allons maintenant détailler.

a) Implication du FGF1 intracellulaire dans le développement et la différenciation cellulaire

Une étude publiée en 1991 a montré que le FGF1 était exprimé dans un grand nombre de tissus au cours des différentes phases du développement embryonnaire du rat et que son niveau varie en fonction des tissus. Ainsi, au cours du développement, le niveau de FGF1 reste constant dans le système respiratoire et les reins, et diminue dans les muscles squelettiques. En revanche, il augmente dans le système nerveux central, dans les yeux ou encore le cœur et les vaisseaux sanguins (Fu et al., 1991). Le niveau de FGF1 semble être régulé finement au cours du développement embryonnaire et son mode d'action semble varier en fonction du tissu ou du type cellulaire.

Le FGF1 joue un rôle important dans le développement du cœur et du système vasculaire. Des études réalisées chez le rat, le chien ou le lapin ont montré qu'il est fortement exprimé dans le cœur et les vaisseaux sanguins (Spirito et al., 1991; Wu et al., 2010). Le FGF1 induit notamment la prolifération des myocytes (Engelmann et al., 1993; Hidai et al., 2003).

Au cours du développement fœtal, on observe une diminution des ARN messagers du FGF1 dans les muscles squelettiques (Alterio et al., 1990; Moore et al., 1991). Il a ensuite été montré que cette diminution corrèle avec une augmentation du niveau de la myogénine, un régulateur de la différenciation myogénique (Moore et al., 1991; Fox et al., 1994). Ces données suggèrent que le FGF1 inhibe la différenciation myogénique en régulant négativement l'expression de certains régulateurs myogéniques.

Enfin, le FGF1 est fortement exprimé dans le système nerveux central (SNC) et périphérique au cours du développement (Fu et al., 1991; Araki et al., 2007) ainsi qu'à l'âge adulte (Eckenstein et al., 1991a; Eckenstein et al., 1991b; Schnurch and Risau, 1991). De forts niveaux de FGF1 sont notamment retrouvés dans les neurones moteurs, les neurones sensoriels primaires ainsi que les neurones rétiniens (Jacquemin et al., 1990; Elde et al., 1991; Bugra et al., 1993; Bugra and Hicks, 1997). *In vitro*, de nombreuses études ont montré que le

FGF1 intracellulaire a un rôle neurotrophique dans un grand nombre de types cellulaires différents. En effet, le FGF1 induit la différenciation neuronale des cellules PC12 (issues d'un phéochromocytome de rat) (Renaud et al., 1996), des cellules SHSY5Y (issues d'un neuroblastome humain) (Raguenez et al., 1999) ou encore des cellules issues de rétine de poulet (Desire et al., 1998).

Le FGF1 intracellulaire est donc un régulateur de la différenciation cellulaire, qu'il l'induit (cœur, SNC) ou qu'il la réprime (muscle squelettique). Toutefois, les mécanismes cellulaires mis en jeu lors de ces différentes régulations restent à caractériser.

b) Rôle du FGF1 intracellulaire dans la survie cellulaire

Le FGF1, comme les facteurs de croissance conventionnels, peut induire la survie cellulaire, mais les mécanismes cellulaires impliqués sont encore peu décrits.

In vivo, il a été montré que le FGF1 intracellulaire est un facteur de survie pour les cellules neuronales ou cardiaques. Ainsi, le FGF1 permet la survie des motoneurons faciaux suite à une axotomie (Cuevas et al., 1995). Il permet également la survie des cellules cardiaques issues du ventricule (Palmen et al., 2004) ou des cellules neuronales issues de cultures primaires corticales (Russell et al., 2006) suite à une ischémie.

In vitro, le rôle du FGF1 dans la survie cellulaire a été étudié dans plusieurs modèles. Le FGF1 protège des cellules endothéliales dérivées de veine ombilicale humaine et des cellules primaires issues de rétine de poulet embryonnaire de la mort cellulaire (Maier et al., 1996; Desire et al., 1998). Dans les cellules NT2 (lignée neuronale humaine) traitées avec de l'Interleukine 6 (IL6), le niveau de FGF1 augmente, induisant la survie cellulaire (Thorns et al., 2002). Le FGF1 est également un facteur de survie pour différentes lignées cellulaires cultivées en absence de sérum : cellules issues de cultures primaires d'hypothalamus, cellules épithéliales du cristallin et de la rétine, cellules PC12 et SHSY5Y (Renaud et al., 1994; Renaud et al., 1996; Lotto et al., 1997; Bryckaert et al., 1999; Raguenez et al., 1999).

Notre équipe étudie depuis plusieurs années les mécanismes cellulaires impliqués dans l'activité de survie du FGF1 intracellulaire *in vitro*. Nous avons ainsi pu montrer que dans les cellules RetsAFs ou les cellules PC12, le FGF1 intracellulaire induit la survie des cellules en absence de sérum ou suite à l'induction de l'apoptose dépendante de p53 (Renaud et al., 1996; Bouleau et al., 2005; Rodriguez-Enfedaque et al., 2009). Nous avons notamment montré que le FGF1 régule la stabilité et les activités de facteur de transcription de la protéine p53 au cours de la voie intrinsèque de l'apoptose (Bouleau et al., 2005; Rodriguez-Enfedaque et al., 2009).

c) *Le FGF1 intracellulaire : activités mitogéniques et oncogéniques*

Outre ses rôles dans le développement embryonnaire et la survie cellulaire, le FGF1 intracellulaire présente également des activités mitogénique et oncogénique.

– **Activités mitogéniques du FGF1**

Le FGF1 internalisé induit la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire, notamment dans des fibroblastes embryonnaires de souris, les cellules NIH3T3 ou des cellules issues d'ostéosarcome humain (Imamura et al., 1990; Wiedlocha et al., 1994; Wiedlocha et al., 1996; Klingenberg et al., 1998; Klingenberg et al., 1999). Cette activité mitogénique est directement corrélée à la localisation nucléaire du FGF1 et est indépendante de l'activation des FGFRs. En effet, des études ont montré que lorsque le FGF1 présente une NLS mutée ou délétée il n'est plus localisé dans le noyau et ne présente plus d'activité mitogénique (Imamura et al., 1990; Lin et al., 1996). De plus, il a été montré que l'activité mitogénique du FGF1 est bien liée à son internalisation et non pas à l'activation des FGFRs. Pour cela, le FGF1 a été fusionné à la toxine diphtérique qui est internalisée suite à sa liaison à ses récepteurs membranaires. Il a été montré que le FGF1 fusionné à la toxine diphtérique est bien internalisé et transloqué dans le noyau. Cette forme du FGF1 internalisée présente une activité mitogénique, indépendamment de l'activation des FGFRs (Wiedlocha et al., 1994; Wiedlocha et al., 1996).

– **Activités oncogéniques du FGF1**

In vivo, le FGF1 est surexprimé dans certains cancers du sein (Coope et al., 1997; Payson et al., 1998; Yoshimura et al., 1998; La Rosa et al., 2001), des ovaires (Birrer et al., 2007; Smith et al., 2012), de la prostate (Payson et al., 1998), du colon (Henriksson et al., 2011), du pancréas (Yamanaka et al., 1993), dans certains mélanomes (Di Serio et al., 2008) ou encore dans des cancers cérébraux comme des gliomes (Takahashi et al., 1990) ou des astrocytomes (Maxwell et al., 1991).

De récentes études ont montré que le pronostic vital des patients peut être corrélé au niveau de FGF1 dans certaines tumeurs. C'est le cas notamment pour le cancer du sein, des ovaires ou encore de la prostate. Ainsi, dans une étude publiée en 2013, le FGF1 est identifié comme un facteur de pronostic important pour les patientes atteinte d'un cancer du sein : plus le niveau de FGF1 est important dans les tissus tumoraux et plus le pronostic vital des patientes est mauvais (Slattery et al., 2013). C'est le cas également pour le cancer des ovaires : le FGF1 est fortement surexprimé, et cette surexpression est associée à une résistance aux traitements chimiothérapeutiques ainsi qu'à un mauvais pronostic vital pour les

patientes (Smith et al., 2012). Enfin, la surexpression du FGF1 est corrélée avec une aggravation du score de Gleason pour les patients souffrant de cancer de la prostate. Le score de Gleason permet d'apprécier l'agressivité des tumeurs : plus il est élevé et plus la tumeur est agressive et le pronostic vital du patient réservé (Dorkin et al., 1999).

Des études menées *in vitro* montrent que le FGF1, lorsqu'il est surexprimé dans des cellules cancéreuses, augmente leur prolifération (El Yazidi et al., 1998). Ces études ont notamment été menées sur des cellules issues de cancer du sein transfectées de façon à surexprimer le FGF1 puis injectées dans le tissu mammaire de souris *nude*. Des tumeurs et une néo-angiogenèse ont été observées au niveau du tissu mammaire, ainsi que la formation de métastases dans d'autres organes comme les poumons par exemple (Zhang et al., 1999; Okunieff et al., 2003). Des expériences similaires ont été menées avec des cellules issues de cancer de la prostate ou de la vessie, pour des résultats comparables (Jouanneau et al., 1991; Shain et al., 1996; Jouanneau et al., 1997).

Le FGF1 intracellulaire est donc un oncogène qui, lorsqu'il est surexprimé, favorise le développement et la vascularisation des tumeurs. Il favorise également la dissémination des cellules tumorales, induisant la formation de métastases et est un facteur de résistance aux chimiothérapies. Sa surexpression, dans certains types de cancers, est directement associée au mauvais pronostic vital des patients.

d) Les partenaires protéiques du FGF1 intracellulaire

Le FGF1 intracellulaire interagit avec une dizaine de protéines qui régulent son trafic intra- et extra-cellulaire ou ses activités intracellulaires.

– Partenaires du FGF1 impliqués dans sa sécrétion

La sécrétion atypique du FGF1 met en jeu la formation d'un complexe de sécrétion au sein duquel le FGF1 interagit avec différentes protéines : le domaine extravésiculaire de la Synaptotagmine 1 (p40 Syt1), la Sphingosine Kinase 1 (Sphk1) et la protéine S100A13 (cf. 4.1, Sécrétion atypique du FGF1).

– Partenaires du FGF1 impliqués dans son trafic intracellulaire

Lors de sa liaison aux FGFRs, le FGF1 peut être internalisé puis transloqué dans le noyau (cf. 4.2, Internalisation du FGF1). Ce mécanisme implique notamment la protéine LRRC59. L'export nucléaire du FGF1 suite à sa phosphorylation ferait quant à lui intervenir la nucléoline.

La protéine LRRC59 (ou ribosomal-protein binding p34) a été identifiée comme partenaire du FGF1 par co-immunoprécipitation en 2002 (Skjerpen et al., 2002b). Elle est impliquée, ainsi que les importines Kpn α 1 et Kpn β 1 dans la translocation nucléaire du FGF1. Toutefois, ses fonctions restent mal décrites. Il s'agit d'une protéine ancrée dans la membrane du RE, et dont la partie cytosolique interagit avec le FGF1, participant à son adressage au noyau (Zhen et al., 2012).

La protéine FIBP (FGF Intracellular Binding Protein) a été identifiée comme partenaire du FGF1 en 1998 grâce au système double-hybride. C'est une protéine intracellulaire d'environ 42 kDa localisée dans le noyau et au niveau des membranes du RE et de la mitochondrie (Kolpakova et al., 1998), conservée dans différentes espèces, de la Drosophile à l'Homme (Kolpakova et al., 2000; Kolpakova et al., 2003), mais son rôle reste mal connu.

La nucléoline est l'un des plus récents partenaires du FGF1 à avoir été mis en évidence (Sletten et al., 2014). Il s'agit d'une protéine nucléolaire impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires, comme la croissance, la régulation du cycle cellulaire, la transcription ou l'apoptose (Tajrishi et al., 2011). Il a été montré que si la nucléoline n'est pas impliquée dans la translocation nucléaire du FGF1, elle est en revanche nécessaire à sa phosphorylation par la PKC δ et à son export nucléaire (Sletten et al., 2014).

– **Partenaires du FGF1 régulant ses activités intracellulaires**

Le FGF1 intracellulaire induit la prolifération et la survie cellulaires. Il a également une activité mitogénique et oncogénique. Ces différentes activités du FGF1 peuvent être régulées par des partenaires protéiques du FGF1 comme la mortaline, la kinase CK2 (Casein Kinase 2) ou encore l'oncosuppresseur p53.

La mortaline est une protéine de 74 kDa retrouvée principalement au niveau de la mitochondrie mais également dans le cytosol ou le RE. Bien qu'elle ne soit pas activée par un choc thermique, elle est assimilée aux protéines de la famille Hsp70 (Heat Shock Protein) car elle présente une grande similarité de séquence avec cette famille protéique. La mortaline peut par exemple être activée suite à un stress métabolique, et ses activités sont déterminées par sa localisation et ses partenaires protéiques (Kaul et al., 2007; Londono et al., 2012). Il a été montré que la mortaline, et plus particulièrement la forme phosphorylée de la mortaline interagit avec le FGF1 à la fin de la phase G1 (Mizukoshi et al., 1999; Mizukoshi et al., 2001). L'interaction entre ces deux protéines permettrait de réguler l'activité proliférative du FGF1 (Mizukoshi et al., 2001).

La CK2 est une sérine/thréonine kinase qui joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire et la transduction du signal mitogénique. Elle est composée de deux sous-unités catalytiques α et de deux sous-unités régulatrices β , formant ainsi un hétérotétramère de 130kDa (St-Denis and Litchfield, 2009). Le FGF1 est capable d'interagir avec les deux sous-unités α et β de la CK2, stimulant l'autophosphorylation de cette kinase. En outre, le FGF1 peut être phosphorylé *in vitro* par la CK2. L'interaction entre ces deux protéines régule l'activité mitogénique du FGF1 (Skjerpen et al., 2002a).

L'oncosuppresseur p53 est un facteur de transcription impliqué notamment dans la régulation du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. Notre équipe a montré il y a quelques années que le FGF1 interagit avec la protéine p53, en conditions physiologiques ou suite à l'induction de l'apoptose. L'interaction entre p53 et le FGF1 semble corrélérer avec l'activité anti-apoptotique de ce dernier : le FGF1 induit en effet une diminution de la stabilité de p53 et de ses activités transcriptionnelles, inhibant ainsi l'apoptose dans les cellules PC12 (Rodriguez-Enfedaque et al., 2009).

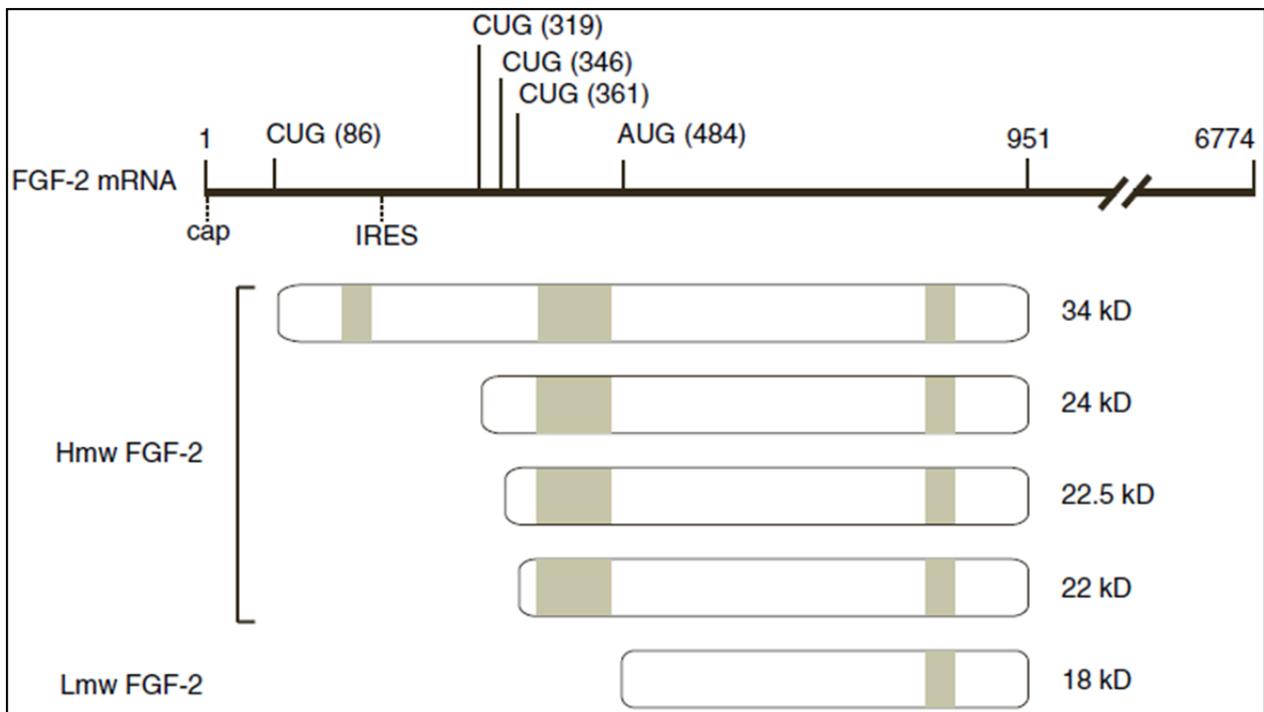


Figure 14 : Isoformes du FGF2.

L'ARNm du FGF2 possède des sites alternatifs d'initiation de la traduction (codons CUG en positions 86, 319, 346, et 361), permettant ainsi l'obtention de 5 isoformes du FGF2 : 4 isoformes de haut poids moléculaire (notées Hmw FGF-2 et de 22 ; 22,5 ; 24 et 34 kDa) et 1 isoforme de faible poids moléculaire (Lmw FGF-2 de 18 kDa). Ces différentes isoformes possèdent une ou plusieurs séquences NLS (en vert), qui vont participer à la modulation de leurs activités intracellulaires. Issu de (Sorensen et al., 2006a).

III. Les facteurs de croissance intracellulaires

Outre le FGF1, certains facteurs de croissance peuvent être soit strictement intracellulaires, soit être internalisés suite à leur liaison avec leurs récepteurs membranaires. Ces facteurs de croissance intracellulaires induisent alors des voies de signalisation indépendantes des voies de signalisation classiquement induites par les récepteurs à activité tyrosine kinase et leurs ligands. Certains de ces facteurs ou de ces récepteurs peuvent, suite à leur internalisation, être adressés au noyau où ils vont réguler directement ou indirectement certains mécanismes cellulaires comme la réplication ou la réparation de l'ADN, le métabolisme des ARN, ou la transcription de certains gènes cibles (Planque, 2006).

1 Les FGFs intracellulaires

1.1 Le FGF2

Il existe 5 isoformes (18 kDa, 22 kDa, 22,5 kDa, 24 kDa et 34 kDa) du FGF2, obtenues grâce à des sites alternatifs d'initiation de la traduction (Florkiewicz and Sommer, 1989; Prats et al., 1989; Arnaud et al., 1999; Touriol et al., 2003). Tout comme le FGF1, les isoformes du FGF2 ne possèdent pas de peptide signal de sécrétion. En revanche, elles possèdent toutes une séquence NLS en C-terminal et, pour les formes de haut poids moléculaire, une ou deux autres séquences NLS en N-terminal (**Figure 14**) (Bugler et al., 1991; Quarto et al., 1991; Arese et al., 1999; Foletti et al., 2003). Les isoformes du FGF2 de haut poids moléculaire possèdent une séquence NLS forte, et sont principalement localisées dans le noyau. L'isoforme du FGF2 de faible poids moléculaire possède une séquence NLS faible et est localisée à la fois dans le cytosol et le noyau.

Les isoformes intracellulaires du FGF2 présentent des activités similaires à celles du FGF1 : elles peuvent induire la prolifération de différents types cellulaires comme les fibroblastes (Taylor et al., 1993; Arese et al., 1999; Berger et al., 1999). Elles peuvent aussi induire la migration cellulaire, l'angiogenèse, et présentent une activité tumorigène (Sherman et al., 1993; Taylor et al., 1993; Huang et al., 1994; Maret et al., 1995). Les isoformes du FGF2 sont impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires, leurs activités peuvent varier en fonction de leurs partenaires protéiques (Patry et al., 1997).

a) *Le FGF2 de faible poids moléculaire*

Le FGF2 de faible poids moléculaire peut, comme le FGF1, être sécrété en cas de stress cellulaire en dépit de son absence de peptide signal de sécrétion. Cette sécrétion est indépendante de la voie classiquement médiée par le RE et l'appareil de Golgi. C'est un mécanisme d'exocytose dépendante de l'ATP qui requiert la protéine Hsp27 (Heat shock protein 27) (Mignatti et al., 1992; Florkiewicz et al., 1995; Piotrowicz et al., 1997). Le FGF2 extracellulaire (ou le FGF2 recombinant ajouté au milieu de culture) peut se lier aux FGFRs et être internalisé et transloqué dans le compartiment nucléaire (Bouche et al., 1987; Bikfalvi et al., 1989; Baldin et al., 1990; Malecki et al., 2004). Le FGF2 intracellulaire présente une activité mitogénique (Bailly et al., 2000; Bossard et al., 2003; Soulet et al., 2005) et peut interagir avec la protéine RSK2 (Soulet et al., 2005), le facteur UBF (Upstream Binding Factor) (Sheng et al., 2005), la kinase CK2 et la nucléoline (Bonnet et al., 1996).

b) *Les FGF2 de haut poids moléculaire*

Les isoformes de haut poids moléculaire du FGF2 (22 ; 22,5 ; 24 ; 34 kDa) possèdent toutes une séquence NLS en C-terminal, ainsi qu'une ou deux autres NLS en N-terminal. Ces différentes isoformes sont majoritairement nucléaires (Bugler et al., 1991). Il a été montré que ces isoformes peuvent interagir avec des protéines anti-apoptotiques comme la protéine FIF (FGF2 Interacting Protein) (Van den Berghe et al., 2000). Elles interagissent également avec la protéine SMN (Survival Motor Neuron), impliquée dans le métabolisme des ARN (Claus et al., 2003). Les FGF2 de haut poids moléculaire régulent également la transcription de certains gènes cibles (Quarto et al., 2005). Il a été montré que les FGF2 de haut poids moléculaire peuvent induire la synthèse d'ADN *in vitro* (Davis et al., 1997). Ils induisent également la survie cellulaire *in vivo*, le développement des métastases et leur expression corrèle avec la transformation tumorale de certains types cellulaires (Hupp et al., 1992; Maret et al., 1995; Keller et al., 2001; Olsen and Mann, 2013).

1.2 Le FGF3

Il existe deux isoformes du FGF3, l'une d'elles est sécrétée, tandis que l'autre est adressée au noyau grâce à 3 séquences NLS (1 NLS en N-terminal et 2 NLS en C-terminal) (Kiefer et al., 1994; Antoine et al., 1997). Les deux isoformes du FGF3 ont des activités opposées : le FGF3 sécrété se lie aux FGFRs et induit classiquement la prolifération cellulaire, tandis que la forme nucléaire inhibe la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire

(Kiefer and Dickson, 1995). Le FGF3 nucléaire et nucléolaire interagit avec la protéine NoBP (Nucleolar FGF3 Binding Protein), requise pour la synthèse de la sous-unité 60S du ribosome (Reimers et al., 2001). Le FGF3 nucléaire interagit également avec la protéine RpS2 (Ribosomal protein S2), un composant essentiel de la petite sous-unité du ribosome (Antoine et al., 2005). Cela suggère que le FGF3 intracellulaire et nucléaire inhibe la prolifération cellulaire en interférant avec la biogenèse des ribosomes.

1.3 Les FGFs 11 à 14

Les FGFs 11 à 14, également nommés FHF (Fibroblast growth factor Homologous Factors) sont des FGFs strictement intracellulaires, localisés à la fois dans le cytosol et le noyau (Smallwood et al., 1996; Goldfarb, 2005). Ils sont principalement exprimés dans les cellules neuronales. Pour chaque FHF, 2 isoformes ou plus ont été caractérisées. Elles résultent de l'utilisation de promoteurs alternatifs et de l'épissage alternatif de l'exon 1. Les isoformes de type A possèdent une séquence NLS tandis que les autres isoformes, en particulier celles de type B n'en possèdent pas (Munoz-Sanjuan et al., 2000; Zhang et al., 2012).

Les fonctions des FHF sont encore mal connues. Toutefois, il a été montré que les FHF peuvent interagir avec les domaines intracellulaires des canaux sodium voltage-dépendants (Goldfarb et al., 2007). Ce type d'interaction participerait à la régulation de l'excitabilité électrique des neurones (Goldfarb et al., 2007; Dover et al., 2010). D'autre part, il a été montré que les FHF 11 et 12 interagissent avec la protéine IB2 (Islet Brain 2) (Schoorlemmer and Goldfarb, 2001, 2002), ce qui permet le recrutement et l'activation des MAPK (Schoorlemmer and Goldfarb, 2001).

2 Internalisation des facteurs de croissance et de leurs récepteurs

Les facteurs de croissance NGF (Nerve Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et EGF (Epidermal Growth Factor) exercent classiquement leurs activités en se liant à leurs récepteurs de surface à activité tyrosine kinase. Une fois activés, ces récepteurs membranaires vont induire des voies de signalisation permettant la survie, la prolifération ou la différenciation cellulaire. Toutefois, les complexes facteur de croissance-récepteur peuvent, comme les complexes FGF-FGFRs être internalisés et exercer des activités intracellulaires.

2.1 Internalisation des FGFRs

Les FGFR -1 (Maher, 1996), -2 (Marchetti et al., 2006), -3 (Johnston et al., 1995) et -4 (Citores et al., 2001) peuvent être internalisés dans la cellule et pour certains d'entre eux être transloqués dans le compartiment nucléaire. Les FGFRs ne possédant pas de NLS, la translocation nucléaire se fait vraisemblablement *via* leur interaction avec des protéines pouvant être nucléarisées (FGF1, 2, RSK ...).

Le FGFR1 est le membre de la famille des FGFR dont l'internalisation a été la plus étudiée. Sa translocation nucléaire est dépendante de l'importine β (Reilly and Maher, 2001). La localisation nucléaire du FGFR1 a été mise en évidence dans des cerveaux de rat et de souris (Stachowiak et al., 2003; Fang et al., 2005), dans des cultures primaires de cellules neuronales (Stachowiak et al., 1996b, 1996a; Peng et al., 2002) et dans différentes lignées transformées (Maher, 1996; Reilly and Maher, 2001). Au sein du noyau, le FGFR1 interagit avec la protéine RSK1 d'une part et avec la protéine CBP (CREB Binding Protein) d'autre part. L'association entre CBP et le FGFR1 va induire la différenciation cellulaire. En effet, CBP et le FGFR1 vont activer la transcription en augmentant l'activité de l'ARNpolymérase II et l'acétylation des histones (Fang et al., 2005). Le FGFR1 participe ainsi à la régulation des gènes codant pour le FGF2 (Peng et al., 2002) et stimule la différenciation de culture primaires neuronales humaines.

2.2 Internalisation du NGF et de ses récepteurs

Le NGF est un facteur de croissance principalement neurotrophique. En effet, suite à son interaction avec son récepteur de haute affinité TrkA (Tyrosine kinase receptor A), le NGF régule la survie et la différenciation cellulaires (Zhang et al., 2000). L'internalisation des complexes NGF-TrkA a majoritairement été étudiée dans les cellules PC12 (Hosang and Shooter, 1987). Il a été montré que le mécanisme d'internalisation du NGF et de ses récepteurs dépend des vésicules à manteau de clathrine ainsi que de la dynamine (Zhang et al., 2000). Le complexe est ensuite retrouvé dans les endosomes, à partir desquels il induit préférentiellement la différenciation neuronale, tandis que les complexes NGF-Trk membranaires contrôlent plutôt la survie cellulaire (Zhang et al., 2000; Howe et al., 2001).

Le NGF peut également être transloqué dans le noyau où il va se lier à la chromatine (Rakowicz-Szulczynska et al., 1986; Rakowicz-Szulczynska and Koprowski, 1989; Rakowicz-Szulczynska et al., 1991). La liaison du NGF à la chromatine inhibe la synthèse des ARN et la prolifération cellulaire.

2.3 Internalisation du VEGF et de ses récepteurs

Le VEGF interagit avec les récepteurs membranaires VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor). C'est un facteur de croissance principalement impliqué dans le développement vasculaire et l'angiogenèse (Koch and Claesson-Welsh, 2012). Les complexes VEGF-VEGFR sont internalisés grâce aux vésicules à manteau de clathrine, et il a été montré que cette internalisation est corrélée avec une augmentation de la prolifération cellulaire dans une lignée de cellules endothéliales humaines (Lampugnani et al., 2006). Dans ces mêmes cellules, il a été montré que le VEGF internalisé contrôle la transcription du gène codant pour le VEGFR2 ainsi que celle de gènes codant pour des marqueurs endothéliaux comme les protéines Tie-2 et VE-Cadhérine (E et al., 2012).

Le VEGF et ses récepteurs peuvent également être transloqués dans le compartiment nucléaire. Ainsi, il a été montré que le VEGFR1 co-localise avec les protéines de structure nucléaire, les Lamines (Lee et al., 2007). Le VEGFR2 quant à lui peut interagir avec le facteur de transcription Sp1 et réguler la transcription de son propre gène (Domingues et al., 2011). Le VEGF est lui retrouvé dans le noyau principalement en conditions d'hypoxie (Lejtkowicz et al., 2005; Rosenbaum-Dekel et al., 2005).

2.4 Internalisation de l'EGF et de ses récepteurs

Les membres de la famille des EGFR peuvent être internalisés suite à la liaison de leurs ligands et être transloqués dans le noyau grâce à leur propre séquence NLS (Lin et al., 2001; Ni et al., 2001; Offterdinger et al., 2002; Dittmann et al., 2005). La translocation nucléaire de l'EGFR est dépendante de l'importine β (Lo et al., 2006). L'EGFR nucléaire est impliqué dans la réparation de l'ADN (Dittmann et al., 2005; Wanner et al., 2008; Hsu et al., 2009). Il joue également un rôle important dans la régulation transcriptionnelle. En effet, l'extrémité C-terminale de l'EGFR présente une activité de facteur de transcription qui lui permet notamment de réguler le gène codant pour la cycline D1 (Lin et al., 2001; Kim et al., 2007). L'EGFR peut également interagir avec différents facteurs de transcription comme STAT3 (Lo et al., 2006), STAT5 (Hung et al., 2008) et E2F1 (Hanada et al., 2006). La localisation nucléaire de l'EGFR est associée à un mauvais pronostic vital des patientes atteintes de cancers du sein (Lo et al., 2005) ou des ovaires (Xia et al., 2009) car il induit des résistances aux chimiothérapies (Hsu et al., 2009) et aux radiothérapies (Lo et al., 2005).

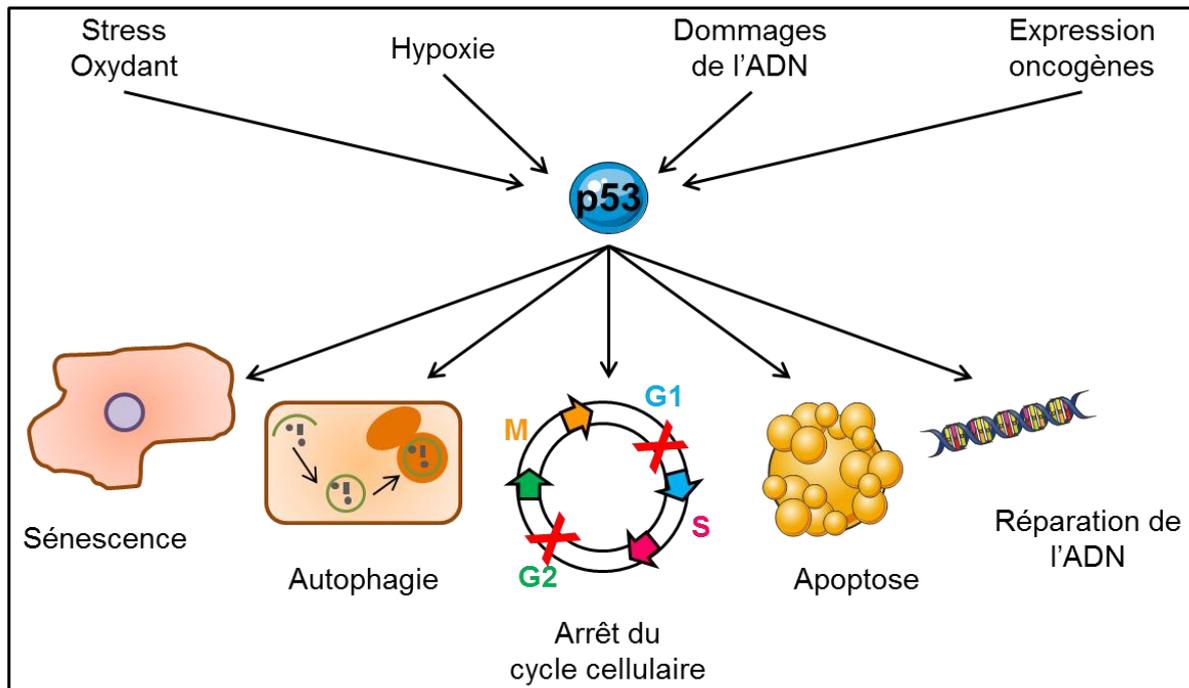


Figure 15 : Activités de p53.

La protéine p53 peut être activée suite à différents stress cellulaires comme l'hypoxie ou des dommages de l'ADN. Suite à son activation, p53 régule de nombreux processus cellulaires comme l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la réparation de l'ADN. D'après (Biegging and Attardi, 2012).

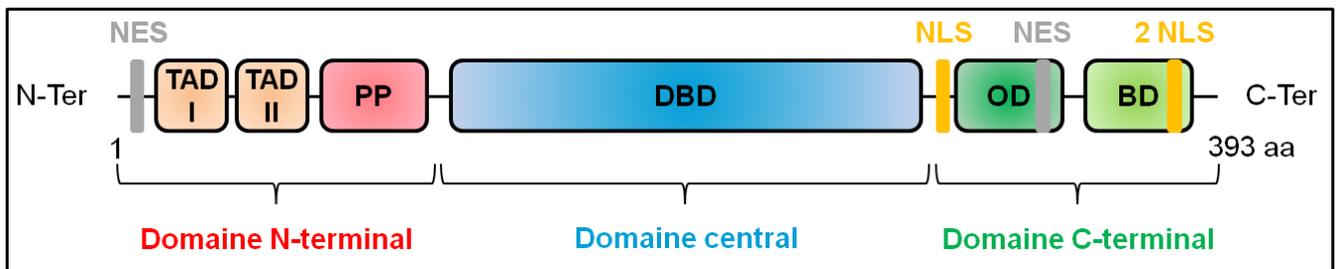


Figure 16 : Structure de p53.

La protéine p53 est composée d'un domaine N-terminal comprenant les domaines d'activation de la transcription TADI et TADII ainsi que le domaine riche en proline PP, d'un domaine central comprenant le domaine de liaison à l'ADN (DBD pour DNA Binding Domain) et enfin d'un domaine C-terminal comprenant le domaine d'oligomérisation(OD) et le domaine régulateur riche en acides aminés basiques (BD). La protéine p53 possède 2 NES et 3 NLS qui régulent sa localisation nucléo-cytoplasmique. D'après (Millau et al., 2009; Vousden and Prives, 2009; Rajagopalan et al., 2010).

IV. La protéine p53

La protéine p53 a été découverte simultanément par plusieurs équipes en 1979 (DeLeo et al., 1979; Kress et al., 1979; Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979; Melero et al., 1979). Tout d'abord classée comme un oncogène, il a été montré que c'est en réalité un oncosuppresseur (Baker et al., 1990).

Également nommée « le gardien du génome » (Lane, 1992), la protéine p53 peut être activée suite à différents stress cellulaires comme l'hypoxie (Hammond et al., 2002) ou des dommages de l'ADN (Maltzman and Czyzyk, 1984; Kastan et al., 1991). La protéine p53, qui agit principalement en tant que facteur de transcription, intervient dans un grand nombre de processus cellulaires comme l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou encore l'apoptose (**Figure 15**) (Vousden and Prives, 2009; Biegging and Attardi, 2012). Les activités de p53 sont modulées par des interactions avec des protéines comme MDM2 (Mouse Double Minute 2) ou CBP (CREB Binding Protein)/p300, ou par des modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations, des ubiquitinations, ou des acétylations.

1 Structure et localisation de p53

1.1 Structure de la protéine p53

La protéine p53 humaine contient 393 acides aminés et est composée de 3 domaines principaux : le domaine N-terminal, le domaine central et le domaine C-terminal qui contiennent chacun un ou plusieurs sous-domaines régulant les activités de p53 (**Figure 16**) (Millau et al., 2009; Biegging and Attardi, 2012).

Le **domaine N-terminal** contient 2 domaines TAD (Transcription Activation Domain), les domaines TAD I et TAD II, ainsi qu'un domaine riche en proline : PRD (Proline Rich Domain) (Fields and Jang, 1990; Raycroft et al., 1990; Dawson et al., 2003). Les domaines TAD I et TAD II permettent le recrutement de protéines impliquées dans le complexe d'initiation de la transcription comme le facteur TFIID (Liu et al., 1993) ou de protéines co-activatrices de la transcription comme la protéine CBP/p300 (Gu et al., 1997; Grossman, 2001) ou de protéines impliquées dans son rétro-contrôle négatif comme MDM2 (Wu et al., 1993). Le domaine riche en proline est composé de plusieurs répétitions du motif PXXP. Il joue un rôle dans la régulation des activités transcriptionnelles et non transcriptionnelles de p53. Enfin, le domaine N-terminal contient une séquence d'export nucléaire NES (Nuclear Export Sequence).

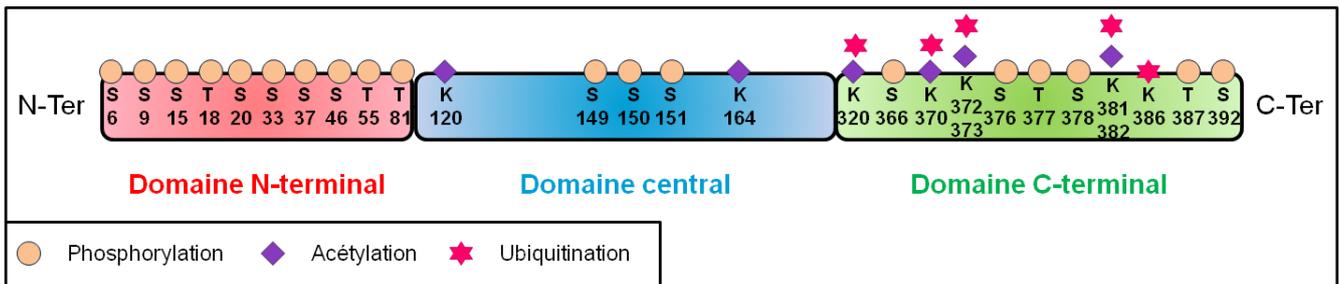


Figure 17 : Modifications post -traductionnelles de p53.

La protéine p53 humaine peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations, des acétylations ou encore des ubiquitinylation. Ces modifications régulent les activités de p53, ainsi que sa localisation cellulaire ou ses interactions protéiques. D'après (Lavin and Gueven, 2006; Olsson et al., 2007).

Le **domaine central de p53** contient le domaine de liaison à l'ADN, le domaine DBD (DNA Binding Domain) (Kern et al., 1991; Bargonetti et al., 1993; Pavletich et al., 1993). Ce domaine est essentiel aux activités transcriptionnelles de p53. Certains acides aminés de ce domaine peuvent subir des modifications post-traductionnelles qui vont réguler les activités de p53. De plus, il a été montré que plus de 80% des mutations de p53 retrouvées dans les cancers affectent le domaine DBD (Hainaut et al., 1998; Olivier et al., 2002).

Le **domaine C-terminal** contient notamment le domaine d'oligomérisation OD (Oligomerization Domain). Ce domaine permet la formation d'un tétramère de p53 qui va ensuite se lier aux promoteurs de ses gènes cibles (Kraiss et al., 1988). Enfin, le domaine C-terminal comprend également un domaine régulateur riche en acides aminés basiques : c'est le domaine BD (Basic Domain). Ce domaine permettrait à p53 de « balayer » l'ADN afin d'identifier ses séquences cibles (McKinney et al., 2004). Le domaine N-terminal contient également 3 séquences NLS et une séquence NES.

1.2 Localisation de la protéine p53

La protéine p53 peut être localisée dans le cytosol, le noyau ou les mitochondries. Le trafic nucléo-cytoplasmique de p53 est assuré par ses séquences NLS et NES (**Figure 16**). La protéine p53 possède en effet 3 séquences NLS au niveau de son domaine C-terminal (Dang and Lee, 1989; Shaulsky et al., 1990; Liang and Clarke, 1999), ainsi que 2 séquences NES, l'une au niveau du domaine N-terminal et l'autre au niveau du domaine C-terminal (Stommel et al., 1999; Zhang and Xiong, 2001). Le trafic nucléo-cytoplasmique de p53 participe à la régulation de ses différentes activités. De plus, il a été montré que la protéine p53 peut être associée aux membranes et à la matrice mitochondriales (Marchenko et al., 2000; Ferecatu et al., 2009; Bergeaud et al., 2013), bien qu'aucun peptide d'adressage à la mitochondrie n'ait été identifié dans la structure de p53.

2 Modifications post-traductionnelles de p53

Les activités de la protéine p53 sont finement régulées notamment *via* des modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitinylation, la phosphorylation ou encore l'acétylation (**Figure 17**). Ces modifications peuvent entraîner la stabilisation et l'activation de p53 ou au contraire sa dégradation (Lavin and Gueven, 2006; Olsson et al., 2007).

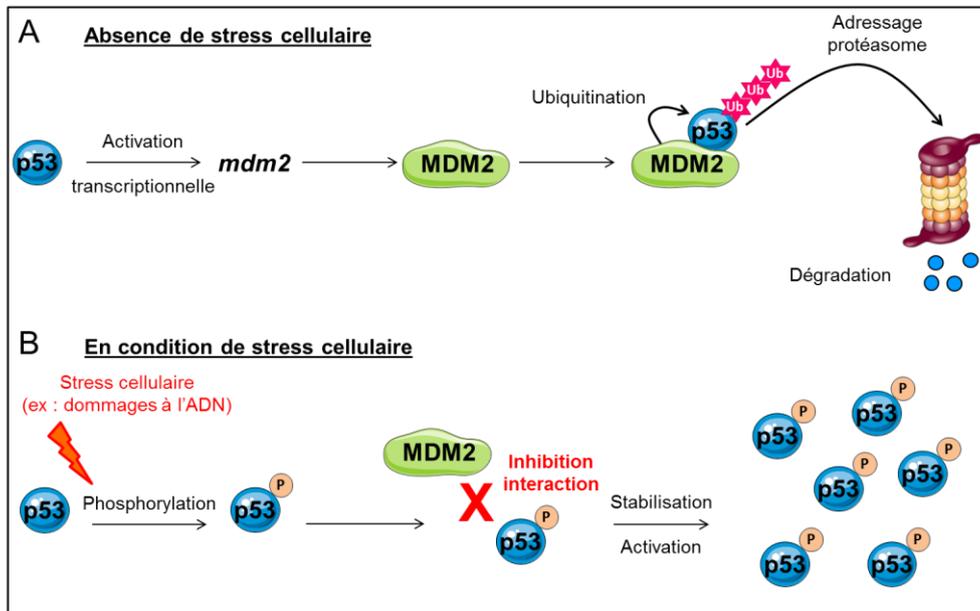


Figure 18 : Régulation du niveau et de l'activité de p53.

(A) En absence de stress, la protéine p53 active la transcription du gène codant pour MDM2. MDM2 interagit avec p53 et l'ubiquitine, ce qui entraîne la dégradation de p53 par le protéasome. (B) Suite à un stress cellulaire comme des dommages à l'ADN, p53 est phosphorylée, ce qui inhibe son interaction avec MDM2, permettant la stabilisation et l'activation de p53.

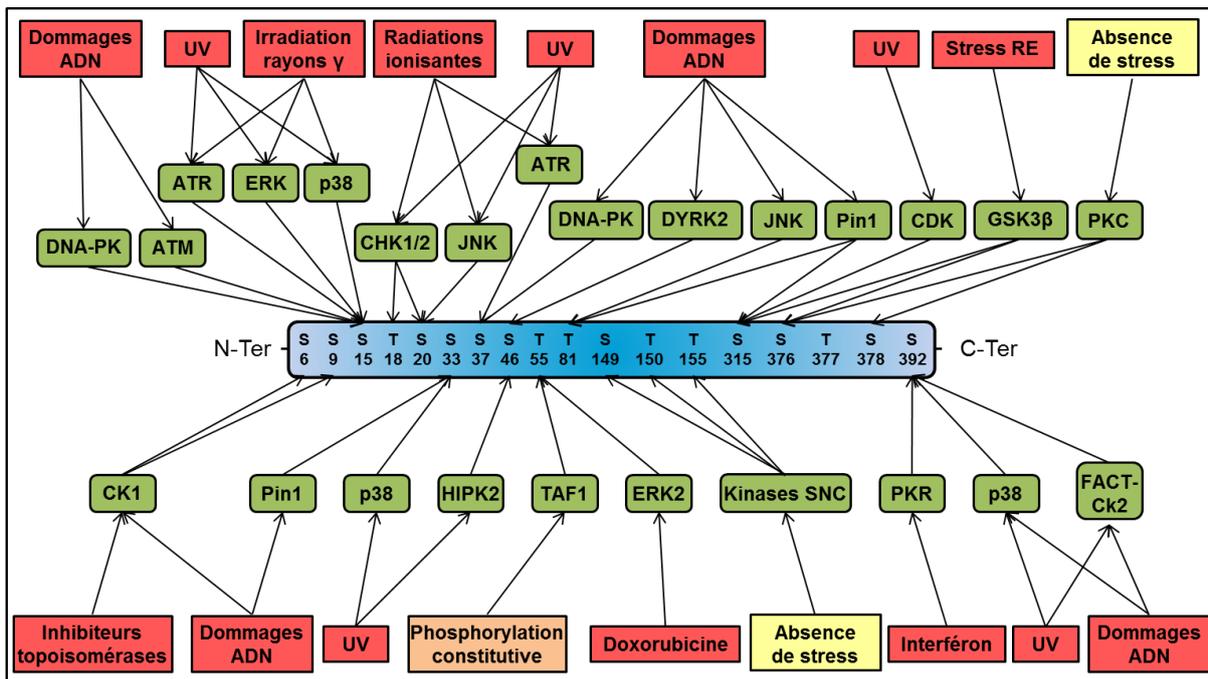


Figure 19 : Phosphorylations de p53 : de nombreux stimuli et de nombreuses kinases.

La protéine p53 humaine peut être phosphorylée sur de nombreux résidus sérine et thréonine. Les phosphorylations sont des phénomènes très dynamiques et redondants. En effet, un grand nombre de stimuli (en rouge) peuvent conduire à l'activation de nombreuses kinases (en vert), qui vont phosphoryler p53. Un site de phosphorylation peut être la cible de plusieurs kinases. De la même façon, une kinase peut phosphoryler plusieurs résidus. D'après (Olsson et al., 2007).

2.1 Ubiquitylation

En absence de stress cellulaire, la protéine p53 est maintenue à un niveau très faible dans la cellule notamment grâce à la protéine MDM2. La protéine MDM2 est une E3 ubiquitine ligase (Honda et al., 1997) qui interagit avec le domaine N-terminal de la protéine p53 (Chen et al., 1993; Oliner et al., 1993), inhibant ses activités transactivatrices (Momand et al., 1992). La protéine MDM2 peut ubiquitinyler plusieurs résidus lysine présents au niveau du domaine C-terminal de p53 (Fuchs et al., 1998; Rodriguez et al., 2000). Lorsque la protéine MDM2 est présente à un faible niveau dans la cellule, elle mono-ubiquitine p53, ce qui induit son export nucléaire (Li et al., 2003). En revanche, en présence d'un fort niveau de MDM2, p53 est poly-ubiquitinée, ce qui induit sa dégradation par le protéasome (Maki et al., 1996; Kubbutat et al., 1997; Li et al., 2003). Le gène codant pour la protéine MDM2 est une cible transcriptionnelle de p53, qui assure ainsi son propre rétrocontrôle négatif (**Figure 18A**) (Wu et al., 1993).

2.2 Phosphorylation

La protéine p53 peut être phosphorylée sur de nombreux résidus sérine et thréonine localisés au niveau de ses domaines N-terminal et C-terminal. Les phosphorylations sont des phénomènes très dynamiques et redondants. En effet, de nombreux stimuli comme des dommages à l'ADN, une exposition aux UV ou des radiations peuvent induire l'activation d'un grand nombre de kinases (**Figure 19**). Ces kinases peuvent phosphoryler plusieurs acides aminés de p53. La plupart des sites de phosphorylation de p53 sont la cible de plusieurs kinases (Kruse and Gu, 2009).

La plupart des phosphorylations de p53 sont activatrices et régulent ses activités ainsi que ses interactions protéiques. Les phosphorylations les plus étudiées sont celles des sérines 15 et 20. En effet, il a été montré que les phosphorylations de ces résidus sont souvent associées. La sérine 15 peut être phosphorylée, généralement suite à des dommages de l'ADN, par les kinases ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998; Khanna et al., 1998), ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related) (Tibbetts et al., 1999), DNA-PK (DNA-Protein Kinase) (Lees-Miller et al., 1992) et Chk1 (Checkpoint kinase 1) (Goudelock et al., 2003). Le résidu sérine 20 est lui principalement phosphorylé par la kinase Chk2 (Checkpoint kinase 2) (Craig et al., 2003). Les résidus sérine 15 et sérine 20 se trouvent dans le domaine N-terminal de p53, à proximité du domaine d'interaction avec MDM2. Il a été montré que la phosphorylation des sérines 15 et 20 induit un changement de conformation au niveau du domaine N-terminal de p53, inhibant ainsi son interaction avec MDM2, ce qui

contribue à sa stabilisation (**Figure 18B**) (Shieh et al., 1997; Chehab et al., 1999; Shieh et al., 1999; Unger et al., 1999).

La phosphorylation d'autres résidus de p53 régule également ses activités. Ainsi, la phosphorylation de la sérine 46 suite à des dommages à l'ADN participe à l'activation transcriptionnelle par p53 de certains gènes cibles codant pour des protéines pro-apoptotiques comme p53AIP1 (Oda et al., 2000b). La phosphorylation de la sérine 392 va quant à elle permettre la stabilisation de p53 sous forme de tétramère, favorisant ainsi sa liaison à l'ADN (Sakaguchi et al., 1997). D'autre part, une phosphorylation de la sérine 315 va favoriser son interaction avec le facteur de transcription E2F1, induisant une séquestration de p53 dans le compartiment nucléaire (Fogal et al., 2005).

2.3 Acétylation

Plusieurs résidus lysine principalement situés au niveau du domaine C-terminal de p53 peuvent être acétylés, notamment par la protéine CBP/p300, une histone acétyltransférase (Shikama et al., 1999). Les acétylations de p53 par la protéine CBP/p300 peuvent modifier sa conformation, ce qui favorise sa liaison à l'ADN (Gu and Roeder, 1997). Il a également été montré que l'acétylation de p53 inhibe son interaction avec MDM2 et donc son ubiquitinylation, ce qui favorise sa stabilisation (Li et al., 2002; Tang et al., 2008). De même, l'acétylation de p53 peut induire son accumulation et l'arrêt du cycle cellulaire (Yuan et al., 1999).

3 Activités oncosuppressives de la protéine p53

p53 est un oncosuppresseur qui agit principalement comme un facteur de transcription. Activé suite à différents stress cellulaires comme l'hypoxie ou des dommages à l'ADN, p53 régule l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou encore l'induction de l'apoptose. Ainsi, suite à des dommages de l'ADN, la protéine p53 induit un arrêt du cycle cellulaire qui permettra de réparer l'ADN ou bien l'apoptose qui permettra d'éliminer les cellules dont l'ADN est endommagé et donc potentiellement dangereuses pour l'organisme. Plus récemment, certaines études ont montré que p53 est également impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique, le stress oxydant ou encore dans l'autophagie (Bieging and Attardi, 2012). Nous ne détaillerons ici que les activités oncosuppressives les plus couramment décrites de p53.

3.1 p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est composé de 4 phases distinctes : la phase de latence G1, la phase de réplication de l'ADN S, la phase de latence G2 et la phase de mitose M. Des points de contrôle assurés par les complexes Cyclines/Cdk (Cycline-dependent kinases) permettent de réguler le passage d'une phase à l'autre (Patil et al., 2013). La protéine p53 active la transcription de gènes codant pour des protéines régulant les complexes Cycline/Cdk comme les protéines p21, 14-3-3 σ et GADD45 (Growth Arrest and DNA-Damage 45). Le gène codant pour la protéine p21 est l'une des premières cibles transcriptionnelles de p53 à avoir été identifiée (el-Deiry et al., 1993). Il a été montré que la protéine p21 est un inhibiteur des Cdk (Harper et al., 1993) et induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (el-Deiry et al., 1994). La transition G1/S est assurée par le complexe Cycline D/Cdk4-6, qui phosphoryle l'oncosuppresseur Rb (Retinoblastoma protein). La phosphorylation de la protéine Rb inhibe son interaction avec le facteur de transcription E2F, qui est alors libéré et qui va induire la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans le contrôle de la transition G1/S. La protéine p21 interagit avec le complexe CyclineD/Cdk4-6, inhibant la phosphorylation de Rb et donc l'activité transcriptionnelle de E2F, ce qui bloque la transition G1/S (Afshari et al., 1996).

La protéine p21 peut également induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2, tout comme deux autres cibles transcriptionnelles de p53, les protéines 14-3-3 σ et GADD45 (Kastan et al., 1992; Hermeking et al., 1997; Bunz et al., 1998). Les protéines p21, 14-3-3 σ et GADD45 inhibent notamment le complexe Cycline B1/Cdk1, qui contrôle le passage de la phase G2 à la phase M (**Figure 20**) (Hermeking et al., 1997; Zhan et al., 1999).

L'arrêt du cycle cellulaire induit par p53 peut conduire à la sénescence, à la réparation de l'ADN ou bien à l'apoptose si les dommages sont trop importants.

3.2 p53 et la réparation de l'ADN

Il existe de nombreux mécanismes de réparation de l'ADN comme les systèmes MMR (Mismatch Repair), NHEJ (Non Homologous End-Joining), NER (Nucleotide Excision Repair) et BER (Base Excision Repair) (Janicke et al., 2008). La protéine p53 peut participer à la réparation de l'ADN *via* ses activités transcriptionnelles ou indépendamment de celles-ci.

a) Activités non transcriptionnelles de p53

D'une part, il a été montré que la protéine p53 possède une activité exonucléase 3'-5' (Mummenbrauer et al., 1996). Cette activité lui permet de se lier à des bases mal appariées au

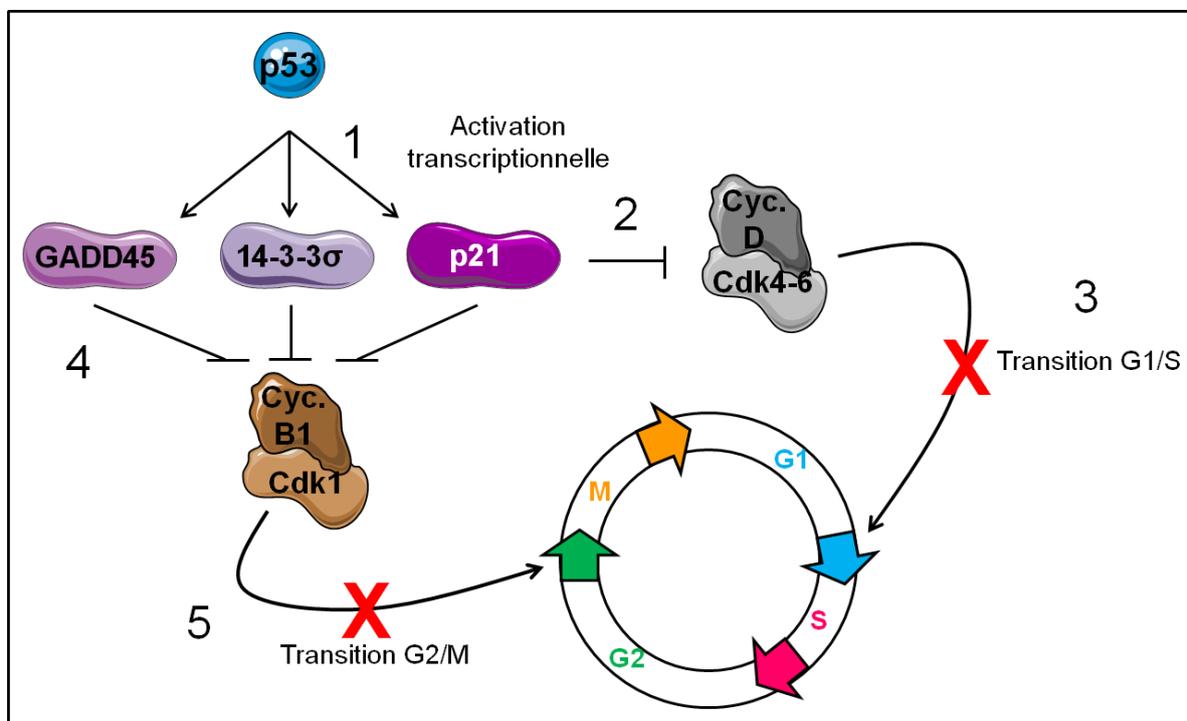


Figure 20 : p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire.

p53 active la transcription des gènes codant pour les protéines GADD45, 14-3-3 σ et p21 (1). Ce sont des inhibiteurs des complexes Cyclines-Cdk qui régulent les transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire. p21 inhibe le complexe Cycline D/Cdk4-6 (2) qui contrôle la transition G1/S (3). p21, tout comme les protéines GADD45 et 14-3-3 σ inhibe également le complexe Cycline B1/Cdk1 (4) qui régule la transition G2/M (5).

niveau des cassures doubles brins de l'ADN et de participer à leur excision (Huang, 1998; Skalski et al., 2000; Bakhanashvili, 2001; Bakhanashvili et al., 2010).

D'autre part, la protéine p53 est impliquée dans le système de réparation BER (Offer et al., 1999). En effet, il a été montré que p53 interagit avec les protéines APE1/Ref1 (Apurinic Endonuclease/Redox-Factor1), DNA polymérase β (Zhou et al., 2001; Seo et al., 2002) et OGG1 (8-Oxoguanine DNA Glycosylase) (Achanta and Huang, 2004), participant ainsi à la réparation de l'ADN.

b) Activités transcriptionnelles de p53

Plus classiquement, p53 participe également à la réparation de l'ADN en régulant l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans les systèmes de réparation NER et MMR. p53 induit ainsi l'expression des protéines XPC (Xeroderma Pigmentosum C) et p48XPE (Xeroderma Pigmentosum E) (Hwang et al., 1999; Adimoolam and Ford, 2002), impliquées dans le système NER et celle des protéines MSH2 (MutS protein Homolog 2), MLH1 (MutL Homolog 1) et PMS2 (Postmeiotic Segregation increased 2) (Scherer et al., 2000; Warnick et al., 2001; Chen and Sadowski, 2005) impliquées dans le système MMR.

3.3 p53 et l'apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire programmée essentielle au développement et à la survie des organismes pluricellulaires (cf V. L'apoptose). Il existe deux voies principales d'induction de l'apoptose : la voie intrinsèque ou voie mitochondriale, et la voie extrinsèque ou voie des récepteurs à domaine de mort. Les protéines effectrices de l'apoptose sont les caspases, des protéases à cystéine qui clivent un grand nombre de substrats protéiques dans la cellule. Les protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (qui comprend des membres pro- et anti-apoptotiques), quant à elles, sont impliquées dans la régulation de l'apoptose : elles participent notamment aux régulations mitochondriales survenant au cours de l'apoptose (chute du potentiel de membrane mitochondrial et perméabilisation membranaire). La protéine p53 participe à la régulation de l'apoptose soit en interagissant avec différents membres de la famille Bcl-2, soit en régulant l'expression de gènes codant pour des protéines anti- ou pro-apoptotiques intervenant dans les deux voies principales de signalisation de l'apoptose.

a) Activités non transcriptionnelles de p53

Il a été montré que la protéine p53 peut être localisée au niveau de la mitochondrie. Là, elle peut interagir, indépendamment de ses activités transcriptionnelles, avec des membres pro-apoptotique de la famille Bcl-2 comme Bak (Bcl-2 antagonist killer), dont elle favorise l'oligomérisation et donc l'activation (Leu et al., 2004) ou Bad (Bcl-2 antagonist of cell death) (Jiang et al., 2006), participant ainsi à l'apoptose. Elle participe également à l'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 : il a été montré que l'interaction entre p53 et les protéines Bcl-2 et Bcl-X_L favorise la perméabilisation des membranes mitochondriales et la libération dans le cytosol de protéines pro-apoptotiques comme le cytochrome c (Mihara et al., 2003; Tomita et al., 2006).

b) Activités transcriptionnelles de p53

La protéine p53 régule la transcription de gènes codant pour différents membres de la famille Bcl-2. D'une part, il a été montré que p53 réprime la transcription des gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques comme les protéines Bcl-2 (Miyashita et al., 1994; Wu et al., 2001) et Mcl-1 (Pietrzak and Puzianowska-Kuznicka, 2008). D'autre part, p53 est un activateur transcriptionnel des gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques comme les protéines Bax (Bcl-2 associated x protein) (Miyashita et al., 1994; Miyashita and Reed, 1995; Pearson et al., 2000; Chipuk et al., 2004), PUMA (Nakano and Vousden, 2001; Yu et al., 2001), Noxa (Oda et al., 2000a), Bak (Pearson et al., 2000) ou encore Bid (BH3 Interacting domain Death agonist) (Sax et al., 2002). Les membres de la famille Bcl-2 sont principalement impliqués dans la régulation de la voie mitochondriale de l'apoptose.

p53 régule également la transcription de gènes codant pour des récepteurs à domaines de mort. Ces récepteurs membranaires, une fois activés par leurs ligands, induisent la voie extrinsèque de l'apoptose. Il a été montré que p53 induit la transcription des gènes codant pour les récepteurs Fas (Owen-Schaub et al., 1995; Muller et al., 1998) et TRAIL-R (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor) (Takimoto and El-Deiry, 2000).

Enfin, p53 induit l'expression de protéine pro-apoptotiques comme la caspase effectrice 6 (MacLachlan and El-Deiry, 2002), ou la protéine adaptatrice Apaf-1 qui participe à l'activation de la caspase-9 (Moroni et al., 2001). p53 réprime également des protéines connues pour leurs activités anti-apoptotiques comme l'inhibiteur de caspases Survivine (Hoffman et al., 2002; Mirza et al., 2002), le facteur de croissance FGF1 (Bouleau et al., 2005) ou l'IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor) (Ohlsson et al., 1998).

La protéine p53 est donc un régulateur majeur de l'apoptose, de façon dépendante ou non de ses activités transcriptionnelles.

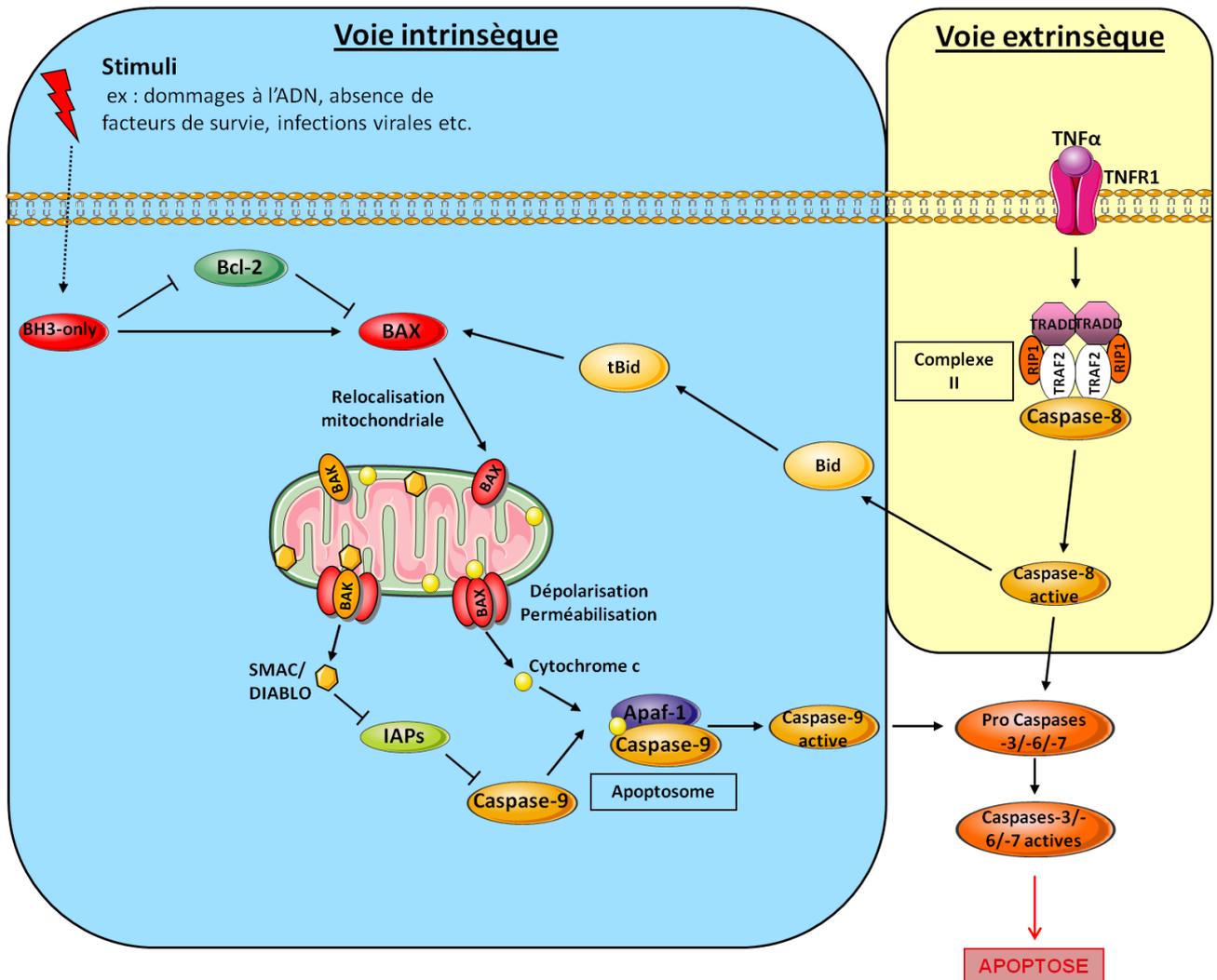


Figure 21 : Les deux voies principales de l'apoptose.

Il existe deux voies principales de signalisation de l'apoptose : la voie extrinsèque (en jaune), ou voie des récepteurs à domaine de mort, et la voie intrinsèque (en bleu), ou voie mitochondriale. La voie intrinsèque peut être activée par différents stimuli comme des dommages à l'ADN, une absence de facteurs de croissance ou encore une infection virale. Ces deux voies aboutissent à l'activation des protéines effectrices de l'apoptose, les caspases. La voie extrinsèque peut rejoindre la voie de signalisation mitochondriale *via* le clivage de Bid en tBid.

V. L'apoptose

1 Généralités sur l'apoptose

Identifiée en 1972, l'apoptose est une mort cellulaire programmée caractérisée par une fragmentation de l'ADN, une condensation du noyau et du cytoplasme et la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques qui sont ensuite phagocytés ou éliminés par les cellules environnantes (Kerr et al., 1972; Wyllie, 1980).

L'apoptose joue un rôle majeur au cours du développement et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Au cours du développement, l'apoptose permet d'éliminer des structures comme les canaux de Muller et de Wolff ou les cellules interdigitales. Elle participe également au maintien de l'homéostasie tissulaire en éliminant les cellules dangereuses pour l'organisme (Jacobson et al., 1997).

Des dérégulations de l'apoptose peuvent entraîner diverses pathologies. Ainsi, un excès d'apoptose est retrouvé dans des pathologies comme le SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise) ou les maladies neurodégénératives, tandis qu'un défaut d'apoptose a été constaté dans les maladies auto-immunes et les cancers (Thompson, 1995). Il a notamment été montré que l'insensibilisation à l'apoptose est un marqueur majeur des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2000) et que les dérégulations de l'apoptose dans les cancers participent à la résistance aux différentes thérapies anti-cancer.

Il existe deux voies principales de signalisation de l'apoptose : la voie extrinsèque, ou voie des récepteurs à domaine de mort, et la voie intrinsèque, ou voie mitochondriale (**Figure 21**). La voie extrinsèque est induite suite à l'activation de récepteurs à domaine de mort (TNF-R, TRAIL-R etc) tandis que la voie intrinsèque peut être activée suite à des dommages de l'ADN (activation de p53), à l'absence de facteurs de survie ou à un stress oxydant. Ces deux voies aboutissent à l'activation des protéines effectrices de l'apoptose, les caspases (Strasser et al., 1995; Elmore, 2007; Fiandalo and Kyprianou, 2012). Il existe également des voies de signalisation de l'apoptose indépendantes des caspases (cysteinyl aspartate cleaving protease) qui sont médiées par d'autres protéases comme les calpaïnes ou les cathepsines (Broker et al., 2005; Kroemer and Martin, 2005). Nous ne détaillerons ici que les voies de signalisation de l'apoptose dépendantes des caspases.

2 Les Caspases

Les caspases sont des protéases à cystéine impliquées dans les voies de signalisation de l'inflammation et de l'apoptose. La famille des caspases comprend 18 membres chez les

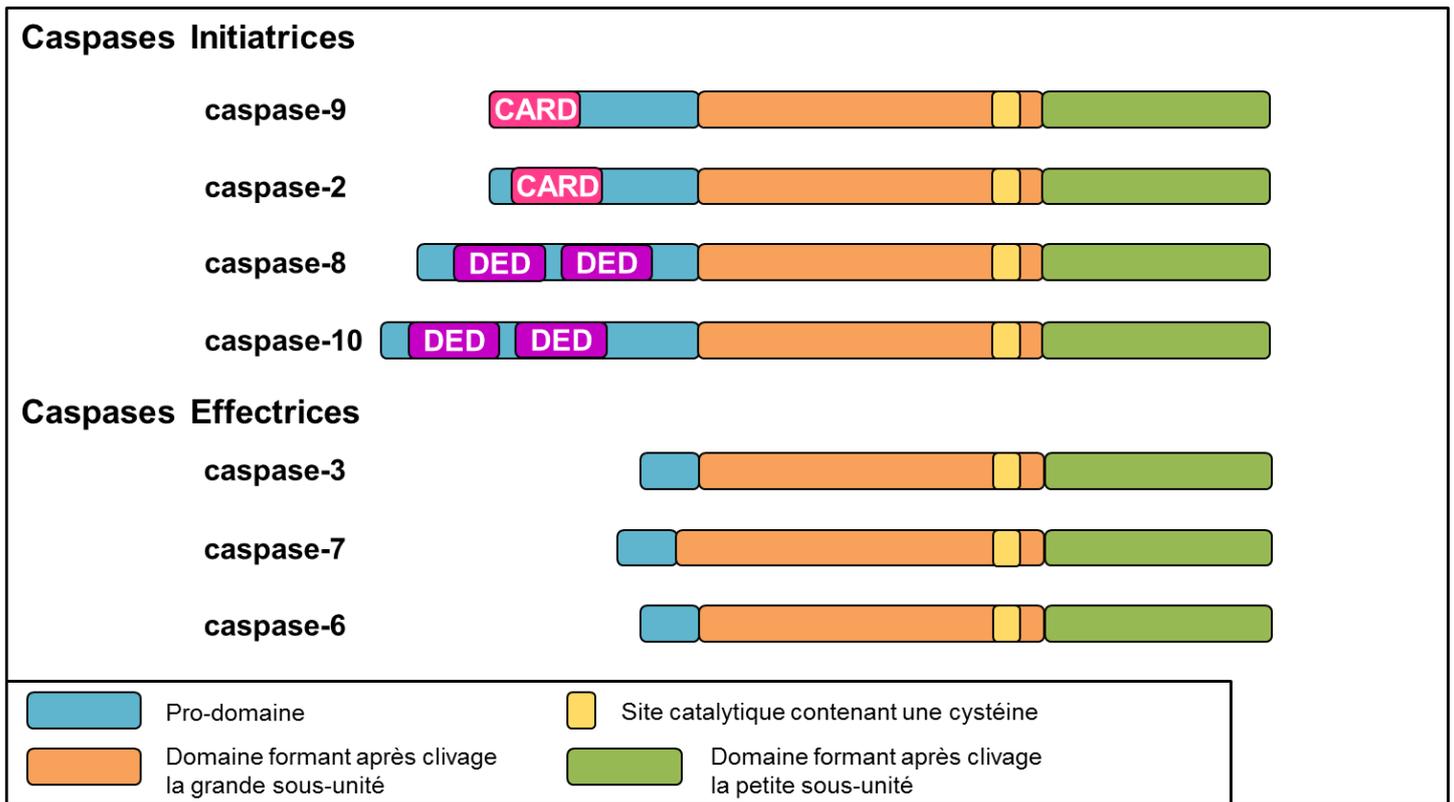


Figure 22 : Structure des caspases.

Les caspases sont constituées d'un pro-domaine plus ou moins long (en bleu), d'un domaine formant après clivage la grande sous-unité (en orange) et qui contient le site catalytique (en jaune), et d'un domaine formant après clivage la petite sous-unité (en vert). Les pro-domaines des caspases initiatrices contiennent des domaines CARD ou DED permettant le recrutement des caspases au sein de complexes activateurs comme le DISC ou l'Apoptosome.

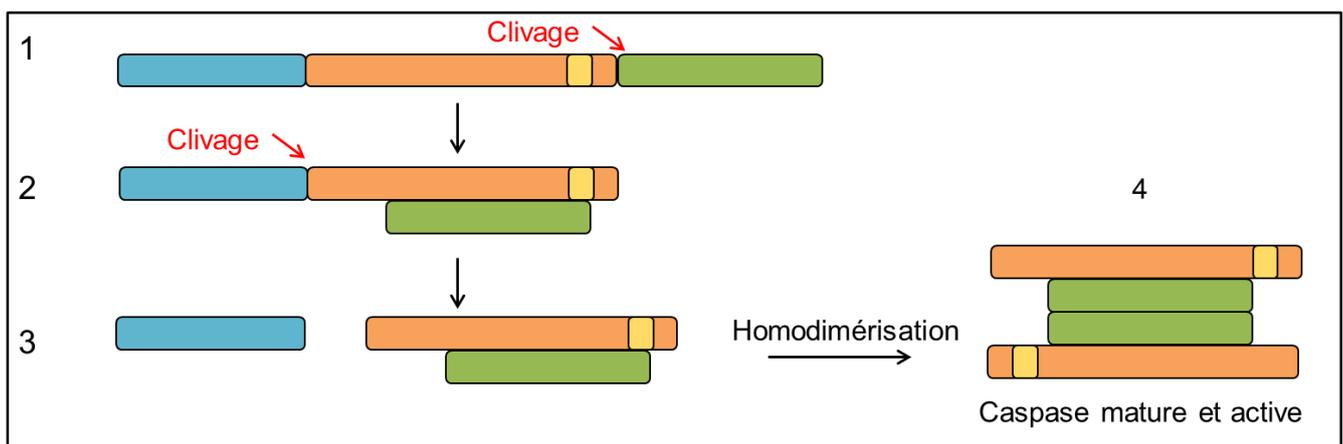


Figure 23 : Clivage des caspases effectrices.

Les caspases effectrices vont subir un premier clivage (1) qui libère la petite sous-unité. Celle-ci interagit avec la grande sous-unité (2). Le deuxième clivage permet d'éliminer le pro-domaine (3). Deux caspases clivées interagissent alors pour former une caspase mature et active (4).

mammifères (Eckhart et al., 2008), nous ne détaillerons ici que les caspases impliquées dans l'apoptose. Dans les cellules, la plupart des caspases sont présentes sous forme zymogène, c'est-à-dire inactive. Elles sont activées par homodimérisation et par clivage pour certaines d'entre elles. Elles ont pour substrats d'autres caspases ainsi qu'un grand nombre de protéines essentielles à la survie cellulaire. Au cours de l'apoptose, les caspases activées initialement vont cliver et activer d'autres caspases : c'est la cascade d'activation des caspases, qui permet d'amplifier et de prolonger le signal apoptotique. L'activité des caspases peut être régulée par les protéines de la famille des IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein) (Riedl and Shi, 2004; Lavrik et al., 2005; Pop and Salvesen, 2009).

2.1 Structure, activation et activités des caspases

a) Structure et activation des caspases

Les caspases présentent une structure très conservée (**Figure 22**) : elles sont constituées d'un pro-domaine plus ou moins long en N-terminal, d'un domaine qui constitue, suite au clivage, la grande sous-unité, porteuse du site catalytique, et d'un domaine en C-terminal qui deviendra, suite au clivage, la petite sous-unité. Elles sont divisées en 2 sous-groupes : les caspases initiatrices (-2,-8,-9,-10), qui possèdent un long pro-domaine et les caspases effectrices (-3, -6, -7) qui possèdent un pro-domaine court.

Les caspases initiatrices vont être recrutées au sein de complexes activateurs grâce à leur pro-domaine. Celui-ci contient en effet des domaines DED (Death Effector Domain) (caspases-8 et -10) ou CARD (CAspase Recruitment Domain) (caspase-9) qui permettent aux caspases d'interagir avec les protéines formant les complexes d'activation (**Figure 22**). Le complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex) permet le recrutement et l'auto-activation des caspases-8 ou -10 (Boldin et al., 1995), tandis que l'apoptosome permet de recruter et d'activer la caspase-9 (Acehan et al., 2002).

Les caspases effectrices ne possèdent quant à elles pas de domaine de recrutement au sein des complexes activateurs. Elles sont clivées et activées par des caspases initiatrices matures et actives ou par des caspases effectrices activées en amont : c'est la cascade des caspases. Les caspases effectrices subissent deux clivages successifs : le premier clivage a lieu entre les domaines permettant l'obtention des petite et grande sous-unités, le deuxième permet d'éliminer le pro-domaine. Les 2 sous-unités de la caspase interagissent puis deux caspases clivées interagissent entre elles, formant un homodimère actif présentant deux sites catalytiques (**Figure 23**) (Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994).

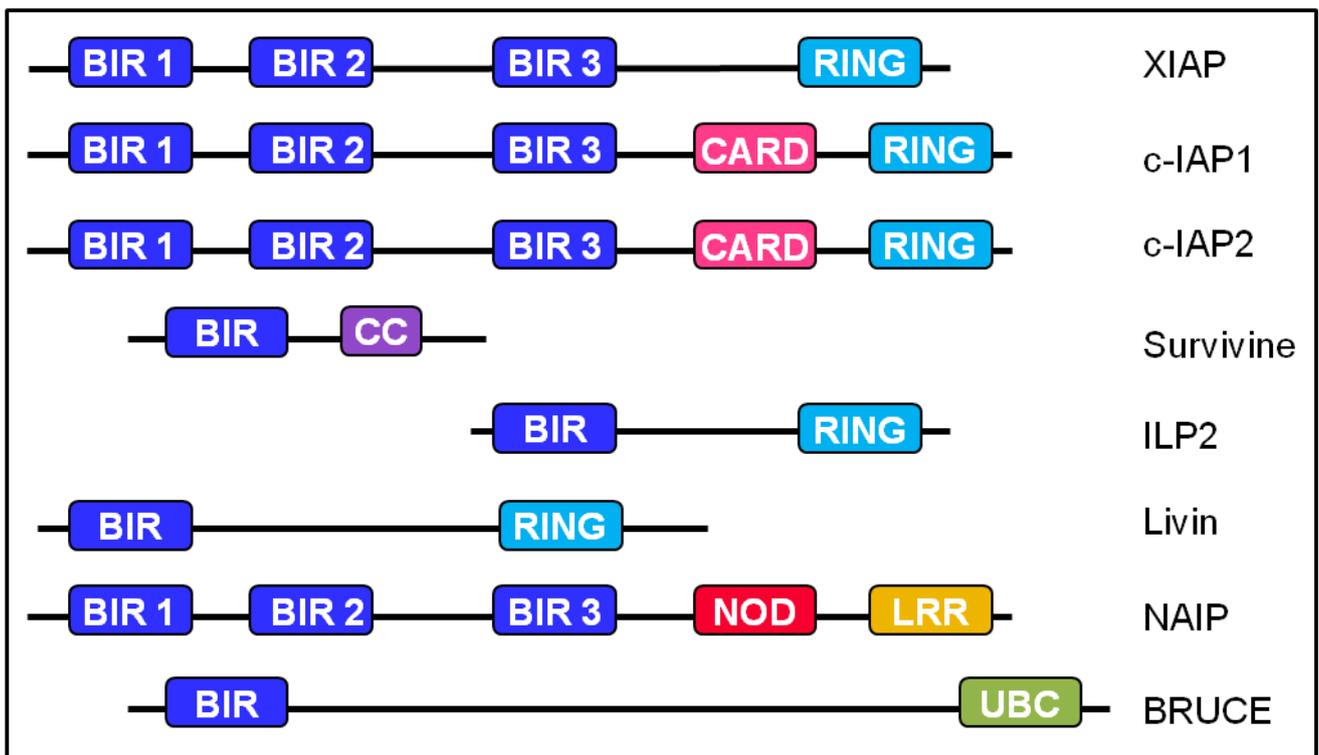


Figure 24 : Structure des protéines de la famille des IAPs.

Les IAPs présentent entre 1 et 3 domaines BIR (en bleu foncé), ainsi que pour certains d'entre eux un domaine RING (en bleu clair) à activité E3 ubiquitine ligase. Certains membres de la famille présentent également des domaines NOD (Nucleotide Binding and Oligomerization Domain), LRR (Leucin Rich Repeat), CC (Coil-Coiled) ou encore UBC (Ubiquitin Conjugating). D'après (LaCasse et al., 2008).

b) Activités et substrats des caspases

Une fois activées, les caspases vont cliver leurs différents substrats. Les sites actifs des caspases qui contiennent une cystéine (QACXG) reconnaissent des séquences cibles de 4 acides aminés spécifiques se terminant par un acide aspartique. C'est après ce résidu que les caspases clivent leurs substrats. Ainsi, les caspases -2, -3 et -7 reconnaissent principalement des motifs de type DEXD tandis que les caspases -6, -8 et -9 reconnaissent plutôt des motifs de type (L/V)EXD (Lavrik et al., 2005).

Les caspases actives ont pour cible les pro-caspases, c'est la cascade d'activation des caspases, qui permet d'amplifier et de prolonger le signal apoptotique.

Les caspases peuvent cliver un grand nombre de substrats et intervenir dans de nombreux mécanismes cellulaires comme l'adhésion, la régulation de la transcription, la signalisation *via* les kinases, le cycle cellulaire, et l'apoptose (Earnshaw et al., 1999; Fuentes-Prior and Salvesen, 2004).

Des protéines du cytosquelette comme l'actine (Mashima et al., 1997) ou les kératines (Caulin et al., 1997), ainsi que des protéines de structure nucléaires comme les lamines (Rao et al., 1996) sont des cibles des caspases au cours de l'apoptose. Le démantèlement du cytosquelette participe à la condensation cellulaire et nucléaire observée au cours de cette mort cellulaire.

Les protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN sont également clivées par les caspases, comme PARP (Poly ADP Ribose Polymerase) (Casciola-Rosen et al., 1995) ou les DNA-PK (Henkels and Turchi, 1997). Les caspases ont également pour cible la protéine ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase), un inhibiteur de la protéine CAD (Caspase Activated DNase). Le clivage de ICAD libère la protéine CAD, qui va participer à la fragmentation de l'ADN (Enari et al., 1998).

Globalement, la plupart des mécanismes cellulaires sont affectés au cours de l'apoptose, puisque les caspases ont pour cible des protéines kinases comme la PKC δ (Ghayur et al., 1996) ou les MAPK (Widmann et al., 1998), des facteurs de transcription comme NF κ B (Nuclear Factor Kappa B) (Ravi et al., 1998), ou encore des régulateurs du cycle cellulaire comme Rb (Tan et al., 1997) ou p21 (Donato and Perez, 1998).

2.2 Les protéines IAP : inhibiteurs des caspases

Les protéines de la famille des IAPs ont été identifiées pour la première fois chez un baculovirus (Crook et al., 1993). Chez les mammifères, il existe 8 membres (**Figure 24**) de la

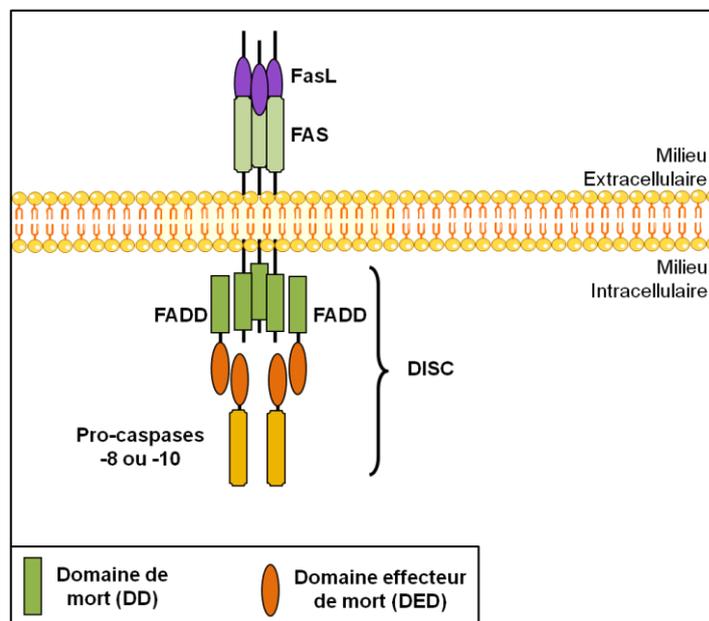


Figure 25 : Induction de la formation du complexe DISC par FasL.

La liaison de FasL sur le récepteur Fas induit sa trimérisation, ce qui entraîne le recrutement de la protéine FADD au niveau des domaines DD intracellulaires du récepteur Fas. Les Caspases-8 et -10 sont ensuite recrutées par FADD, formant le complexe activateur DISC. D'après (Micheau and Tschopp, 2003).

famille des IAPs (Deveraux and Reed, 1999), dont les plus décrits sont XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis), c-IAP1 et 2 et la survivine. Les membres de la famille des IAPs possèdent entre 1 et 3 domaines BIR (Baculovirus IAP Repeat), ainsi qu'un domaine RING (Really Interesting New Gene) présentant une activité E3 ubiquitine ligase pour certains d'entre eux (Takahashi et al., 1998; Hinds et al., 1999).

Les IAPs peuvent inhiber les caspases *via* différents mécanismes. En effet, les IAPs peuvent interagir avec les caspases, les empêchant ainsi d'être activées ou de cliver leurs substrats. Les IAPs peuvent également ubiquitinyler les caspases, entraînant leur dégradation par le protéasome. Par exemple, il a été montré que la protéine XIAP est un inhibiteur des caspases-3, -7 et -9. Son domaine BIR2 est impliqué dans son interaction avec les caspases -3 et -7 tandis que c'est le domaine BIR3 qui lui permet d'interagir avec la caspase-9 (Deveraux et al., 1999; Sun et al., 1999; Silke et al., 2001).

Au cours de l'apoptose, l'activité des IAPs est inhibée par différentes protéines mitochondriales libérées lors de ce processus comme par exemple Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/ Direct IAP-Binding protein with Low PI) qui vont interagir avec les IAPs, libérant les caspases et permettant ainsi la mort de la cellule (cf. 3.2 La voie intrinsèque de l'apoptose).

3 Les voies de signalisation de l'apoptose

3.1 La voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque de l'apoptose est induite suite à l'activation de récepteurs transmembranaires appartenant à la super-famille des TNF-R (Tumor Necrosis Factor Receptor), qui comprend une trentaine de membres (Li et al., 2013). Certains d'entre eux comme le TNF-R1, TRAIL-R ou Fas possèdent des domaines de mort DD (Death Domain) au niveau de leur région intracellulaire (Itoh and Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993; Nagata, 1997). Ces récepteurs forment la sous-famille des récepteurs à domaine de mort, ce sont eux qui induisent la voie extrinsèque de l'apoptose suite à la liaison des ligands de la famille TNF (Tumor Necrosis Factor). Les complexes ligands récepteurs les plus couramment décrits sont les complexes FasL/Fas, TNF α /TNF-R et TRAIL/TRAIL-R.

La liaison des ligands sur les récepteurs à domaine de mort induit leur activation et leur trimérisation (Banner et al., 1993). Suite à cette activation, les récepteurs vont recruter des protéines adaptatrices au niveau de leurs domaines DD intracellulaires comme TRADD (TNFR1-Associated death Domain protein), TRAF (TNFR-Associated Factor) ou FADD

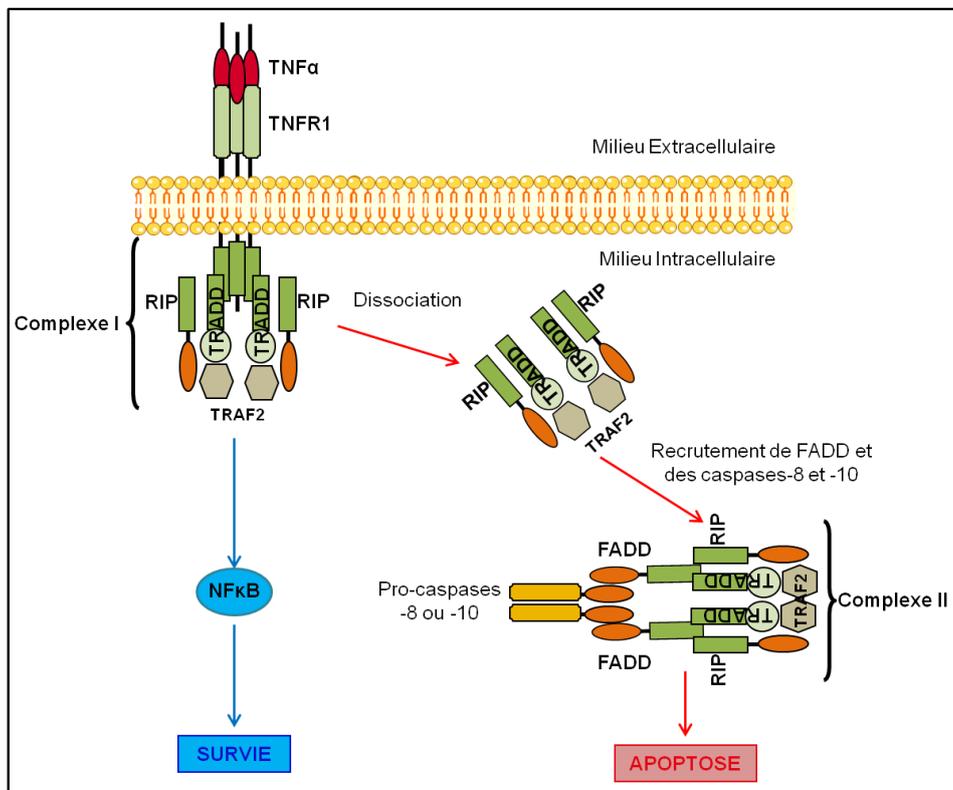


Figure 26 : Induction de la formation du complexe I et II par le TNF α .

Suite à l'activation du TNF-R1 par le TNF α , les protéines RIP, TRADD et TRAF2 s'associent pour former le Complexe I, qui induit la survie cellulaire. Ce complexe peut se dissocier du TNF-R1 et s'associer avec la protéine FADD. Il forme alors le complexe II qui permet l'activation des caspases-8 et -10 et l'induction de l'apoptose. D'après (Micheau and Tschopp, 2003).

(Fas-Associated Death Domain). Ces protéines participent à la formation de complexes d'activation des caspases comme le DISC ou le complexe II (Park et al., 2007). Nous détaillerons principalement les mécanismes d'action des récepteur Fas d'une part et TNFR1 d'autre part.

a) Le récepteur Fas et le complexe DISC

Le récepteur Fas a pour ligand FasL. La liaison de FasL sur le récepteur Fas induit sa trimérisation. La protéine FADD possède un domaine DD et un domaine DED. Son domaine DD interagit avec les domaines DD des récepteurs, permettant la formation d'un complexe d'activation des caspases-8 et -10, le DISC (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel et al., 1995). Les caspases -8 et -10 sont recrutées au sein du DISC *via* leurs propres domaines DED. Elles vont alors s'autoactiver, initier la cascade des caspases et entraîner la voie extrinsèque de l'apoptose (**Figure 25**) (Juo et al., 1998).

b) Le récepteur TNF-R1 et le Complexe II

Le récepteur TNF-R1 est activé par le TNF α , qui induit sa trimérisation. La protéine TRADD est alors recrutée *via* ses propres domaines DD au niveau des domaines DD du TNFR1 (Hsu et al., 1995). Elle interagit avec les protéines TRAF2 et RIP1 (receptor-interacting protein kinase 1), formant le Complexe I qui induit l'activation du facteur de transcription NF κ B et donc la survie cellulaire (**Figure 26**). Le complexe protéique formé par les protéines TRADD, TRAF2 et RIP1 peut se dissocier du domaine intracellulaire du TNF-R1. Ce complexe interagit avec la protéine FADD pour former le Complexe II, qui permet de recruter et d'activer les caspases initiatrices -8 et -10 (**Figure 26**), qui vont cliver et activer les caspases effectrices -3, -6 et -7, ce qui entraîne l'apoptose (Hsu et al., 1996; Micheau and Tschopp, 2003).

3.2 La voie intrinsèque de l'apoptose

La voie mitochondriale de l'apoptose peut être activée par un grand nombre de stimuli comme par exemple une privation de facteurs de croissance, un stress oxydant ou des dommages à l'ADN. Les dommages de l'ADN vont principalement induire l'activation de la protéine p53, un facteur de transcription régulant un grand nombre de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'apoptose et notamment les membres de la famille Bcl-2. Au cours de la voie intrinsèque, les membres de la famille Bcl-2 participent à la dissipation du potentiel

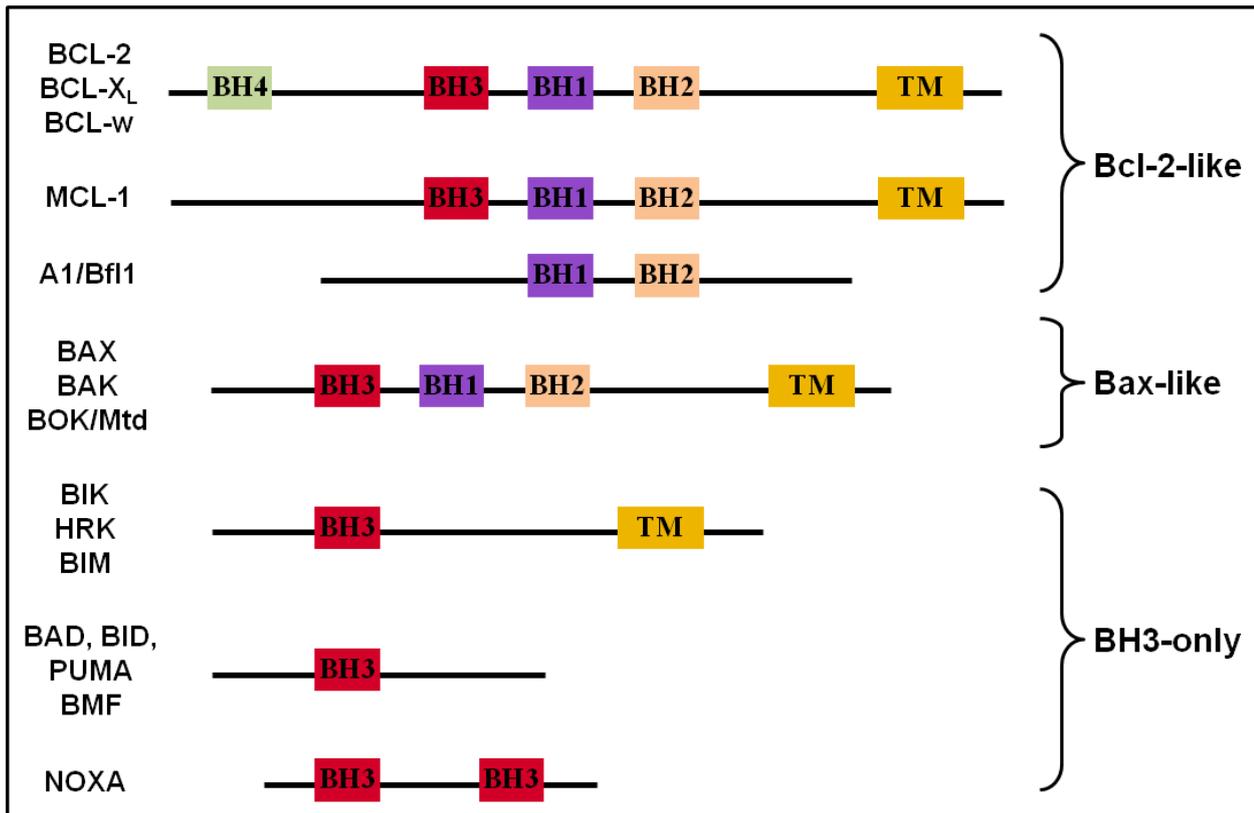


Figure 27 : Structure des membres de la famille Bcl-2.

Les membres de la famille Bcl-2 contiennent entre 1 et 4 domaines BH et sont divisés en trois sous-familles : les protéines anti-apoptotiques « Bcl-2 like », les protéines pro-apoptotiques « Bax-like » et les protéines pro-apoptotiques « BH3-only ». Certains membres de la famille Bcl-2 possèdent un domaine TM qui permet leur insertion dans les membranes cellulaires comme les membranes mitochondriales. D'après (Borner, 2003)

de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_m$) et à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. Cela conduit à la libération de protéines de l'espace inter-membranaire mitochondrial comme le cytochrome c, qui participe à la formation du complexe activateur de la caspase-9, l'apoptosome (Gupta et al., 2009; Estaquier et al., 2012).

a) *La famille Bcl-2*

La protéine Bcl-2 a été identifiée en 1984 (Tsujimoto et al., 1984). Quelques années plus tard, sa fonction anti-apoptotique a été mise en évidence (Zhong et al., 1993). Actuellement, une vingtaine de membres de la famille Bcl-2 a été identifiée. Les membres de la famille Bcl-2 possèdent des activités pro- ou anti-apoptotiques : la balance entre les différents membres de cette famille protéique régule l'apoptose. Les protéines de la famille Bcl-2 possèdent entre 1 et 4 domaines BH (Bcl-2 Homology) et sont répartis en 3 sous-familles (**Figure 27**) (Borner, 2003; Danial, 2007; Ola et al., 2011) :

- Les protéines anti-apoptotiques « Bcl-2 like » : elles possèdent entre 2 et 4 domaines BH et peuvent présenter un domaine TM (Transmembranaire) permettant l'insertion dans les membranes cellulaires.
- Les protéines pro-apoptotiques « Bax like » : elles possèdent entre 2 et 3 domaines BH, ainsi qu'un domaine TM.
- Les protéines pro-apoptotiques « BH3-only » : elles possèdent seulement le domaine BH3 et peuvent présenter un domaine TM.

La plupart des membres de la famille Bcl-2 peuvent interagir entre eux *via* leurs domaines BH, ce qui participe à la régulation de leurs activités. Un grand nombre de protéines appartenant à la famille Bcl-2 sont régulées transcriptionnellement par la protéine p53. Suite à un stress cellulaire, la protéine p53 induit la transcription des gènes cibles codant pour les protéines pro-apoptotiques Bax, PUMA, Noxa, Bak et Bid et réprime la transcription de gènes codant pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1. Les protéines de la famille Bcl-2 sont également activées ou réprimées suite à leurs interactions protéiques. Ainsi, Bax est inhibé lorsqu'il interagit avec Bcl-2.

Les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak jouent un rôle central dans la régulation de la voie mitochondriale de l'apoptose, elles sont nécessaires à son déroulement. En effet, chez des souris ou dans des cellules invalidées pour les gènes codant pour Bax et Bak ($Bax^{-/-}/Bak^{-/-}$), l'apoptose est totalement inhibée (Lindsten et al., 2000; Wei et al., 2001). Les protéines BH3-only comme PUMA et Noxa peuvent activer les membres pro-apoptotiques de la famille

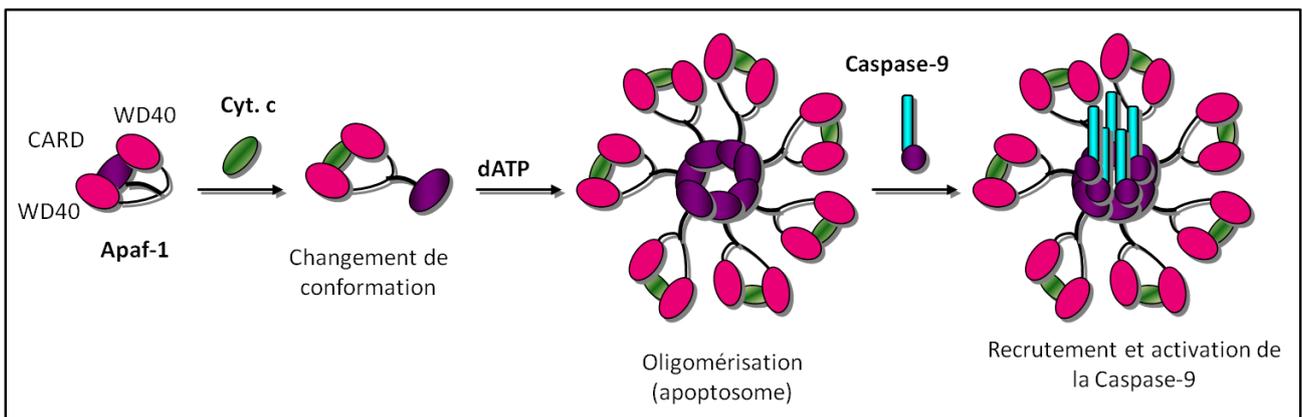


Figure 28 : Formation de l'apoptosome.

Le cytochrome c interagit avec Apaf-1, libérant le domaine CARD (en violet). Les protéines Apaf-1 forment alors un heptamère en interagissant entre elles *via* leurs domaines CARD. La caspase-9 est ensuite recrutée et activée au sein de l'apoptosome. D'après (Acehan et al., 2002).

Bcl-2 comme Bax soit en interagissant directement avec eux (Cartron et al., 2004; Kuwana et al., 2005), soit en inhibant les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. En effet, les protéines BH3-only peuvent interagir avec ces dernières (Chen et al., 2005), ce qui a pour effet de libérer la protéine Bax (Willis et al., 2007; Kim et al., 2009) qui va changer de conformation et être relocalisée et ancrée au niveau de la membrane externe mitochondriale (Wolter et al., 1997; Goping et al., 1998; Eskes et al., 2000). La protéine Bax va pouvoir former des oligomères Bax/Bax et Bax/Bak, induisant ainsi la formation de pores au niveau de la membrane externe mitochondriale. Les protéines Bax et Bak participent ainsi à la chute du $\Delta\psi_m$ et à la dépolarisation des membranes mitochondriales, entraînant la libération dans le cytosol de protéines de l'espace inter-membranaire mitochondrial qui vont participer à la voie mitochondriale de l'apoptose (Desagher et al., 1999; Annis et al., 2005).

Il est à noter que les membres de la famille Bcl-2 peuvent également réguler la voie extrinsèque de l'apoptose. En effet, la protéine BH3-only Bid peut être clivée par la caspase-8 suite à l'activation de la voie des récepteurs de mort. La forme clivée de Bid, tBid, va alors être transloquée au niveau de la mitochondrie où elle va interagir avec les différents membres de la famille Bcl-2 et induire le relargage du cytochrome c (Li et al., 1998; Luo et al., 1998).

b) Évènements mitochondriaux et formation de l'apoptosome

Au cours de l'apoptose, suite à l'activation des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, le potentiel de membranaire mitochondrial $\Delta\psi_m$ diminue, et on observe une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Vayssiere et al., 1994; Petit et al., 1995; Zamzami et al., 1995). Ces évènements sont considérés comme le point de non-retour de la voie mitochondriale de l'apoptose, puisqu'ils permettent la libération de protéines pro-apoptotiques de l'espace inter-membranaire mitochondrial dans le cytosol : SMAC/Diablo, AIF (Apoptosis Inducing Factor), Omi/HtrA2, EndoG (Endonuclease G) et cytochrome c (van Loo et al., 2002a; Saelens et al., 2004).

La protéine SMAC/Diablo, est un antagoniste de la protéine XIAP. Elle peut également interagir avec d'autres membres de la famille des IAP comme c-IAP1, c-IAP2 et la survivine *via* leur domaines BIR2 ou BIR3. L'interaction entre SMAC/Diablo et XIAP permet de libérer la pro-caspase-9 (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000), qui va ensuite être activée au sein de l'apoptosome en présence du cytochrome c.

Le cytochrome c est la première protéine de l'espace inter-membranaire mitochondrial à avoir été identifiée comme étant libérée dans le cytosol au cours de la voie mitochondriale de l'apoptose. Il est essentiel à son déroulement (Liu et al., 1996; Kluck et al., 1997). En effet, une fois dans le cytosol, le cytochrome c participe à la formation de l'apoptosome (**Figure 28**) en interagissant avec la protéine Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1). La protéine Apaf-1 possède un domaine CARD ainsi qu'un domaine WD40. En conditions physiologiques, le domaine CARD est masqué par le domaine WD40. Au cours de l'apoptose, le cytochrome c interagit avec le domaine WD40 en présence d'ATP (Hu et al., 1998), ce qui libère le domaine CARD et permet l'oligomérisation de la protéine Apaf-1, qui forme un heptamère : l'apoptosome (Li et al., 1997). La pro-caspase-9, libérée de son interaction avec XIAP est alors recrutée au centre de l'apoptosome *via* son propre domaine CARD. Elle va alors s'auto-activer, cliver les caspases effectrices-3, -6 et -7, entraînant l'apoptose (Zou et al., 1997; Acehan et al., 2002).

La protéine Omi/HtrA2 est une sérine protéase de l'espace intermembranaire mitochondrial qui est également libérée dans le cytosol au cours de l'apoptose. Cette protéine peut participer à la voie mitochondriale de l'apoptose dépendante des caspases en interagissant avec la protéine XIAP, tout comme SMAC/Diablo. Omi/HtrA2 interagit avec XIAP *via* les domaines BIR2 et BIR3 de cette dernière. Cette interaction inhibe de façon réversible l'activité de XIAP. Omi/HtrA2 peut également inhiber l'activité de XIAP de façon irréversible. En effet, il a été montré que Omi/HtrA2 peut cliver XIAP (Yang et al., 2003). Enfin, il a été montré que Omi/HtrA2 peut également induire une voie de mort cellulaire indépendante des caspases grâce à son activité sérine protéase (Suzuki et al., 2001; Hegde et al., 2002; Martins et al., 2002; van Loo et al., 2002b).

L'endonucléase G est impliquée dans la réplication de l'ADN mitochondrial (van Loo et al., 2001). Au cours de l'apoptose, elle est libérée dans le cytosol puis adressée au noyau. Là, elle participe avec la protéine CAD à la fragmentation de l'ADN, qui constitue une des étapes tardives de l'apoptose (Cote and Ruiz-Carrillo, 1993).

VI. Projet de recherche

Le FGF1 est un facteur de croissance qui régule différentes fonctions biologiques comme la prolifération, la différenciation ou la survie cellulaires, mais qui peut également induire la tumorigenèse et conférer une résistance aux chimiothérapies.

Ces activités peuvent être médiées par deux types de voies de signalisation : la voie extracellulaire, qui passe par l'activation des récepteurs membranaires FGFRs, et la voie intracellulaire, qui est initiée en absence de sécrétion du FGF1 (cf. paragraphe II-4.2). Toutefois, la voie intracellulaire est la voie préférentiellement activée, la sécrétion du FGF1 étant un événement marginal observable uniquement dans certaines conditions de stress cellulaire. De plus, le FGF1 contient à son extrémité N-terminale une séquence NLS et est localisé dans les compartiments cytoplasmique et nucléaire. Le FGF1 est donc un facteur de croissance atypique, principalement intracellulaire et nucléaire. Différents laboratoires, dont le nôtre, ont entrepris l'étude de la voie d'action intracellulaire et nucléaire du FGF1 et de son rôle sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose.

1 Travaux précédemment menés dans l'équipe

Notre équipe étudie depuis plusieurs années les mécanismes cellulaires impliqués dans l'activité anti-apoptotique du FGF1 intracellulaire. L'équipe a ainsi pu montrer que dans les cellules RetsAFs ou les cellules PC12, le FGF1 intracellulaire induit la survie des cellules en absence de sérum ou bien suite à l'induction de l'apoptose dépendante de p53 (Renaud et al., 1996; Bouleau et al., 2005; Rodriguez-Enfedaque et al., 2009). L'équipe a notamment montré que le FGF1 régule la stabilité et les activités de facteur de transcription de la protéine p53 au cours de la voie intrinsèque de l'apoptose (Bouleau et al., 2005; Bouleau et al., 2007; Rodriguez-Enfedaque et al., 2009).

Dans les cellules REtsAFs, la protéine p53 réprime l'expression du gène *fgf1*, qui est un nouveau gène cible réprimé par cet oncosuppresseur. A l'inverse, la surexpression du FGF1 inhibe les activités pro-apoptotique et anti-proliférative de la protéine p53 (**Figure 29**). Le FGF1 intracellulaire induit l'accumulation de MDM2 ce qui accélère la dégradation de la protéine p53. Par ailleurs, la protéine FGF1 diminue la stabilité et régule certaines activités trans-activatrices de p53 comme par exemple vis-à-vis du gène *bax* qui code pour une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (Bouleau et al., 2005). L'activité anti-apoptotique du FGF1 dans les cellules REtsAFs passe donc par une régulation du niveau et de la stabilité

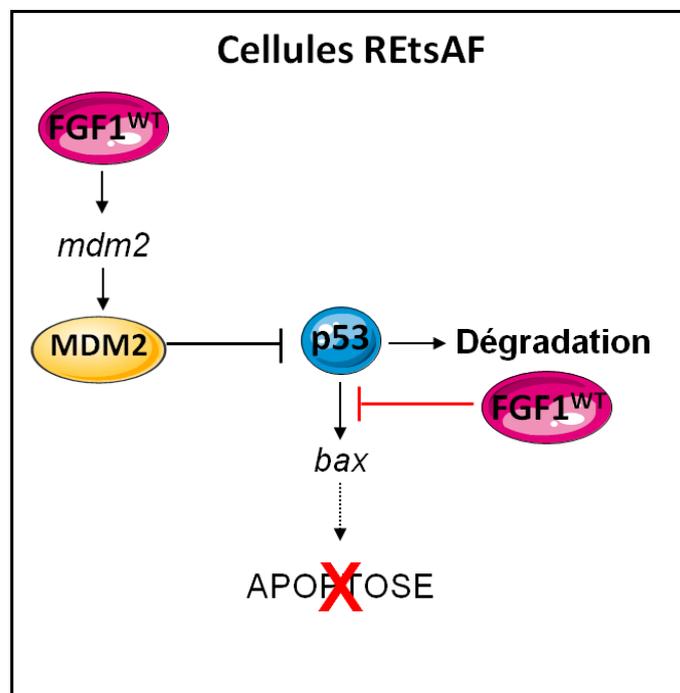


Figure 29 : Le FGF1 intracellulaire a une activité anti-apoptotique dans les cellules REtsAF.

Dans les cellules REtsAF, le FGF1 induit l'expression de MDM2, ce qui permet de réguler le niveau et la stabilité de p53. De plus, le FGF1 inhibe l'activité transcriptionnelle de p53, ce qui bloque l'apoptose. D'après (Bouleau et al., 2005).

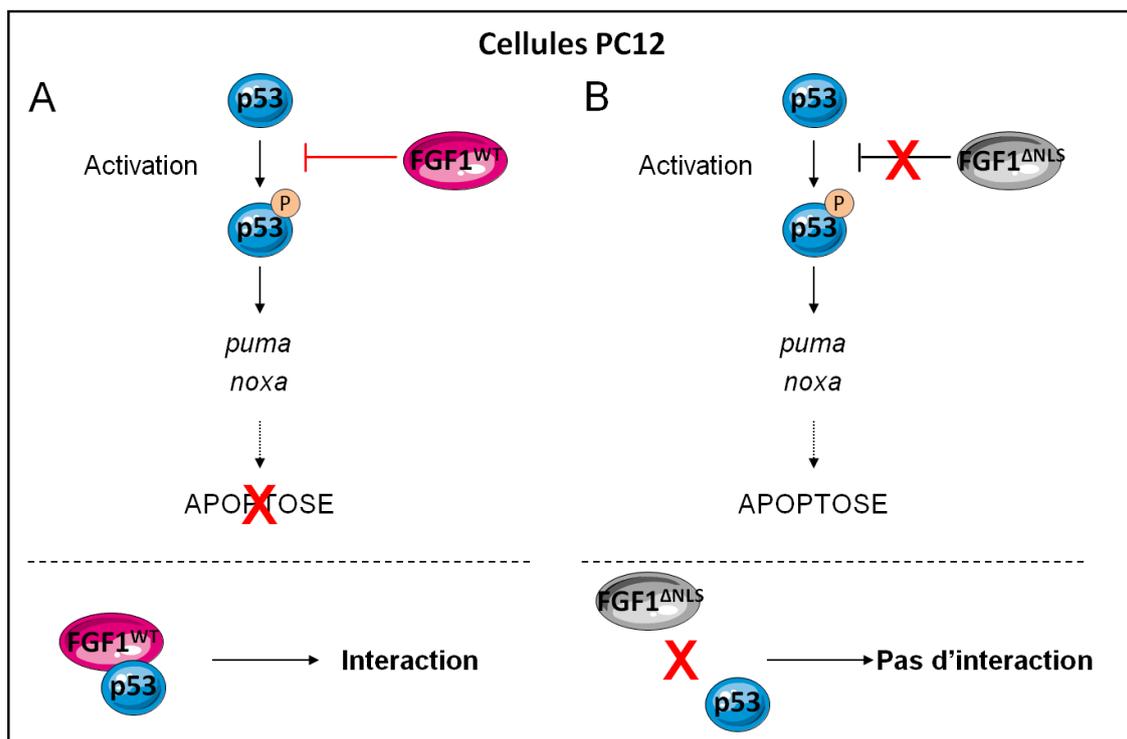


Figure 30 : La localisation nucléaire du FGF1 est nécessaire à son activité anti-apoptotique dans les cellules PC12.

(A) Dans les cellules PC12, le FGF1 inhibe l'activation de p53 et la transactivation de ses gènes cibles *puma* et *noxa*. De plus, le FGF1 interagit avec la protéine p53. (B) La localisation nucléaire du FGF1 est indispensable à son activité anti-apoptotique et à son interaction avec p53. D'après (Rodriguez-Enfedaque et al., 2009).

de p53 d'une part et par une régulation de son activité transcriptionnelle d'autre part.

Dans les cellules PC12, le FGF1 intracellulaire présente à la fois une activité neurotrophique et une activité anti-apoptotique. En effet, la surexpression du FGF1 induit la différenciation des cellules PC12 en neurones de type sympathique. Le FGF1 intracellulaire présente également une activité anti-apoptotique : en présence de FGF1, on observe une diminution de l'activation de p53 (phosphorylation, trans-activation de *PUMA*) suite à un traitement à l'étoposide. Cette inhibition aboutit à une forte réduction de l'activité des caspases et à une diminution de l'apoptose dépendante de p53 en amont des événements mitochondriaux et nucléaires (**Figure 30A**) (Bouleau et al., 2007; Rodriguez-Enfedaque et al., 2009). Dans ces cellules, la translocation nucléaire du FGF1 est nécessaire à la fois pour son activité neurotrophique et son activité anti-apoptotique. En effet, la forme mutante FGF1^{ΔNLS} déléetée de la séquence de nucléarisation, ne permet ni la différenciation neuronale des cellules PC12 ni leur survie suite à l'induction de l'apoptose par p53 (**Figure 30B**).

De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois la présence d'une interaction entre la protéine p53 et le facteur FGF1 par immuno-précipitation (Rodriguez-Enfedaque et al., 2009). Contrairement au FGF1 sauvage, le FGF1^{ΔNLS} n'est pas co-précipité avec p53. Cette interaction FGF1/p53 pourrait être impliquée dans la régulation des activités transcriptionnelles de p53. Nos résultats suggèrent donc l'existence de nouveaux mécanismes de régulation de la protéine p53 par le FGF1. Dans les cellules PC12, le FGF1 exerce son activité anti-apoptotique en inhibant l'activation de p53, inhibition qui pourrait être médiée par l'interaction entre p53 et le FGF1.

2 Projet de thèse

Les travaux antérieurs de l'équipe ont montré que le FGF1 intracellulaire présente une activité anti-apoptotique dans deux types cellulaires différents, et que la localisation nucléaire du FGF1 est indispensable à cette activité. Toutefois, les mécanismes d'action intracellulaires et nucléaires du FGF1 restent à ce jour peu décrits.

Mon projet de thèse a donc eu pour but de mieux comprendre ces mécanismes d'actions. Pour cela, j'ai utilisé différentes formes mutantes du FGF1 : FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D}. Les activités extracellulaires de la forme mutante FGF1^{K132E} ont été étudiées par différentes équipes. Cette forme mutante présente la même capacité de liaison aux FGFRs que le FGF1^{WT}. En réponse au FGF1^{K132E}, les FGFRs sont activés et induisent la cascade des

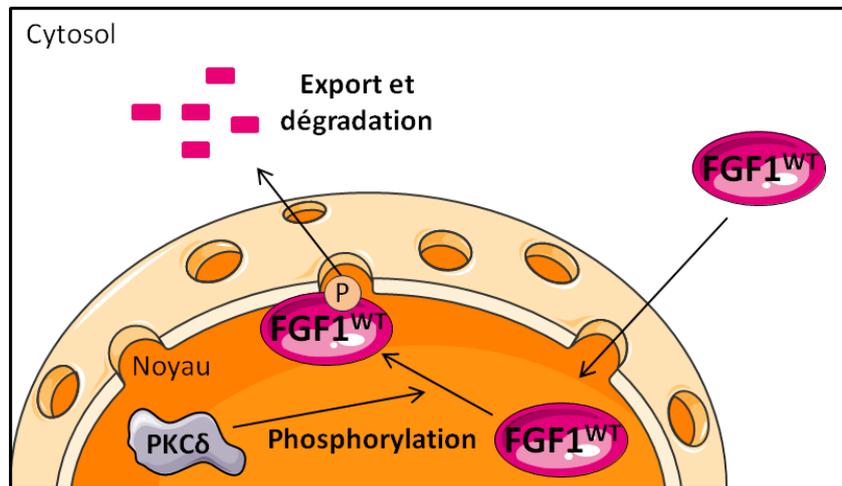


Figure 31 : Le FGF1 est phosphorylé par la PKCδ.

La phosphorylation du FGF1 sur son résidu Sérine 130 par la PKCδ induit son export nucléaire et sa dégradation dans le cytosol. D'après (Wiedlocha et al., 2005).

MAPK (Renaud et al., 1996; Klingenberg et al., 1998). Cette forme mutante est également capable d'être internalisée et transloquée dans le noyau (Klingenberg et al., 1998). En revanche, le FGF1^{K132E} présente une activité mitogénique fortement réduite (Burgess et al., 1990), n'a pas d'activité neurotrophique dans les cellules PC12 (Renaud et al., 1996) et n'interagit pas avec la protéine FIBP, contrairement au FGF1^{WT} (Kolpakova et al., 1998).

Au cours de ma thèse, j'ai poursuivi l'étude auparavant entreprise par l'équipe des activités intracellulaires du FGF1^{K132E} dans les cellules PC12. Sachant que la lysine 132 est à proximité de la sérine 130, la mutation de cette lysine pourrait modifier la phosphorylation du FGF1 et donc ses activités intracellulaires.

Pour rappel, il a été montré que le FGF1 peut être phosphorylé par la PKC δ sur son résidu Sérine en position 130. Cette phosphorylation a lieu dans le compartiment nucléaire et induirait l'export du FGF1 du noyau vers le cytoplasme où il serait dégradé (**Figure 31**) (Wiedlocha et al., 2005). Les activités extracellulaires de ces deux formes mutantes du FGF1 ont précédemment été étudiées. Il a été montré que ces formes mutantes présentent la même capacité que le FGF1^{WT} à induire la cascade des MAPK ou à être transloquées au sein du compartiment nucléaire. En revanche, elles présentent une activité mitogénique réduite par rapport au FGF1^{WT} (Klingenberg et al., 1999).

J'ai donc également entrepris d'étudier les activités intracellulaires de formes mutantes du FGF1 : le FGF1^{S130A}, non phosphorylable, et le FGF1^{S130D}, dont la phosphorylation est mimée par la substitution de la sérine 130 par un acide glutamique.

Résultats

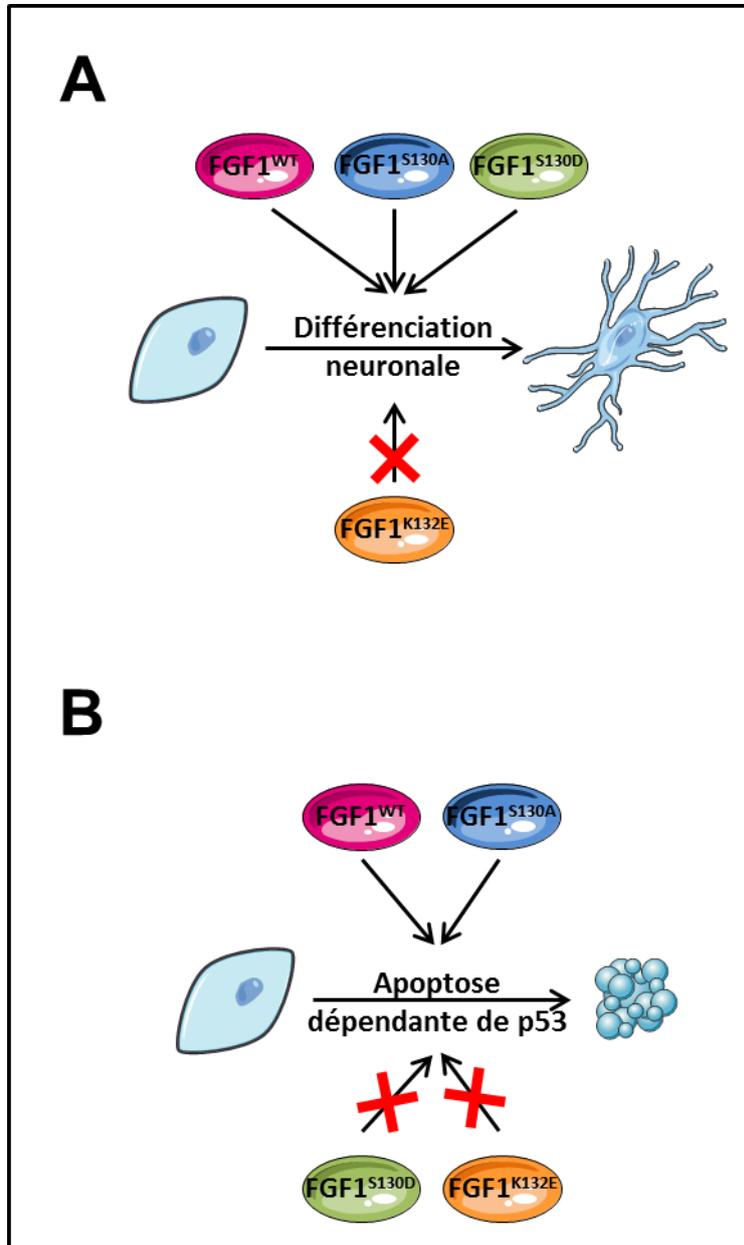


Figure 32: Activités intracellulaires des différentes formes de FGF1.

(A) Le FGF1^{WT} intracellulaire induit la différenciation neuronale des cellules PC12. Seule la mutation K132E inhibe cette activité. (B) L'ajout d'étoposide dans les cellules PC12 induit la voie mitochondriale de l'apoptose initiée par p53. Les FGF1^{WT} et FGF1^{S130A} ont une activité anti-apoptotique dans les cellules PC12, contrairement aux FGF1^{S130D} et FGF1^{K132E} qui ne présentent pas d'activité anti-apoptotique.

I. Caractérisation des activités neurotrophique et anti-apoptotique intracellulaires du FGF1 dans les cellules PC12.

Afin de caractériser les activités intracellulaires du FGF1 dans les cellules PC12, et notamment ses activités neurotrophique et anti-apoptotique, nous avons utilisé différentes formes mutantes du FGF1. Nous avons choisi d'étudier la forme mutante FGF1^{K132E}. Des études menées sur les activités **extracellulaires** de cette forme mutante ont montré que ses activités neurotrophique et mitogénique sont fortement réduites par rapport au FGF1^{WT}. Nous avons donc cherché à déterminer si cette mutation affecte également les activités **intracellulaires** du FGF1. La mutation du résidu lysine 132 pourrait affecter la phosphorylation du résidu sérine 130 du FGF1. Nous avons donc également étudié les activités intracellulaires de deux autres formes mutantes du FGF1 : le FGF1^{S130A}, dont la phosphorylation est inhibée, et le FGF1^{S130D} dont la phosphorylation est mimée. Tous les résidus mutés sont situés dans le domaine C-terminal du FGF1.

Nous avons tout d'abord généré des vecteurs permettant l'expression de ces différentes formes mutantes du FGF1 par mutagenèse dirigée. Nous avons ensuite transfecté les cellules PC12 de façon stable avec ces vecteurs d'expression possédant un promoteur inductible à la dexaméthasone et codant soit pour la forme sauvage du FGF1 soit pour les formes mutantes FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D}.

Nous avons sélectionné des clones cellulaires exprimant des niveaux comparables de FGF1 pour chaque forme étudiée. L'étude précédemment menée par l'équipe ayant montré que la localisation nucléaire du FGF1 est nécessaire à ses activités intracellulaires (Rodriguez-Enfedaque et al., 2009), nous avons ensuite vérifié la localisation cellulaire de ces différentes formes de FGF1. Toutes les formes de FGF1 étudiées sont, comme le FGF1^{WT}, localisées à la fois dans le cytosol et le noyau.

Nous avons ensuite étudié l'activité neurotrophique des différentes formes de FGF1. Pour cela, des populations polyclonales de cellules PC12 transfectées ont été traitées avec de la dexaméthasone pendant 12 jours, afin d'induire l'expression des différentes formes de FGF1. Nous avons ensuite compté le nombre de clones présentant des extensions neuritiques longues et ramifiées, marqueur morphologique de la différenciation neuronale de ces cellules. Nous avons ainsi pu montrer que les formes FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D} induisent bien la

différenciation neuronale des cellules PC12. La forme FGF1^{K132E} ne présente quant à elle aucune activité neurotrophique puisqu'elle n'induit pas la différenciation neuronale des cellules PC12 et ne les protège pas de la mort induite par l'absence de sérum (**Figure 32A**).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'activité anti-apoptotique des différentes formes de FGF1 dans les cellules PC12 suite à l'activation de l'apoptose induite par p53. Les lignées stables obtenues après transfection des cellules PC12 ont été traitées pendant 48h avec de la dexaméthasone afin d'induire l'expression des différentes formes de FGF1, puis avec de l'étoposide pendant 40h afin d'induire l'apoptose dépendante de p53. La survie cellulaire a été analysée par un marquage des noyaux des cellules viables avec du violet cristal. Nos résultats montrent que la forme mutante FGF1^{S130A} a une activité anti-apoptotique dans les cellules PC12, tout comme le FGF1 sauvage. En revanche, ni le FGF1^{S130D} ni le FGF1^{K132E} ne permettent la survie des cellules PC12 suite à l'ajout d'étoposide. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de la phosphorylation activatrice de p53 (sur la sérine 15), la transactivation de la protéine pro-apoptotique PUMA par p53 et de l'activation de la caspase-3 par western blot. Dans les cellules exprimant les différentes formes anti-apoptotiques de FGF1 (FGF1^{WT} et FGF1^{S130A}), on observe une diminution de la phosphorylation activatrice de p53 sur son résidu sérine 15, du niveau de PUMA et du clivage de la caspase-3, ce qui est corrélé avec l'inhibition de l'apoptose observée (**Figure 32B**). Dans les cellules exprimant les formes FGF1^{K132E} et FGF1^{S130D}, la diminution de ces différents marqueurs de l'apoptose est moins importante, ce qui explique la faible survie cellulaire observée.

Nos résultats ont donc permis de montrer que la localisation nucléaire du FGF1 est nécessaire mais insuffisante à ses activités intracellulaires. De plus, nous avons pu montrer que la phosphorylation du FGF1 est importante pour son activité anti-apoptotique mais n'influence pas son activité neurotrophique. Enfin, l'étude de ces trois formes mutantes du FGF1 montre que son domaine C-terminal est important pour la régulation de ses activités neurotrophique et anti-apoptotique intracellulaires.

Ces résultats ont permis la rédaction de l'article présenté ci-après :

« **The C-terminal domain of FGF1 regulates both its neurotrophic and anti-apoptotic activities.** » Elisabeth Delmas, Nadège Jah, Caroline Pirou, Jean-Luc Vayssière, Bernard Mignotte and Flore Renaud.

FGF1 C-terminal domain and phosphorylation regulate intracrine FGF1 signaling for its neurotrophic and anti-apoptotic activities.

Elisabeth Delmas, Nadège Jah, Caroline Pirou, Sylvina Bouleau, Nathalie Le Floch, Jean-Luc Vayssière, Bernard Mignotte and Flore Renaud*

Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589 Université de Versailles St Quentin en Yvelines, Ecole Pratique des Hautes Etudes, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, 2 avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny-Le-Bretonneux, France

*Corresponding author: flore.renaud@uvsq.fr

Abstract

FGF1 is a prototypic member of the Fibroblast Growth Factors family overexpressed in various tumors. Contrarily to most FGFs, FGF1 lacks a secretion peptide signal and acts mainly in an intracellular and nuclear manner. Intracellular FGF1 induces cell proliferation, differentiation and survival. We previously showed that intracellular FGF1 induces neuronal differentiation and inhibits both p53- and serum-free-medium-induced apoptosis in PC12 cells. FGF1 nuclear localization is required for these intracellular activities, suggesting that FGF1 regulates p53-dependent apoptosis and neuronal differentiation by new nuclear pathways.

To better characterize intracellular FGF1 pathways, we studied the effect of three mutations localized in the C-terminal domain of FGF1 (*i.e.* FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D}) on FGF1 neurotrophic and anti-apoptotic activities in PC12 cells. The change of the serine 130 in alanine precludes FGF1 phosphorylation, its mutation in aspartic acid mimics phosphorylation. These FGF1 mutants kept both a nuclear and cytosolic localization in PC12 cells.

Our study highlights for the first time the role of FGF1 phosphorylation and the implication of FGF1 C-terminal domain on its intracellular activities. Indeed, we show that the K132E mutation inhibits both the neurotrophic and anti-apoptotic activities of FGF1, suggesting a regulatory activity for FGF1 C-terminus. Furthermore, we observed that both FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} mutant forms induced PC12 cells neuronal differentiation. Therefore, FGF1 phosphorylation does not regulate FGF1-induced differentiation of PC12 cells. Then, we showed that only FGF1^{S130A} protects PC12 cells against p53-dependent apoptosis, thus phosphorylation appears to inhibit FGF1 anti-apoptotic activity in PC12 cells. Altogether, our results show that phosphorylation does not regulate FGF1 neurotrophic activity but inhibits its anti-apoptotic activity after p53-dependent apoptosis induction, giving new insight into the poorly described FGF1 intracrine/nuclear pathway.

INTRODUCTION

The Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1) is one of the prototypic members of the FGF family that contain 22 members¹. Most FGFs are secreted and mediate their activity by binding to and activating membrane FGF receptors (FGFR1-4), which induce Ras/MAP Kinases, PI3K/AKT and PLC γ pathways^{2,3}. However, the fate of all FGF members is not always to be secreted. In particular, FGF1, FGF2, one isoform of FGF3 and FGF11-14, which do not contain any secretion peptide signal, are not secreted in physiological conditions and mediate their activity by intracrine pathways. Furthermore, most of these intracrine factors contain one or more nuclear localization sequences (NLS), which regulate their nuclear translocation, a process required for their activities⁴⁻⁷. For example, FGF1 lacks a secretion peptide signal but contains a nuclear localization sequence (KKPK) and acts mainly in an intracellular and nuclear manner^{4,8}. Intracellular FGF1 is a neurotrophic factor for various neuronal cells both *in vitro* and *in vivo*⁹⁻¹³. It also activates DNA synthesis,^{4,14,15} exerts an anti-apoptotic activity,^{11,16,17} and its overexpression correlates with tumor development and chemotherapy resistance¹⁸⁻²⁰.

We have previously shown that intracellular FGF1 inhibits p53-dependent apoptosis by an intracrine pathway in both fibroblasts (REtsAF cells) and neuronal-like cells (PC12 cells)^{16,17}. In REtsAF cells, we have shown that *fgf1* is a repressed target gene of p53 and that overexpression of FGF1 decreased both the pro-apoptotic and the anti-proliferative activities of this oncosuppressor. In these cells, intracellular FGF1 mediates its activities by two mechanisms of action: (i) FGF1 increased MDM2 expression which leads to p53-degradation; (ii) FGF1 regulated some p53 transcriptional activities. In particular, FGF1 decreases p53-dependent transactivation of *bax*, which encodes a pro-apoptotic Bcl-2 family member required for p53-dependent apoptosis in REtsAF cells¹⁶.

FGF1 is highly expressed in central and peripheral nervous systems and its neurotrophic and anti-apoptotic activities *in vitro* and *in vivo* are well documented^{11,13,21-24}. However, the mechanisms of action of FGF1 for these activities remain to be characterized. In order to document this point, we have then pursued our study in neuronal-like PC12 cells. We showed that FGF1 inhibits both p53-dependent and serum free-medium-induced apoptosis and exerts its neurotrophic activity by an intracrine pathway in PC12 cells. Using the FGF1 ^{Δ NLS} mutant deleted of the FGF1 nuclear localization sequence (KKPK), we showed that the FGF1 nuclear translocation is required for both its anti-apoptotic and its neurotrophic activities. Intracellular FGF1 regulates p53 dependent apoptosis by decreasing p53 phosphorylation on serine 15, which is a marker of its activation, p53-dependent transactivation of *puma*, which encodes a pro-apoptotic Bcl-2 family member required for p53-dependent cell death in PC12 cells, and caspase-3 activation. All these effects of FGF1 cooperate to protect PC12 cells from p53-dependent apoptosis. The FGF1 ^{Δ NLS} mutant, which only presents a cytosolic localization, has no effect on p53-dependent apoptosis in PC12 cells. Altogether, these data suggest that FGF1 regulates p53-dependent apoptosis and neuronal differentiation by new intracrine/nuclear pathways¹⁷.

The aim of the present paper is to progress in the characterization of these nuclear pathways. For this purpose, the activity of new mutated forms of FGF1 in PC12 cells was examined. We studied the effect of three mutations located in the C-terminal domain of FGF1 (*i.e.* FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D}) on its intracellular neurotrophic and anti-apoptotic activities.

Previous studies used recombinant FGF1^{K132E} and showed that it could bind FGF receptors, induced the MAPK kinase pathway but it induced neither cell proliferation nor neuronal differentiation^{11,15,25}. However, the activity of the intracellular FGF1^{K132E} is unknown.

We also studied two other mutants of the C-terminal domain of FGF1. Mutation of the serine 130 in alanine or aspartic acid was performed to examine the role of FGF1 phosphorylation on FGF1 intracrine activities. Indeed, FGF1 was shown to be phosphorylated on serine 130 by the PKC δ in the nuclear compartment^{26,27}. The mutation of this serine in alanine abolishes FGF1 phosphorylation. On the contrary, its mutation in aspartic acid mimics FGF1 phosphorylation. Both mutant recombinant FGF1s could bind FGF receptors, be internalized in cells and translocated in the nucleus but they presented a reduced mitogenic activity²⁸. In the present study, PC12 cells were stably transfected by dexamethasone-inducible expression vectors encoding FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} to examine the intracellular activities of these different FGF1 mutants. We showed that all these FGF1 mutants display a nuclear and cytosolic localization. However, their activities differed. The K132E mutation inhibited both neurotrophic and anti-apoptotic activities of FGF1, suggesting that nuclear events required for FGF1 activities are inhibited by this mutation. Both FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} mutants could induce PC12 cells neuronal differentiation, suggesting that FGF1 phosphorylation does not regulate FGF1 differentiation activity. By contrast, only FGF1^{S130A} still protects PC12 cells from p53-dependent apoptosis, suggesting that FGF1 phosphorylation inhibits the FGF1 anti-apoptotic activity. Altogether our study shows that the FGF1 C-terminal domain is involved in the regulation of both its neurotrophic and its anti-apoptotic activity and that FGF1 phosphorylation regulates its anti-apoptotic activity while it does not interfere with its neuronal differentiation activity.

RESULTS

FGF1^{K132E} expression and subcellular localization

To progress in the characterization of the intracellular FGF1 pathway, we first examined the cell fate and activity of the FGF1^{K132E} mutant in PC12 cells. We stably transfected PC12 cells with dexamethasone-inducible expression vectors encoding either wild-type (FGF1^{WT}) or mutant (FGF1^{K132E}) FGF1 (Figure 1a). PC12 cells transfected by the empty vector served as a control (Neo).

Stable Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines were cultured in the absence or presence of dexamethasone for 48h to induce FGF1 expression. FGF1 protein levels were analyzed by western blot (Figure 1b). The level of endogenous rat FGF1 was undetectable by western blot without heparin sepharose purification in control cells. On the opposite,

dexamethasone treatment significantly increased FGF1 expression in FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines. It can be noticed that FGF1 is detectable in both cell lines in the absence of dexamethasone, suggesting that the MMTV-LTR promoter is leaky in the absence of glucocorticoid addition. However, a threefold increase of FGF1 levels was detected in FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cells lines after dexamethasone treatment.

We previously showed that FGF1 nuclear localization is required for its intracellular activities in PC12 cells¹⁷. To study FGF1^{K132E} subcellular localization, cytosolic and nuclear protein extracts from FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines were analyzed by western blot (Figure 1c). Enolase and Lamin A/C were used as purity controls for cytosolic and nuclear fractions, respectively. Both proteins were mainly detected in their respective fraction. In transfected PC12 cells, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} were both detected in cytosolic and nuclear fractions suggesting that FGF1^{K132E} can be translocated to the nucleus, similarly as FGF1^{WT}.

The K132E mutation inhibits FGF1 neurotrophic activity.

FGF1, which is widely expressed in the central and peripheral nervous system, is involved in both neuronal differentiation and survival of a large range of neurons²¹. *In vitro*, intracellular FGF1 induced neuronal differentiation in PC12 and SH-SY5Y cells and protected both cell lines against apoptosis induced by serum depletion^{11,13,17}. Only extracellular FGF1^{K132E} had previously been tested on PC12 cells. Indeed, recombinant FGF1^{K132E} (added to the culture medium) had been shown to bind and activate FGF receptors but it failed to induce neuronal differentiation of PC12 cells¹¹. Thus, we decided to study the intracellular activity of FGF1^{K132E} in PC12 cells.

We first tested if the K132E mutation could modify the intracellular FGF1 neurotrophic activity. PC12 cell lines (Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E}) were cultured for seven days in the absence or presence of dexamethasone to induce FGF1 expression. Cell morphology was then observed by phase contrast microscopy (Figure 2a). In the absence of dexamethasone, PC12 cells (Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E}) presented an undifferentiated phenotype. In the presence of dexamethasone, only FGF1^{WT} PC12 cells presented long and ramified neuritis, which is characteristic of PC12 cells neuronal differentiation. We also analyzed the neurofilament NF-160 kDa expression by immunocytochemistry (Figure 2b). After dexamethasone treatment, this neuronal marker could only be detected in FGF1^{WT} PC12 cells. To quantify the neurotrophic activity of both FGF1 forms, the percentage of differentiated clones was determined in a large population of transfected PC12 clones in the presence of dexamethasone (Figure 2c). For each expression vector, 4 independent transfections were performed and the morphology of at least 100 G418-resistant transfected PC12 clones was analyzed. After 10 days of dexamethasone treatment, up to 40% of the FGF1^{WT} transfected PC12 clones presented a differentiated phenotype. However, only 4-5% of FGF1^{K132E} or Neo transfected PC12 clones presented a differentiated phenotype in these conditions. Thus, in contrast to FGF1^{WT}, intracellular FGF1^{K132E} does not induce PC12 cells differentiation.

To determine if the K132E mutation inhibits all aspects of FGF1 neurotrophic activity, cell survival in the absence of serum was examined in transfected PC12 cell lines (Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E}). These cell lines were cultured in serum-free medium containing dexamethasone during eleven days (Figure 2d). Cell survival was quantified after crystal violet nuclei staining. Only FGF1^{WT} protected PC12 cells from serum-depletion-induced apoptosis. Most of FGF1^{K132E} PC12 cells died in the absence of serum, at a similar level to Neo PC12 cells. Thus, the K132E mutation inhibits the neurotrophic activity of intracellular FGF1 in PC12 cells.

K132E mutation inhibits FGF1 anti-apoptotic activity in p53-dependent cell death.

We have previously shown that intracellular FGF1 protects PC12 cells from p53-dependent apoptosis¹⁷. In this study, we tested the anti-apoptotic activity of the FGF1^{K132E} mutant in this cell death process. After two days of dexamethasone treatment, PC12 cell lines (Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E}) were treated with 50 µg/ml etoposide to induce p53-dependent apoptosis. Cell survival after 40h of etoposide treatment was quantified after crystal violet nuclei staining (Figure 3a). The percentages of cell survival for Neo and FGF1^{K132E} PC12 cells were of 31 and 33%, respectively, which is not significantly different. By contrast, FGF1^{WT} PC12 survival appeared to be significantly higher (64%) than FGF1^{K132E} and Neo PC12 survival.

We then analyzed different markers of p53-dependent apoptosis by western blot (Figure 3b). We examined the levels of serine 15-phosphorylated p53 (a marker of p53 activation), the levels of PUMA (a pro-apoptotic BH3-only protein encoded by a p53-transcriptional-target gene) and the cleavage of caspase-3 (*i.e.* the activation of this caspase). After two days of dexamethasone treatment, PC12 cell lines (Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E}) were treated with etoposide during 0, 8 and 16 hours. Etoposide addition induced an increase in P-p53 (Ser15), PUMA and cleaved caspase-3 levels in all the cell lines. However, all three protein levels appeared lower in FGF1^{WT} PC12 cells compared to Neo and FGF1^{K132E} PC12 cells. We also analyzed the levels of *nox*a and *p21* mRNA (encoded by two other p53-target genes) by RT-PCR (Figure 3c). The addition of etoposide induced an increase in *nox*a and *p21* mRNA levels in all the cell lines. However, this increase was lower in FGF1^{WT} PC12 cells compared to Neo and FGF1^{K132E} PC12 cells.

These different experiments clearly show that, in contrast to FGF1^{K132E}, FGF1^{WT} protects PC12 cells from p53-dependent apoptosis. In the presence of etoposide, FGF1^{WT} decreased p53 activation, p53-dependent trans-activation of pro-apoptotic genes (*PUMA* and *nox*a) and caspase activation, which resulted in a decrease in cell death. The K132E mutation of FGF1 decreased all of these effects.

Altogether, our study of the FGF1^{K132E} mutant in PC12 cells showed that the K132E mutation of FGF1 inhibits both its neurotrophic and anti-apoptotic activities. However it does not inhibit its nuclear translocation. Thus, the K132 mutation probably inhibits a nuclear event (post-translational modification, protein interaction and/or DNA interaction) required for nuclear FGF1 activities that remains to be determined.

FGF1 phosphorylation does not modify its subcellular localization in PC12 cells.

FGF1 can be phosphorylated on serine 130 by PKC δ in the nucleus^{15,27}. Due to its proximity with this phosphorylation site, the mutation event of FGF1^{K132E} could affect this event. To determine if FGF1 phosphorylation is involved in the regulation of FGF1 intracellular activities, we generated two dexamethasone-inducible expression vectors by site-directed mutagenesis. Each allows the expression of an FGF1 phosphorylation mutant form (FGF1^{S130A} or FGF1^{S130D}) in PC12 cells (Figure 4a). The S130A mutation prevents FGF1 phosphorylation while the S130D mutation mimics constitutive phosphorylation. PC12 cells were stably transfected with these different vectors.

First, FGF1 protein levels were analyzed in the PC12 cell lines (Neo, FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D}). These cell lines were cultured in the absence or presence of dexamethasone for 48h to induce FGF1 expression, and FGF1 levels were analyzed by western blot (Figure 4b). In control PC12 cells, the level of endogenous FGF1 was undetectable. In the three other PC12 cell lines (FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D}), the level of FGF1 was low in the absence of dexamethasone and increased in its presence. FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cell lines expressed similar levels of FGF1 in the presence of dexamethasone.

FGF1 subcellular localization was then examined in the different PC12 cell lines to determine if phosphorylation of FGF1 could modify the protein localization. Cytosolic and nuclear proteins extracted from PC12 cell lines (FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D}) cultured in the presence of dexamethasone for 48h were analyzed by western blot (Figure 4c). Total cell lysates were used as positive controls. Lamin A/C and Enolase detection were used as nuclear and cytosolic purity controls, respectively. FGF1 is detected in both nuclear and cytosolic fractions of all FGF1 expressing cell lines, suggesting that FGF1 phosphorylation does not modify FGF1 subcellular localization in PC12 cells.

Wild-type and phosphorylation mutant forms of FGF1 induce PC12 cell neuronal differentiation.

To determine if phosphorylation regulates FGF1 neuronal differentiation activity, PC12 cell lines expressing FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} or FGF1^{S130D} were cultured in the absence or presence of dexamethasone for 3 days and cell morphology was observed by phase contrast microscopy (Figure 5a). In the absence of dexamethasone, FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} expressing PC12 cell lines presented an undifferentiated phenotype. By contrast, all these cell lines presented long and ramified neuritis after dexamethasone treatment. To quantify the differentiation activity of FGF1 phosphorylation mutant forms, the percentage of differentiated clones was determined from a large population of transfected PC12 clones, as described above (Figure 5b). After 12 days of dexamethasone treatment, about 60% of the FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} transfected PC12 clones presented a differentiated phenotype. Thus, the mutation of serine 130 to alanine or aspartic acid does not modify the

differentiation activity of FGF1 in PC12 cells, suggesting that FGF1 phosphorylation does not regulate this activity.

FGF1 phosphorylation inhibits its anti-apoptotic activity in p53-dependent cell death.

We previously showed that intracellular FGF1^{WT} protects PC12 cells from p53-dependent apoptosis and that both Δ NLS and K132E FGF1 mutations inhibit this anti-apoptotic activity (¹⁷, the present study). To determine if phosphorylation modulates FGF1 anti-apoptotic activity, PC12 cells (Neo, FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D}) were cultured in the presence of dexamethasone for 48h before the addition of etoposide to induce p53-dependent apoptosis. Cell survival after 40h of etoposide treatment was analyzed after crystal violet nuclei staining (Figure 6a). About 60% of FGF1^{WT} PC12 cells survived, whereas this percentage fell to 30% for Neo PC12 cells, as previously shown. Expression of the non-phosphorylatable FGF1^{S130A} highly protected PC12 cells against etoposide-induced apoptosis. Indeed, up to 80% of FGF1^{S130A} PC12 cells survived in these conditions. By contrast, expression of the constitutive phosphomimetic form FGF1^{S130D} did not protect PC12 cells from cell death, as similar levels of survival were observed with both Neo and FGF1^{S130D} PC12 cells. To confirm this result, we quantified the percentage of condensed and fragmented apoptotic nuclei, which characterize late-stage apoptosis, after Hoechst staining of the different etoposide-treated PC12 cells (Figure 6b). The percentage of apoptotic nuclei was similar in FGF1^{WT} and FGF1^{S130A} PC12 cell lines. It was significantly reduced in these cells when compared to Neo and FGF1^{S130D} PC12 cells. Altogether, these different experiments showed that FGF1^{S130A} protects PC12 cells from etoposide-induced apoptosis, which contrasts from FGF1^{S130D}.

We then examined p53 phosphorylation, p53-dependent trans-activation of *PUMA* and caspase-3 cleavage in Neo, FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cell lines after 0, 8 or 16h of etoposide treatment (Figure 6c). In Neo PC12 cells, the levels of P-p53 (Ser 15), PUMA and cleaved caspase-3 increased after etoposide treatment in a time-dependent manner. These increases were reduced in FGF1 expressing PC12 cells compared to Neo cells. The higher effect on these apoptotic markers was observed for the unphosphorylatable FGF1^{S130A}. Interestingly, FGF1^{S130D} had a slight effect on these different makers, but remained unable to protect PC12 cells from p53-dependent apoptosis. Altogether, our study showed that the unphosphorylatable FGF1^{S130A} protects PC12 cells from p53-dependent apoptosis by acting efficiently at different levels of this cell death process, in contrast to the mimetic phosphorylated FGF1^{S130D}. Therefore, it appears that phosphorylation inhibits FGF1 anti-apoptotic activity.

DISCUSSION

We have previously shown that FGF1 mediates neurotrophic and anti-apoptotic activities in PC12 cells by an intracrine pathway which requires FGF1 nuclear translocation^{11,17}. In the present study, we examined the activities of FGF1 mutant forms affected in their C-terminus (FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D}) (Figure 7). We showed that

all these mutants displayed a nuclear and cytosolic localization but differed in their activities. Indeed, the K132E mutation inhibited FGF1 neurotrophic and anti-apoptotic activities while the change of serine 130 in alanine or in aspartic acid did not alter FGF1-induced differentiation. Interestingly, the S130D mutation decreased the inhibitory activity of FGF1 on p53-dependent cell death, while the S130A mutation seemed to reinforce this activity. Altogether, our data showed that the C-terminal domain of FGF1 is crucial for FGF1 intracellular activities. FGF1 nuclear translocation was not affected, suggesting that the observed effects are not related to differences in nucleo-cytoplasmic distribution of the mutated forms of FGF1. Furthermore, as FGF1 nuclear translocation is required for its neurotrophic and anti-apoptotic activities¹⁷, these results imply that nuclear events, which are mitigated by the serine 130 and/or the lysine 132 mutations, are required for FGF1 intracellular activities. These nuclear events could be FGF1 post-translational modifications and/or protein-protein interactions with regulators of cell differentiation and survival, such as transcriptional factors.

FGF1 had been previously shown to be post-translationally modified by methylation and phosphorylation. Indeed, FGF1 can be methylated on 3 of its 12 lysine residues²⁹. *In vitro* reduction of bovine purified FGF1 methylation reduced both FGF1 affinity for heparin and its mitogenic activity when added to the culture medium of Balb/C 3T3 cells. The lysine 132 that is mutated in our study is one of the lysines that could be methylated (referred as Lysine 118 in²⁹). The recombinant mutant FGF1^{K132E} was studied by different laboratories^{11,25}. It was shown that this mutation inhibits FGF1 interaction with heparin and both FGF1 mitogenic and neurotrophic activities. However, recombinant FGF1^{K132E} could interact with FGF receptors and activate the MAP Kinase pathway, just as recombinant wild-type FGF1^{11,25}. This suggests that inhibition of heparin interaction is not the mechanism explaining the absence of activity of this mutant. Moreover, recombinant FGF1^{K132E} can be internalized by cells and translocates in the nucleus, like recombinant FGF1^{WT}, but it fails to induce DNA synthesis in various cell types¹⁵. Here, we showed that intracellular FGF1^{K132E} can translocate to the nuclear compartment like wild-type FGF1, but fails to induce PC12 cell differentiation and survival after serum-depletion or p53-dependent apoptosis. Klingenberg *et al.*¹⁵ proposed that mutation of lysine 132 could interfere with FGF1 phosphorylation. Our study of the phosphorylation mutant forms of FGF1 (FGF1^{S130A} and FGF1^{S130E}) in PC12 cells, which presented different activities from FGF1^{K132E} did not support this hypothesis. Another hypothesis is that the K132E mutation inhibits FGF1 methylation resulting in the inhibition of FGF1 activities. However, FGF1 was shown to be methylated on different lysine residues. Thus, we favor the hypothesis that this mutation modifies FGF1 ternary structure or FGF1 nuclear protein interactions required for its activity, modifications that remains to be characterized.

FGF1 was previously shown to be phosphorylated on its serine 130 by PKC δ in the nucleus^{26,27}. The effect of adding recombinant FGF1^{S130A} and FGF1^{S130E} in the culture medium was previously analyzed by Wiedlocha's team^{27,28}. Both recombinant FGF1 mutants were

shown to bind FGF receptors, internalize and translocate in the nucleus, as well as to promote DNA synthesis like recombinant FGF1^{WT}. However, FGF1^{S130E} (which mimics phosphorylated FGF1) was shown to be exported to the cytosol after nuclear translocation, to be degraded. In contrast, FGF1^{S130A} remains in the nucleus, suggesting that FGF1 phosphorylation is involved in this cytosolic export process²⁷. We did not observe any difference between the nuclear and cytosolic localization of FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D}, indicating that FGF1 phosphorylation did not interfere with nuclear/cytosolic traffic of FGF1 in PC12 cells. Different hypotheses could explain the discrepancies between both studies. Different cell types and different mutations were used to mimic FGF1 phosphorylation; another possible explanation is that recombinant internalized FGF1 and intracellular FGF1 display different regulations and fates in the cell.

The results reported here strongly suggest that phosphorylation inhibits FGF1 protection against p53-dependent apoptosis. The same result has also been obtained using the human neuroblastoma SHSY-5Y cell line (data not shown). As FGF1 is a survival factor for a large range of cell types^{11,12,24} and is overexpressed in various tumors^{19,30-32}, it would be interesting to characterize the nuclear events involved in FGF1 anti-apoptotic activity (*i.e.* nuclear protein interactions and/or transcriptional regulations) that are affected by FGF1 phosphorylation. Other growth factors (FGF2; FGF3) and their receptors (FGFR1, EGFR) could also mediate their activity by an intracrine/nuclear pathway^{5,6,33-36}. As most of these nuclear growth factors and/or receptors could exert oncogenic activities, the study of these nuclear pathways could be crucial to identify key regulators involved in tumor progression and/or resistance to radio- and/or chemo-therapy.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Drugs

PC12 cells, a rat pheochromocytoma derived cell line³⁷, were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 5% horse serum, 100 µg/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin and 1% Glutamax at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ as previously described¹⁷. PC12 cells transfected with inducible FGF1 expression vectors (pLK-Neo, pLK-FGF1^{WT}, pLK-FGF1^{K132E}, pLK-FGF1^{S130A} and pLK-FGF1^{S130D}) were maintained in DMEM supplemented with serum depleted in glucocorticoid as previously described¹⁷. FGF1 expression in transfected cells was induced by 5.10⁻⁷M dexamethasone (Tebu). Etoposide (50 µg/ml, Sigma, E1383) was used to induce p53-dependent apoptosis.

PC12 cells transfection

Dexamethasone inducible mutant FGF1 expression vectors were generated using QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent technologies) according to the protocol of the manufacturer. We used the pLK-FGF1^{WT} vector as a DNA template to generate pLK-FGF1^{K132E}, pLK-FGF1^{S130A} and pLK-FGF1^{S130D} with specific primers.

PC12 cells were transfected with 10 µg of the different vectors and 60 µl of Lipofectin reagent (Lifetechnologies) in 100mm diameter Petri dishes as previously described¹¹. Two days after transfection, cells were trypsinized and replated in four 100 mm diameter Petri dishes with a selection medium, which contains 0.5 mg/ml G418 (Lifetechnologies) in a glucocorticoid-depleted culture medium. After 15 days of selection, geneticin resistant colonies appeared whatever the expression vector used. WT and mutant FGF1 transfected PC12 cell lines were isolated and amplified for further analysis.

PC12 cells neuronal differentiation

For each transfection, cells were treated with $5 \cdot 10^{-7}$ M dexamethasone in a selection medium to induce FGF1 expression. After 10-12 days of treatment, the cell morphology was observed by phase contrast microscopy. The number of non-differentiated clones (composed of cells with no neuritis extension or extensions smaller than the size of the soma) and differentiated clones (composed of cells extending neuritis longer than the size of the cell body) were quantified. For each expression vector, four independent experiments were performed and at least 100 clones were examined by plate.

PC12 cell neuronal differentiation was also examined in stable PC12 cell lines after 7 days of $5 \cdot 10^{-7}$ M dexamethasone treatment by phase-contrast microscopy using a Nikon TMS microscope. Pictures were taken with a Nikon D50 camera to illustrate the manuscript. We also examined the expression of the 160 kDa form of Neurofilament (NF-160) by immunocytochemistry as a marker of neuronal differentiation (previously described in¹⁷).

Nucleo cytoplasmic fractionation

Cell fractionation was performed with NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (Thermo Scientific). 10^7 cells were used, according to the protocol of the manufacturer. Fractions were then analyzed by western blot to detect FGF1, Enolase and Lamin A/C in the different fractions.

Cell survival analysis by crystal violet nuclei staining

PC12 cell lines were plated in 12-multiwell plates with $5 \cdot 10^{-7}$ M dexamethasone. When the cells reached 70% confluence, 50 µg/ml etoposide was added to the medium to induce p53-dependent apoptosis (as previously described¹⁶). Cell viability was estimated using the crystal violet method (0.1% crystal violet, 0.1 M citric acid) after 40 h of etoposide treatment.

Cell survival in the absence of serum was also analyzed by crystal violet nuclei staining. PC12 cell lines were plated in the presence of dexamethasone in low serum medium (1% SVF and 0.5% HS) to permit cell attachment. Four days later, the cells were cultured for further 11 days in serum free medium. Percentages of cell survival were determined after crystal violet nuclei staining as described above.

Apoptosis analysis by Hoechst staining assay

Morphological changes in the nuclear chromatin of cells undergoing apoptosis were detected by Hoechst 33342 staining. WT and mutant FGF1 transfected PC12 cells were grown on glass coverslips in 6-well plates. After 48 h of dexamethasone treatment, 50 µg/ml etoposide was added to the medium to induce p53-dependent apoptosis during 40 hours. Cells were then fixed with 3.7 % PBS-formaldehyde for 20 min at room temperature. Fixed cells were washed with PBS and incubated with 10 µg/ml Hoechst for 5 min and analyzed by epifluorescence microscopy. Pictures were taken on a DMR Leica microscope equipped with an Olympus DP70 photo camera. For each cell line, about 1000 nuclei were analyzed to quantify the number of condensed and/or fragmented nuclei (late marker of apoptotic cells) reported to the total number of nuclei.

Western Blot analysis

PC12 cell lines were plated in 60 mm dishes in the absence or presence of 5.10^{-7} M dexamethasone. After 48 h of dexamethasone treatment, cells were incubated with 50 µg/ml etoposide to induce p53-dependent apoptosis. After different etoposide treatment times (0, 4, 8 or 16 h), cells were harvested, lysed and frozen at -20°C . Proteins (10-20 µg) were analyzed by western blot (as previously described¹⁷). The primary antibodies used in this study were anti-FGF1 (AB-32-NA, R&D Systems), anti-p53-P (Ser-15) (Cell Signaling), anti-PUMAα (N-19, Santa Cruz), anti-cleaved Caspase-3 (Asp175, Cell Signaling), anti-actin (Sigma), anti-Lamin A/C (Cell Signaling) and anti-Enolase (Santa Cruz).

nox and p21 mRNA analysis by RT-PCR assay

PC12 cell lines were plated in 100-mm dishes in the presence of 5.10^{-7} M dexamethasone. After 48 h of dexamethasone treatment, cells were incubated with 50 µg/ml etoposide to induce p53-dependent apoptosis. After different etoposide treatment times (0, 4 or 8 hours), total RNAs were extracted using the guanidium isothiocyanate method. RT-PCR was performed to examine the levels of *nox* and *p21* mRNA as previously described³⁸. The quantifications of *nox* and *p21* mRNA were normalized with respect to 18 S rRNA levels.

Statistical analysis

Each bar of the different graphs indicates the average measure and standard error of at least three independent experiments, and *P*-values are from paired two-tailed Student's *t*-tests.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial supports were obtained from the University of Versailles Saint-Quentin en Yvelines, the Ecole Pratique des Hautes Etudes and the Ligue Nationale contre le Cancer. We gratefully acknowledge Sébastien Gaumer for English correction of the manuscript.

REFERENCES

1. Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem* 2011 Feb; **149**(2): 121-130.
2. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 2000 Sep; **7**(3): 165-197.
3. Dorey K, Amaya E. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development* 2010 Nov; **137**(22): 3731-3742.
4. Imamura T, Engleka K, Zhan X, Tokita Y, Forough R, Roeder D, *et al.* Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science* 1990 Sep 28; **249**(4976): 1567-1570.
5. Sorensen V, Nilsen T, Wiedlocha A. Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. *Bioessays* 2006 May; **28**(5): 504-514.
6. Antoine M, Reimers K, Dickson C, Kiefer P. Fibroblast growth factor 3, a protein with dual subcellular localization, is targeted to the nucleus and nucleolus by the concerted action of two nuclear localization signals and a nucleolar retention signal. *J Biol Chem* 1997 Nov 21; **272**(47): 29475-29481.
7. Goldfarb M. Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005 Apr; **16**(2): 215-220.
8. Jaye M, Howk R, Burgess W, Ricca GA, Chiu IM, Ravera MW, *et al.* Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science* 1986 Aug 1; **233**(4763): 541-545.
9. Walicke PA. Basic and acidic fibroblast growth factors have trophic effects on neurons from multiple CNS regions. *J Neurosci* 1988 Jul; **8**(7): 2618-2627.
10. Cuevas P, Carceller F, Gimenez-Gallego G. Acidic fibroblast growth factor prevents post-axotomy neuronal death of the newborn rat facial nerve. *Neurosci Lett* 1995 Sep 15; **197**(3): 183-186.

11. Renaud F, Desset S, Oliver L, Gimenez-Gallego G, Van Obberghen E, Courtois Y, *et al.* The neurotrophic activity of fibroblast growth factor 1 (FGF1) depends on endogenous FGF1 expression and is independent of the mitogen-activated protein kinase cascade pathway. *J Biol Chem* 1996 Feb 2; **271**(5): 2801-2811.
12. Desire L, Courtois Y, Jeanny JC. Suppression of fibroblast growth factors 1 and 2 by antisense oligonucleotides in embryonic chick retinal cells in vitro inhibits neuronal differentiation and survival. *Exp Cell Res* 1998 May 25; **241**(1): 210-221.
13. Raguenez G, Desire L, Lantrua V, Courtois Y. BCL-2 is upregulated in human SH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated by overexpression of fibroblast growth factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 May 19; **258**(3): 745-751.
14. Wiedlocha A, Falnes PO, Madshus IH, Sandvig K, Olsnes S. Dual mode of signal transduction by externally added acidic fibroblast growth factor. *Cell* 1994 Mar 25; **76**(6): 1039-1051.
15. Klingenberg O, Wiedlocha A, Rapak A, Munoz R, Falnes P, Olsnes S. Inability of the acidic fibroblast growth factor mutant K132E to stimulate DNA synthesis after translocation into cells. *J Biol Chem* 1998 May 1; **273**(18): 11164-11172.
16. Bouleau S, Grimal H, Rincheval V, Godefroy N, Mignotte B, Vayssiere JL, *et al.* FGF1 inhibits p53-dependent apoptosis and cell cycle arrest via an intracrine pathway. *Oncogene* 2005 Nov 24; **24**(53): 7839-7849.
17. Rodriguez-Enfedaque A, Bouleau S, Laurent M, Courtois Y, Mignotte B, Vayssiere JL, *et al.* FGF1 nuclear translocation is required for both its neurotrophic activity and its p53-dependent apoptosis protection. *Biochim Biophys Acta* 2009 Nov; **1793**(11): 1719-1727.
18. Dorkin TJ, Robinson MC, Marsh C, Neal DE, Leung HY. aFGF immunoreactivity in prostate cancer and its co-localization with bFGF and FGF8. *J Pathol* 1999 Dec; **189**(4): 564-569.
19. Smith G, Ng MT, Shepherd L, Herrington CS, Gourley C, Ferguson MJ, *et al.* Individuality in FGF1 expression significantly influences platinum resistance and progression-free survival in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2012 Oct 9; **107**(8): 1327-1336.
20. Slattery ML, John EM, Stern MC, Herrick J, Lundgreen A, Giuliano AR, *et al.* Associations with growth factor genes (FGF1, FGF2, PDGFB, FGFR2, NRG2, EGF, ERBB2) with breast cancer risk and survival: the Breast Cancer Health Disparities Study. *Breast Cancer Res Treat* 2013 Aug; **140**(3): 587-601.
21. Eckenstein F, Woodward WR, Nishi R. Differential localization and possible functions of aFGF and bFGF in the central and peripheral nervous systems. *Ann N Y Acad Sci* 1991; **638**: 348-360.

22. Stock A, Kuzis K, Woodward WR, Nishi R, Eckenstein FP. Localization of acidic fibroblast growth factor in specific subcortical neuronal populations. *J Neurosci* 1992 Dec; **12**(12): 4688-4700.
23. Bugra K, Oliver L, Jacquemin E, Laurent M, Courtois Y, Hicks D. Acidic fibroblast growth factor is expressed abundantly by photoreceptors within the developing and mature rat retina. *Eur J Neurosci* 1993 Dec 1; **5**(12): 1586-1595.
24. Renaud F, Oliver L, Desset S, Tassin J, Romquin N, Courtois Y, *et al.* Up-regulation of aFGF expression in quiescent cells is related to cell survival. *J Cell Physiol* 1994 Mar; **158**(3): 435-443.
25. Burgess WH, Shaheen AM, Ravera M, Jaye M, Donohue PJ, Winkles JA. Possible dissociation of the heparin-binding and mitogenic activities of heparin-binding (acidic fibroblast) growth factor-1 from its receptor-binding activities by site-directed mutagenesis of a single lysine residue. *J Cell Biol* 1990 Nov; **111**(5 Pt 1): 2129-2138.
26. Mascarelli F, Raulais D, Courtois Y. Fibroblast growth factor phosphorylation and receptors in rod outer segments. *EMBO J* 1989 Aug; **8**(8): 2265-2273.
27. Wiedlocha A, Nilsen T, Wesche J, Sorensen V, Malecki J, Marcinkowska E, *et al.* Phosphorylation-regulated nucleocytoplasmic trafficking of internalized fibroblast growth factor-1. *Mol Biol Cell* 2005 Feb; **16**(2): 794-810.
28. Klingenberg O, Wiedlocha A, Olsnes S. Effects of mutations of a phosphorylation site in an exposed loop in acidic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 1999 Jun 18; **274**(25): 18081-18086.
29. Harper JW, Lobb RR. Reductive methylation of lysine residues in acidic fibroblast growth factor: effect on mitogenic activity and heparin affinity. *Biochemistry* 1988 Jan 26; **27**(2): 671-678.
30. La Rosa S, Sessa F, Colombo L, Tibiletti MG, Furlan D, Capella C. Expression of acidic fibroblast growth factor (aFGF) and fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) in breast fibroadenomas. *J Clin Pathol* 2001 Jan; **54**(1): 37-41.
31. Takahashi JA, Mori H, Fukumoto M, Igarashi K, Jaye M, Oda Y, *et al.* Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Aug; **87**(15): 5710-5714.

32. Maxwell M, Naber SP, Wolfe HJ, Hedley-Whyte ET, Galanopoulos T, Neville-Golden J, *et al.* Expression of angiogenic growth factor genes in primary human astrocytomas may contribute to their growth and progression. *Cancer Res* 1991 Feb 15; **51**(4): 1345-1351.
33. Lo HW, Hung MC. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer* 2006 Jan 30; **94**(2): 184-188.
34. Stachowiak MK, Maher PA, Stachowiak EK. Integrative nuclear signaling in cell development--a role for FGF receptor-1. *DNA Cell Biol* 2007 Dec; **26**(12): 811-826.
35. Patry V, Bugler B, Maret A, Potier M, Prats H. Endogenous basic fibroblast growth factor isoforms involved in different intracellular protein complexes. *Biochem J* 1997 Aug 15; **326** (Pt 1): 259-264.
36. Payson RA, Chotani MA, Chiu IM. Regulation of a promoter of the fibroblast growth factor 1 gene in prostate and breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998 Aug; **66**(3): 93-103.
37. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976 Jul; **73**(7): 2424-2428.
38. Bouleau S, Parvu-Ferecatu I, Rodriguez-Enfedaque A, Rincheval V, Grimal H, Mignotte B, *et al.* Fibroblast Growth Factor 1 inhibits p53-dependent apoptosis in PC12 cells. *Apoptosis* 2007 Aug; **12**(8): 1377-1387.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: FGF1^{K132E} expression and subcellular localization in PC12 cells. a) PC12 cells were transfected with pLK-FGF1^{WT} or pLK-FGF1^{K132E} dexamethasone inducible vectors to overexpress FGF1^{WT} or FGF1^{K132E}, respectively. The pLK-FGF1^{K132E} vector was generated by site-directed mutagenesis using pLK-FGF1^{WT} (aa 15 to 154) as a DNA template. The KKPK sequence (aa 23 to 27) is the FGF1 nuclear localization sequence. b) Neo, FGF1^{WT}, FGF1^{K132E} PC12 cell lines were cultured in the absence or presence of 5x10⁻⁷ M dexamethasone for 48h. FGF1 expression was analyzed by western blot using the actin level as a control. The presence of dexamethasone increased FGF1 levels in FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cells, no FGF1 was detected in Neo PC12 cells. c) FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines were treated with dexamethasone for 48h. Nuclear (N) and cytosolic (C) proteins were analyzed by western blot for FGF1, Enolase (cytosolic marker) and Lamin A/C (nuclear marker). Total protein extracts (TE) were used as controls. FGF1 was detected in all the fractions.

Figure 2: The K132E mutation inhibits FGF1 neurotrophic activity. a-b) Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines were cultured in the absence or presence of dexamethasone for 7 days. Cell morphology was observed by phase contrast microscopy (a) and Neurofilament NF-160 kDa (a neuronal marker) expression was analyzed by immunocytochemistry (b). c) PC12 cells transfected by pLK-Neo, pLK-FGF1^{WT} and pLK-FGF1^{K132E} were treated with dexamethasone for 10 days in a selection medium. The clones morphology was examined and the percentage of differentiated clones, which present neuritis longer than cell size, were quantified from four independent experiments. d) Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines were cultured in the presence of dexamethasone in serum free medium for 11 days. Cell survival was analyzed by crystal violet nuclei staining. The graph presents the mean of three independent experiments. In contrast to FGF1^{K132E}, FGF1^{WT} presented a neurotrophic activity.

Figure 3: The K132E mutation inhibits FGF1 anti-apoptotic activity. a) Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines were treated with dexamethasone for 48h. Then, cell survival after 40h etoposide treatment was estimated after crystal violet nuclei staining. FGF1^{WT} protected PC12 cells from p53-dependent apoptosis while FGF1^{K132E} did not (** p<0.01, *** p<0.001, ns p>0.05, n=4). b) Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines cultured in the presence of dexamethasone were treated with etoposide for 0, 8 or 16h. p53 activation (Ser 15 phosphorylation), PUMA expression and caspase-3 cleavage were analyzed by western blot. Actin detection was used as a control. Etoposide induced up-regulation of P-p53 (Ser 15), PUMA and cleaved caspase-3 in all cells. However, these levels were lower in FGF1^{WT} PC12 cells compared to FGF1^{K132E} and Neo PC12 cells. c) Noxa (left panel) and p21 (right panel) mRNA levels were analyzed by RT-PCR in Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines after 0, 8 or 16h of etoposide treatment in the presence of dexamethasone. 18S rRNA levels were used as a control for the quantifications. In contrast to FGF1^{K132E}, FGF1^{WT} decreased p53-dependent up-regulation of *noxa* and *p21* mRNA levels.

Figure 4: Expression and subcellular localization of wild-type and phosphorylation mutant forms of FGF1. a) PC12 cells were transfected with the pLK-FGF1^{WT}, pLK-FGF1^{S130A} or pLK-FGF1^{S130D} dexamethasone-inducible vectors to respectively overexpress FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} or FGF1^{S130D}. The pLK-FGF1^{S130A} and pLK-FGF1^{S130D} vectors were generated by site-directed mutagenesis. b) Neo, FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cell lines were cultured in the absence or presence of 5x10⁻⁷M dexamethasone for 48h. FGF1 expression was analyzed by western blot using actin level as a control. The presence of dexamethasone increased FGF1 levels at comparable levels in the different PC12 cells transfected to express one of the different FGF1 forms. c) FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cell lines were treated with dexamethasone for 48h. Nuclear (N) and cytosolic (C) proteins were analyzed by western blot for FGF1, Enolase (cytosolic marker) and Lamin A/C (nuclear marker). Total protein extracts (TE) were used as controls. FGF1 was detected in all the fractions.

Figure 5: FGF1 phosphorylation does not modify its differentiation activity. a) FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cell lines were cultured in the absence or presence of dexamethasone for three days and the cell morphology was observed by phase contrast microscopy. b) PC12 cells transfected with pLK-Neo, pLK-FGF1^{WT}, pLK-FGF1^{S130A} or pLK-FGF1^{S130D} were treated with dexamethasone for 12 days in a selection medium. The morphology of the clones was examined and the percentages of differentiated clones, which present neuritis longer than cell size, were quantified from three independent experiments (***) p<0.001). FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} induced PC12 cell differentiation.

Figure 6: FGF1 phosphorylation inhibits its anti-apoptotic activity. a-b) Neo, FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cell lines were treated with dexamethasone for 48h. p53-dependent apoptosis was then induced by etoposide treatment during 40h. (a) Cell survival was estimated by crystal violet nuclei staining (** p<0.01, *** p<0.001, ns p>0.05, n=6). (b) Apoptosis (percentage of apoptotic nuclei) was estimated after Hoechst nuclei staining (*p<0.05, **p<0.01, ns p>0.05, n=3). FGF1^{WT} and FGF1^{S130A} protected PC12 cells from p53-dependent apoptosis in contrast to FGF1^{S130D}. c) Neo, FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cells cultured in the presence of dexamethasone were treated with etoposide for 0, 8 or 16 hours. The levels of P-p53 (Ser 15), PUMA and cleaved caspase-3 were detected by western blot. Actin was used as a loading control. FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} decreased etoposide-induced up-regulation of these different apoptotic markers. The stronger effect was observed for the unphosphorylatable FGF1.

Figure 7: Intracellular activities and subcellular localization of wild-type (FGF1^{WT}) and mutant FGF1 forms (FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A}, FGF1^{S130D}). a) Intracellular FGF1^{WT} induced PC12 cells neuronal differentiation. Only the K132E mutation inhibited this activity. b) Intracellular FGF1^{WT} and FGF1^{S130A} protected PC12 cells from p53-dependent apoptosis, in contrast to FGF1^{K132E} and FGF1^{S130D}. All these FGF1 forms presented both a nuclear and a cytosolic localization.

Figure 1

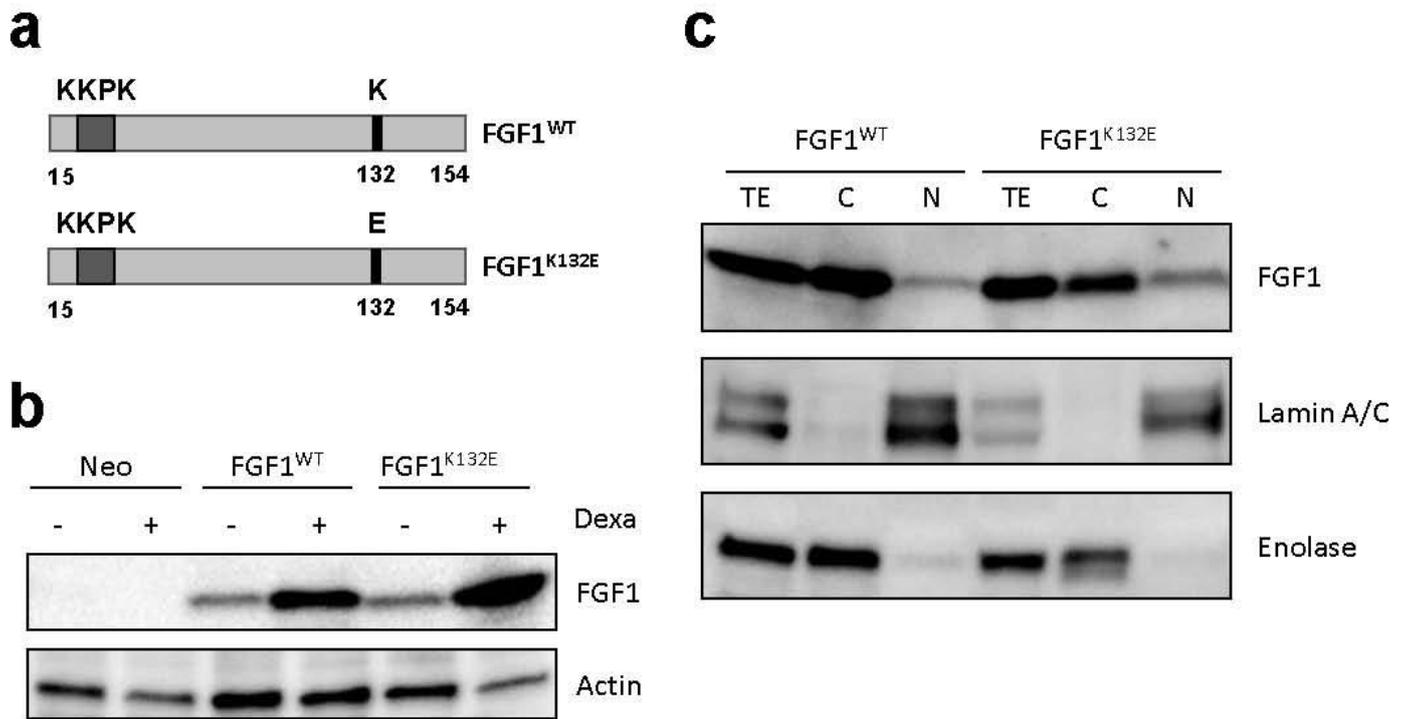


Figure 2

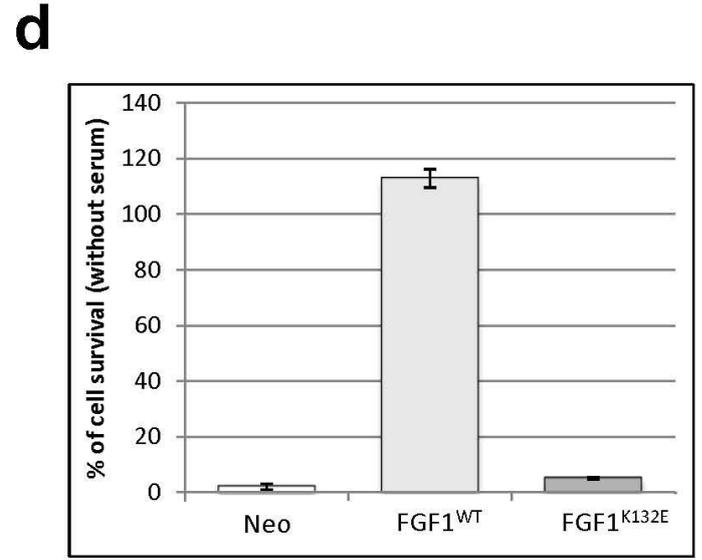
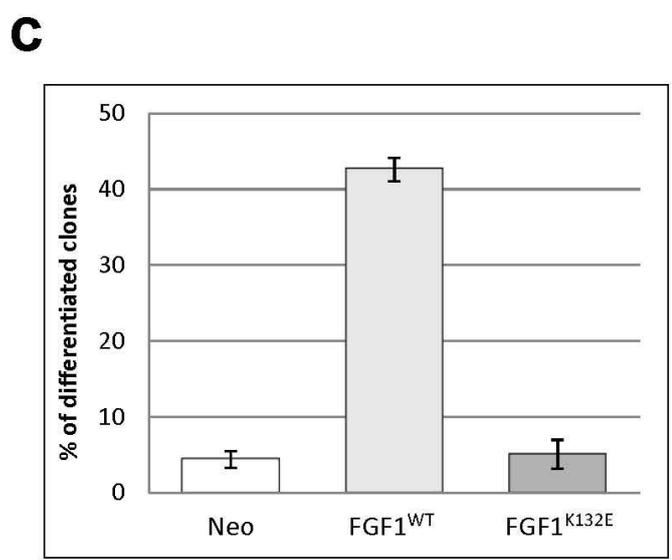
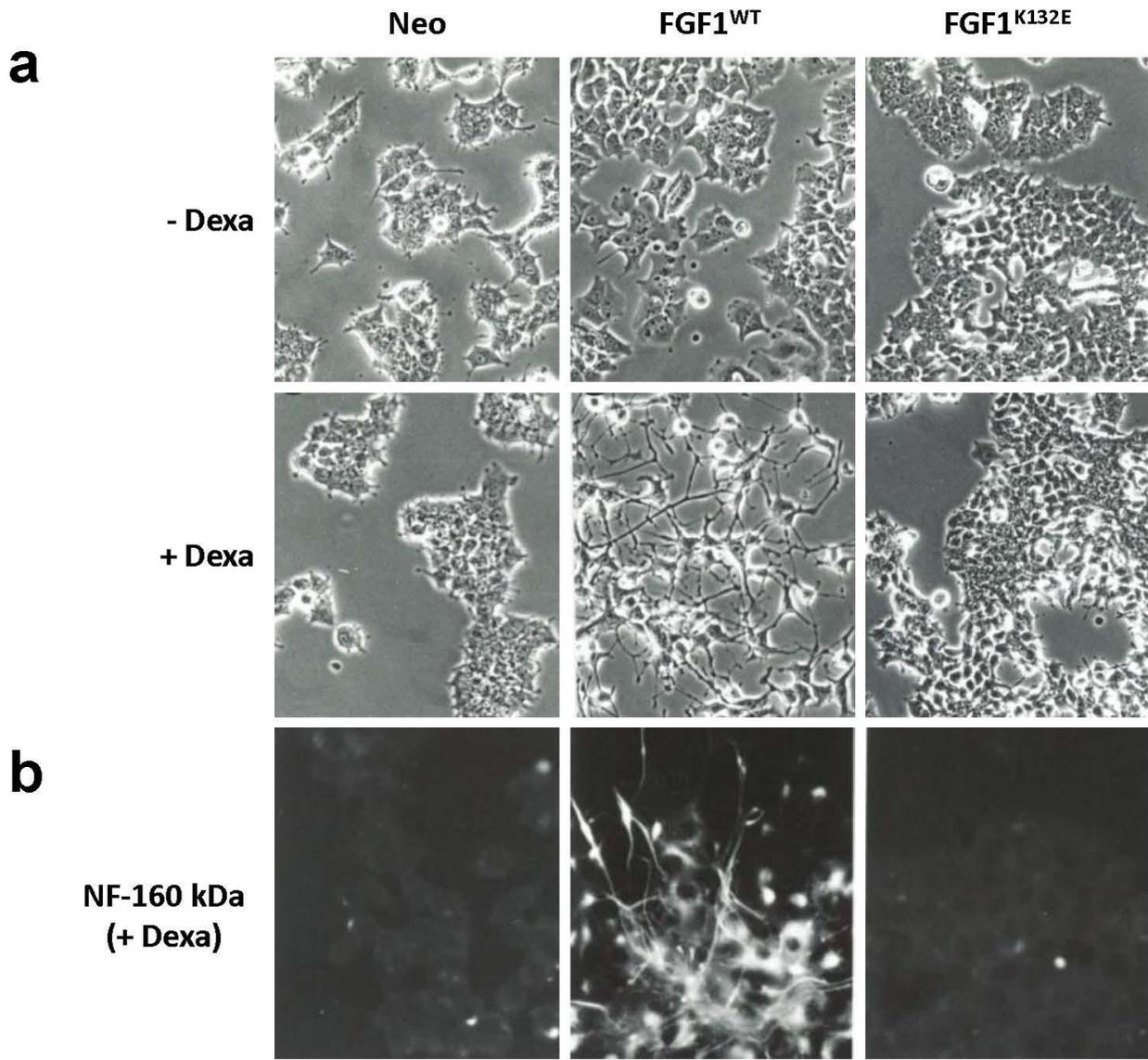


Figure 3

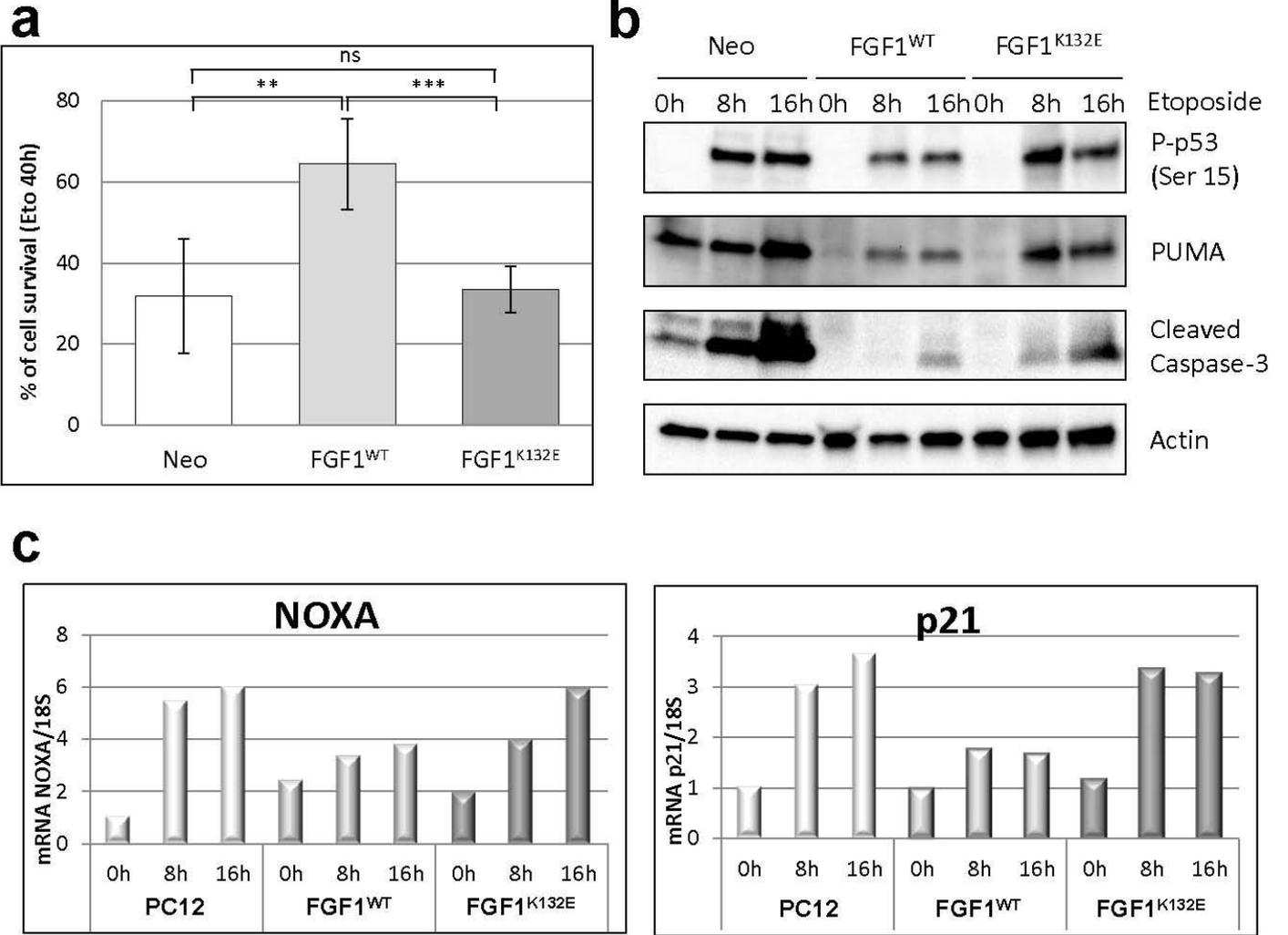


Figure 4

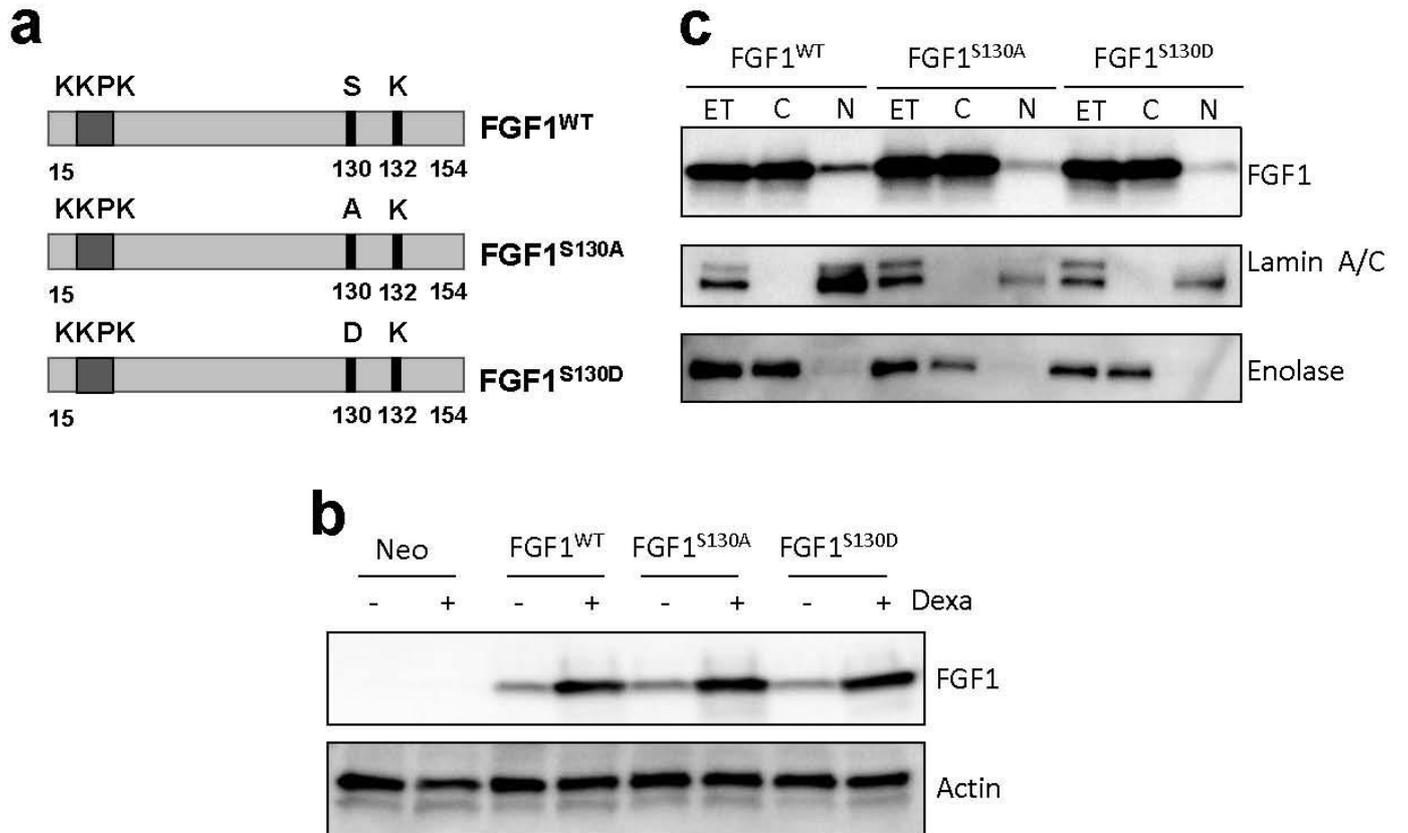


Figure 5

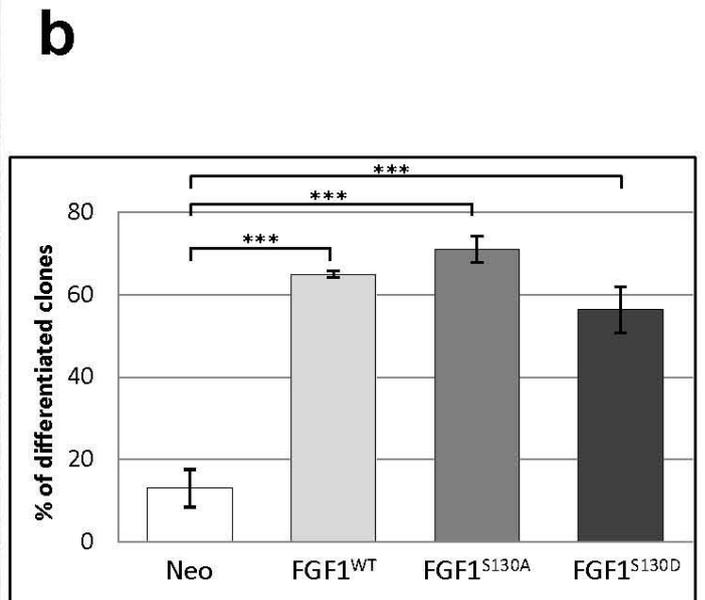
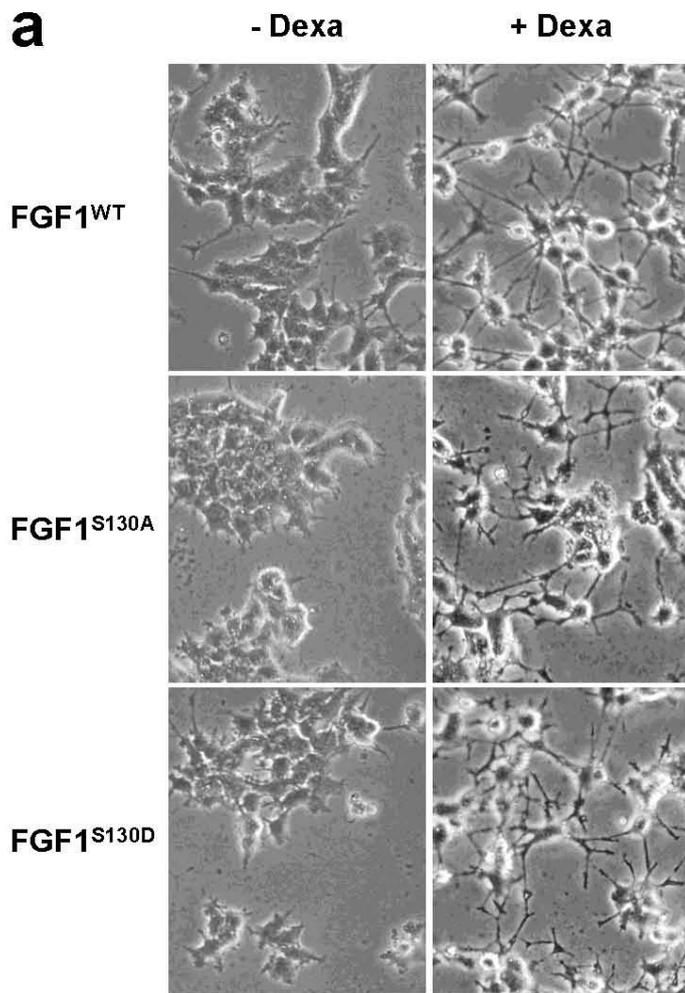
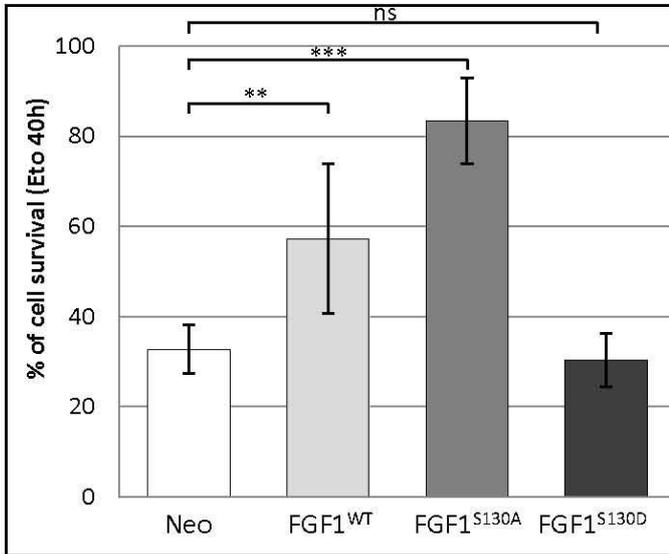
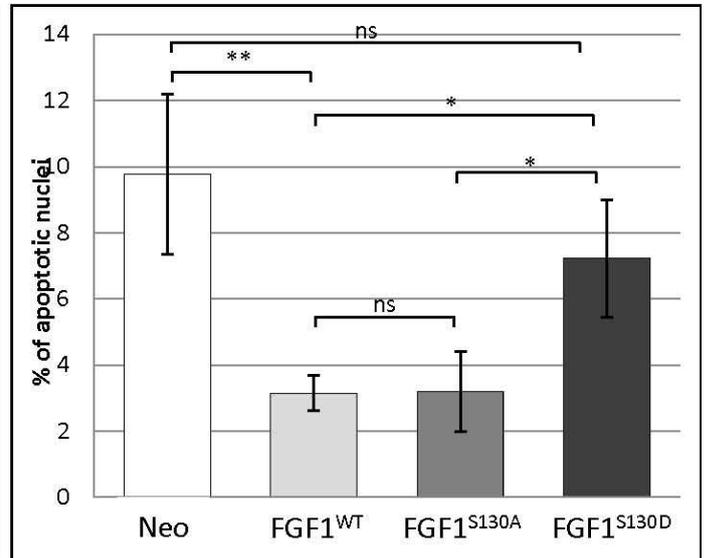


Figure 6

a



b



c

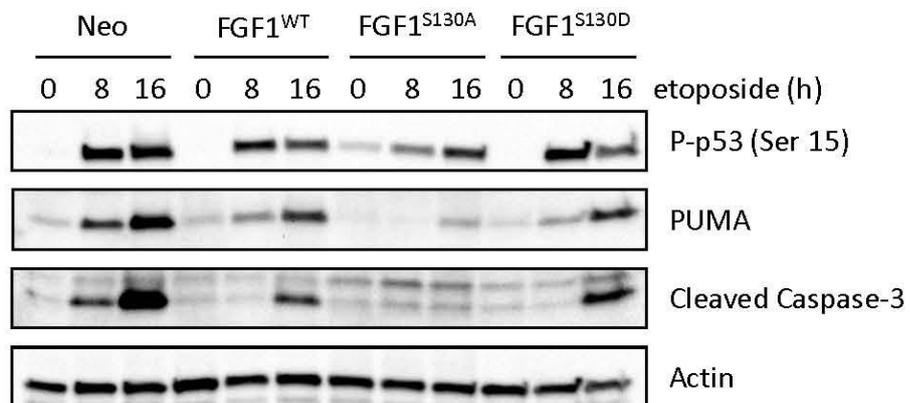
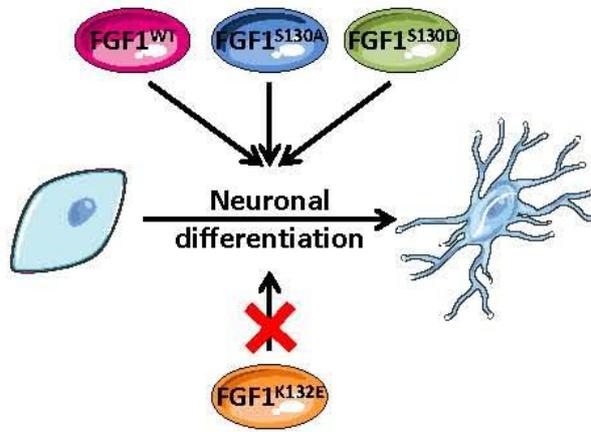
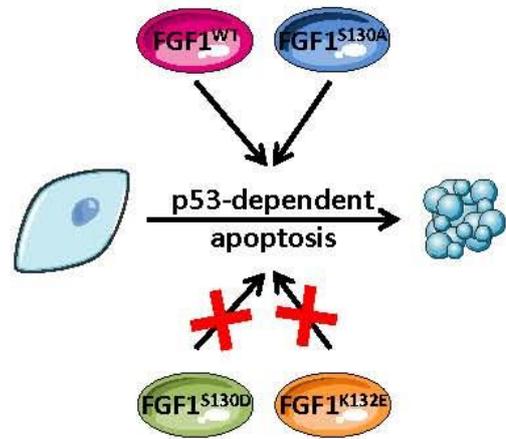


Figure 7

a



b



II. Étude de l'interaction entre la protéine p53 et les différentes formes de FGF1 dans les cellules PC12

Les précédents travaux de l'équipe ont permis de mettre en évidence pour la première fois la présence d'une interaction entre la protéine p53 et le facteur FGF1 par immunoprécipitation (Rodriguez-Enfedaque et al., 2009). L'interaction entre p53 et le FGF1 semble corrélée à l'activité anti-apoptotique du FGF1. En effet, la forme mutante du FGF1 déléetée de sa séquence de localisation nucléaire (FGF1^{ΔNLS}) n'a pas d'activité anti-apoptotique dans les cellules PC12 et n'est pas co-précipitée avec la protéine p53, contrairement au FGF1 sauvage (FGF1^{WT}). Cette interaction FGF1/p53 pourrait être impliquée dans la régulation des activités transcriptionnelles de p53 et suggère l'existence de nouveaux mécanismes de régulation de la protéine p53 par le FGF1.

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à mieux caractériser l'interaction entre le FGF1 et p53. J'ai notamment essayé de mettre en évidence une corrélation entre l'activité anti-apoptotique (suite à l'activation de l'apoptose dépendante de p53) des différentes formes de FGF1 (FGF1^{WT}, FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D}) et leur capacité à interagir avec p53. La première partie de mes travaux a permis de mettre en évidence que les mutations K132E et S130D inhibent l'activité anti-apoptotique du FGF1 dans les cellules PC12 contrairement à la mutation S130A. En revanche toutes ces formes sont localisées dans le compartiment nucléaire. La localisation nucléaire du FGF1 est donc nécessaire, mais insuffisante à son activité anti-apoptotique (**Tableau 3**). L'activité anti-apoptotique du FGF1 semble donc être régulée par des évènements nucléaires, par exemple des interactions protéiques.

	FGF1 ^{WT}	FGF1 ^{K132E}	FGF1 ^{S130A}	FGF1 ^{S130D}
Localisation cytosolique	Oui	Oui	Oui	Oui
Localisation nucléaire	Oui	Oui	Oui	Oui
Activité anti-apoptotique	Oui	Non	Oui	Non

Tableau 3: Localisation subcellulaire et activité anti-apoptotique des différentes formes de FGF1 étudiées. Les différentes formes de FGF1 étudiées sont localisées à la fois dans le cytosol et le noyau. En revanche, les formes mutantes FGF1^{K132E} et FGF1^{S130D} ne présentent pas d'activité anti-apoptotique.

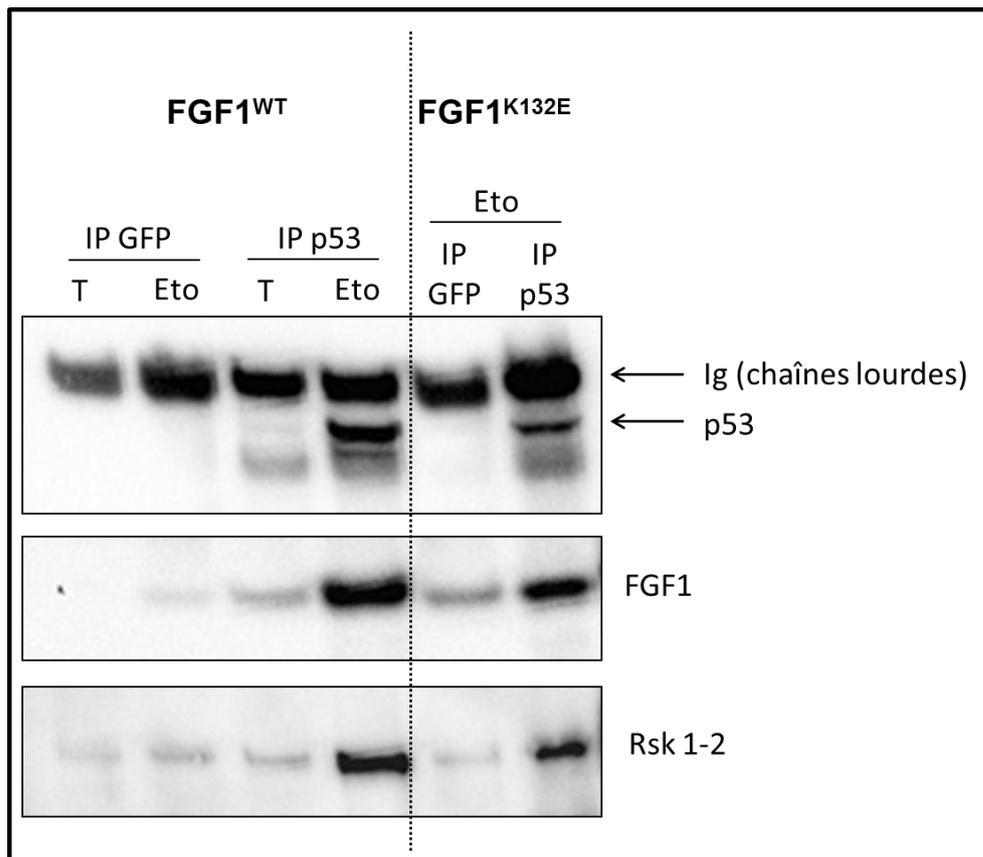


Figure 33: La protéine p53 interagit avec le FGF1^{K132E}.

Les immunoprécipitations ont été réalisées soit avec un anticorps anti-GFP pour l'immunoprécipitation contrôle (IP GFP) soit avec un anticorps monoclonal dirigé contre p53 (IP p53). Ces immunoprécipitations ont été réalisées en condition témoin (T) ou suite à l'ajout d'étoposide (Eto). L'immunoprécipitation de la protéine p53 est bien spécifique. Le FGF1^{WT} est bien co-précipité avec la protéine p53. Le FGF1^{K132E} est également co-précipité avec la protéine p53 dans les cellules PC12, comme la protéine Rsk, un partenaire protéique de p53.

Nous avons donc émis l'hypothèse que les variations d'activité anti-apoptotique observées d'une forme mutante du FGF1 à l'autre pourraient être liées à l'interaction avec différents partenaires protéiques. Sachant que la forme sauvage du FGF1 interagit avec p53, l'activité anti-apoptotique des différentes formes de FGF1 pourrait être corrélée à leur interaction avec p53.

Afin de répondre à cette question, j'ai réalisé des expériences d'immunoprécipitation, qui m'ont permis d'obtenir des résultats préliminaires que je vais maintenant détailler.

1 Stratégie d'étude

Les immunoprécipitations sont réalisées grâce à des billes magnétiques couplées à la protéine G (Millipore). Ces billes magnétiques sont au préalable pré-couplées aux anticorps d'intérêt (immunoprécipitation contrôle : anticorps anti-GFP ; immunoprécipitation p53 : anticorps monoclonal issu de l'hybridome H122) sur la nuit. Les immunoprécipitations sont réalisées sur des cellules PC12 transfectées de façon stable préalablement traitées avec de la dexaméthasone pendant 48h afin d'induire l'expression des différentes formes de FGF1. L'apoptose a été induite dans ces cellules par ajout d'étoposide pendant 16h. Les cellules sont ensuite lysées et les extraits protéiques incubés pendant 4h avec les billes magnétiques pré-couplées aux anticorps d'intérêt. Après incubation, les billes sont lavées pour éliminer les interactions non spécifiques et les protéines immunoprécipitées sont dénaturées et analysées par western blot.

2 Le FGF1^{K132E} interagit-il avec la protéine p53 ?

Je me suis tout d'abord intéressée à l'interaction potentielle de p53 avec le FGF1^{K132E}. J'ai donc immunoprécipité la protéine p53 dans les cellules surexprimant soit le FGF1^{WT} soit le FGF1^{K132E} et analysé l'interaction potentielle entre p53 et le FGF1 par western blot (**Figure 33**).

La présence de p53 est bien révélée dans les puits correspondants à l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-p53. Dans les cellules surexprimant le FGF1^{WT}, on observe que le FGF1 est bien co-immunoprécipité avec la protéine p53, que ce soit en condition témoin (T) ou suite au traitement avec l'étoposide (Eto). Le FGF1 n'est quasiment pas détecté dans les puits correspondant à l'immunoprécipitation contrôle (IP GFP).

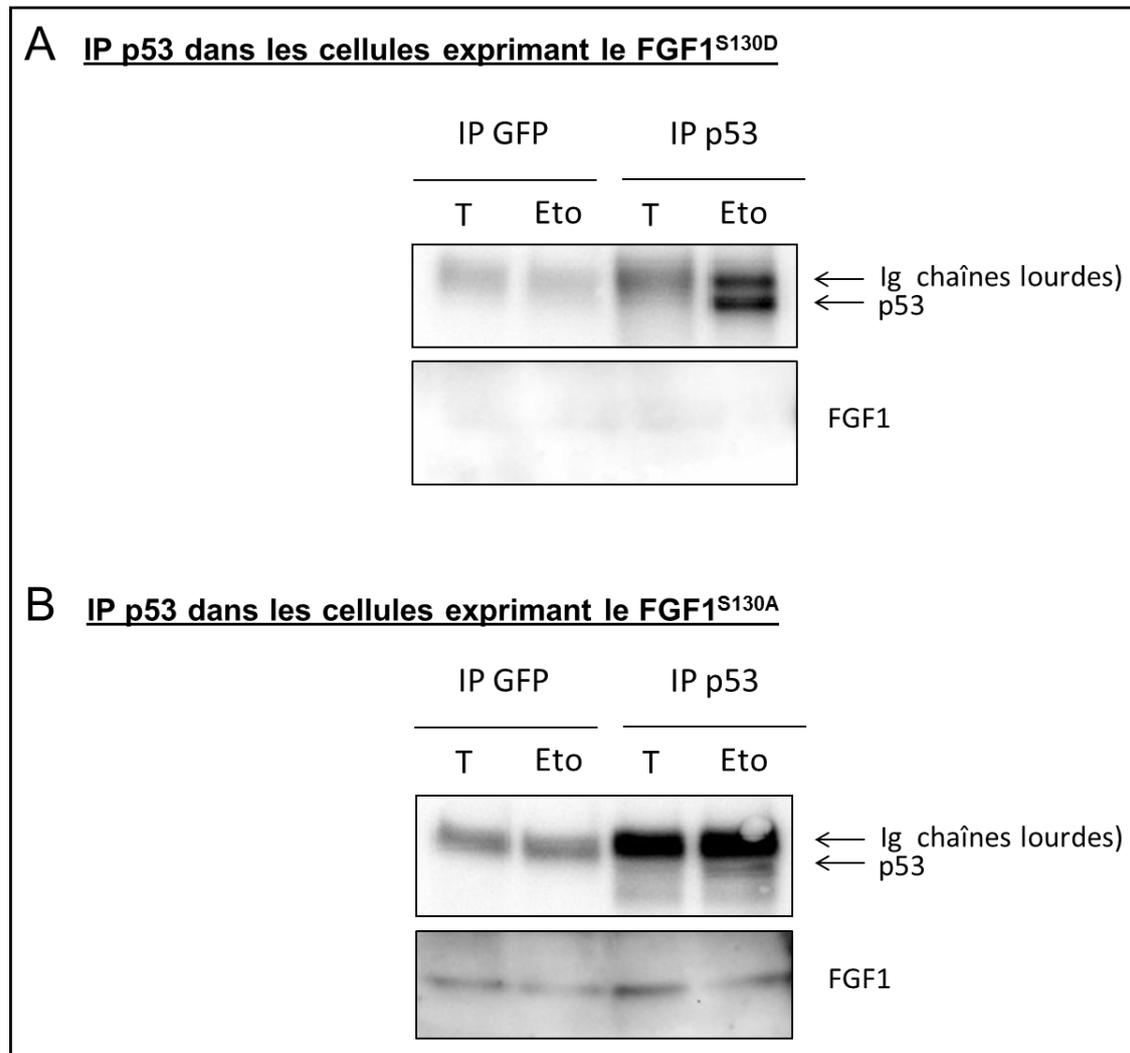


Figure 34: La phosphorylation du FGF1 semble inhiber son interaction avec p53.

Les immunoprécipitations ont été réalisées soit avec un anticorps anti-GFP pour l'immunoprécipitation contrôle (IP GFP) soit avec un anticorps monoclonal dirigé contre p53 (IP p53). Ces immunoprécipitations ont été réalisées en condition témoin (T) ou suite à l'ajout d'étoposide (Eto). L'immunoprécipitation de la protéine p53 est bien spécifique.

(A) Le FGF1^{S130D} n'est pas détectable, ni dans l'IP p53 ni dans l'IP contrôle. Le FGF1^{S130D} ne semble donc pas interagir avec p53. (B) On observe du FGF1^{S130A} dans l'IP p53, mais également dans l'IP GFP. Le niveau de FGF1 semble plus important dans les IP p53. Il semblerait donc que la forme mutante FGF1^{S130A} puisse interagir avec la protéine p53.

L'interaction entre le FGF1^{WT} et la protéine p53 est donc spécifique. La spécificité de l'immunoprécipitation est confirmée par la présence de la protéine Rsk, un partenaire protéique de p53, dans les puits correspondant à l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-p53.

Dans les cellules surexprimant le FGF1^{K132E}, l'immunoprécipitation a été réalisée seulement en condition étoposide. On observe la présence du FGF1 dans le puits correspondant à l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-p53. On observe également la présence du FGF1 dans le puits correspondant à l'immunoprécipitation contrôle (IP GFP), mais en quantité beaucoup plus faible. Le partenaire protéique de p53, RSK, est également retrouvé dans ces deux puits, dans les mêmes proportions. Ce résultat semble indiquer que le FGF1^{K132E} interagit avec la protéine p53, comme le FGF1^{WT}.

Il semblerait donc que l'activité anti-apoptotique du FGF1 ne soit pas strictement corrélée à son interaction avec p53. Afin de mieux comprendre le rôle de cette interaction sur les activités intracellulaires de FGF1, j'ai cherché à déterminer si les autres formes mutantes du FGF1 (FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D}) peuvent interagir ou non avec p53.

3 Les formes mutantes FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D} interagissent-elles avec la protéine p53 ?

Afin de déterminer si la phosphorylation du FGF1 joue un rôle sur son interaction avec la protéine p53, j'ai réalisé des immunoprécipitations de p53 dans des cellules surexprimant soit le FGF1^{S130D} soit le FGF1^{S130A} (**Figure 34**).

Dans les cellules surexprimant le FGF1^{S130D}, la protéine p53 est immunoprécipitée de façon spécifique (**Figure 34A**). En revanche, le FGF1 n'est pas détectable, que ce soit dans les puits correspondant aux immunoprécipitations avec l'anticorps anti-p53 ou dans les immunoprécipitations contrôle. Il semble donc que le FGF1^{S130D} n'interagisse pas avec la protéine p53.

Dans les cellules surexprimant le FGF1^{S130A}, la protéine p53 est bien immunoprécipitée, quoiqu'en faible quantité (**Figure 34B**). On observe du FGF1 dans les puits correspondant aux immunoprécipitations avec l'anticorps anti-p53. Mais on observe aussi du FGF1 dans les puits correspondant à l'immunoprécipitation contrôle. Toutefois, on observe une légère différence de niveau du FGF1 entre les immunoprécipitations contrôles et les immunoprécipitations de la protéine p53 : le niveau de FGF1 semble plus important dans ces

dernières. Il semblerait donc que la forme mutante FGF1^{S130A} puisse interagir avec la protéine p53 dans les cellules PC12. Ce type de résultat a été reproduit plusieurs fois. Toutefois, les problèmes techniques rencontrés au cours des expériences d'immunoprécipitation ne nous ont pas permis de conclure définitivement sur l'interaction entre la protéine p53 et la forme FGF1^{S130A}. Des mises au point techniques sont nécessaires afin d'améliorer la spécificité des expériences d'immunoprécipitation.

4 Conclusion

L'étude des interactions protéiques entre p53 et les différentes formes de FGF1 reste préliminaire et les résultats obtenus doivent être confirmés.

Toutefois, les résultats présentés semblent montrer qu'il n'y a pas une corrélation parfaite entre l'activité anti-apoptotique des différentes formes mutantes de FGF1 et leur capacité à interagir avec p53. Les FGF1^{WT} et FGF1^{S130A}, qui ont une activité anti-apoptotique dans les cellules PC12 interagiraient avec p53. Le FGF1^{S130D}, qui lui n'a pas d'activité anti-apoptotique, ne semble pas interagir avec p53. Toutefois, nous avons pu montrer que le FGF1^{K132E}, qui, comme le FGF1^{S130D} ne possède pas d'activité anti-apoptotique, peut interagir avec p53 (**Tableau 4**).

	FGF1 ^{WT}	FGF1 ^{K132E}	FGF1 ^{S130A}	FGF1 ^{S130D}
Activité anti-apoptotique	Oui	Non	Oui	Non
Interaction avec p53	Oui	Oui	Oui	Non

Tableau 4: L'activité anti-apoptotique du FGF1 n'est pas corrélée à sa capacité à interagir avec p53.

Ces résultats, contrairement à ceux obtenus précédemment par l'équipe avec le FGF1^{ΔNLS} ne semblent pas montrer de corrélation entre l'activité anti-apoptotique du FGF1 et son interaction avec p53. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats :

- Le FGF1 et p53 interagissent ensemble au sein d'un complexe protéique plus large, dont les partenaires peuvent varier en fonction de la forme de FGF1 étudiée, ce qui expliquerait la différence d'activité.

- Le FGF1 peut, indépendamment de p53, agir à plusieurs niveaux de la cascade de signalisation apoptotique. Ces activités peuvent être exercées soit par le FGF1 seul, soit par le FGF1 au sein d'un complexe protéique non identifié.

Je détaillerai ces différentes hypothèses dans la partie Discussion de ma thèse.

Discussion

L'équipe au sein de laquelle j'ai effectué mes travaux de thèse s'intéresse depuis de nombreuses années aux interactions entre les voies de signalisation médiées par le facteur de croissance FGF1 et la protéine oncosuppressive p53.

Le FGF1 est un facteur de croissance appartenant à la famille des FGFs qui régule différentes fonctions biologiques telles que la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire (Itoh, 2007; Wesche et al., 2011). Ces activités peuvent être médiées par deux voies de signalisation : une voie extracellulaire qui dépend de la stimulation des récepteurs membranaires FGFR et une voie intracellulaire qui est initiée en absence de sécrétion du FGF1. Il est à noter que la voie intracellulaire est la voie préférentiellement activée, la sécrétion du FGF1 étant un événement marginal observable uniquement dans certaines conditions de stress cellulaire (Jackson et al., 1995).

Le FGF1 est également un oncogène, surexprimé dans différents types de cancers (sein, prostate, colon, gliomes...) (Takahashi et al., 1990; Payson et al., 1993; La Rosa et al., 2001; Henriksson et al., 2011) et cette surexpression est associée à des résistances aux chimiothérapies et à un mauvais pronostic vital pour les patients (Smith et al., 2012; Slattery et al., 2013).

La protéine oncosuppressive p53 et ses voies de signalisation sont inhibées ou mutées dans plus de 50% des cancers humains. p53 agit principalement en tant que facteur de transcription et intervient dans un grand nombre de processus cellulaires comme l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, ou encore la réparation de l'ADN (Bieging and Attardi, 2012).

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, joue un rôle majeur au cours du développement et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Il existe deux voies principales de signalisation de l'apoptose : la voie extrinsèque, activée par les récepteurs à domaine de mort, et la voie intrinsèque qui est activée suite par exemple à des dommages à l'ADN et peut être médiée par p53 (Strasser et al., 1995; Fiandalo and Kyprianou, 2012). L'insensibilisation à l'apoptose est l'un des marqueurs majeurs des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2000).

Bien que le FGF1 soit rarement sécrété, ses voies de signalisation intracellulaires restent peu décrites. Notre équipe a donc entrepris d'étudier les interactions potentielles entre les voies de signalisation du FGF1 intracellulaire et de la protéine p53.

L'équipe a ainsi montré que dans des fibroblastes embryonnaires de rat (cellules REtsAF) et dans des cellules issues d'un phéochromocytome de rat (cellules PC12), le FGF1 intracellulaire inhibe l'apoptose dépendante de p53. Dans ces cellules, le FGF1 régule la

stabilité et les activités de facteur de transcription de la protéine p53. De plus, dans les cellules REtsAF, la protéine p53 réprime l'expression du gène *fgf1*, qui est donc une nouvelle cible transcriptionnelle de cet oncosuppresseur (Bouleau et al., 2005; Bouleau et al., 2007; Rodriguez-Enfedaque et al., 2009). Dans les cellules PC12, l'équipe a montré que le FGF1 a non seulement une activité anti-apoptotique mais également une activité neurotrophique puisqu'il induit leur différenciation neuronale et leur survie en absence de sérum.

L'étude menée dans les cellules PC12 a permis de mieux comprendre le mode d'action intracellulaire du FGF1. En effet, grâce à une forme mutante du FGF1 délétée de sa séquence NLS, l'équipe a pu montrer que la localisation nucléaire du FGF1 est essentielle à ses activités intracellulaires (neurotrophique et anti-apoptotique) dans les cellules PC12 (Rodriguez-Enfedaque et al., 2009).

Afin de progresser dans la caractérisation des mécanismes d'action du FGF1 intracellulaire, j'ai entrepris au cours de ma thèse d'étudier les activités intracellulaires de différentes formes mutantes du FGF1 dans les cellules PC12. Pour cela j'ai utilisé les formes mutantes FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D}.

Ces différentes formes mutantes du FGF1 ont été étudiées par plusieurs équipes qui se sont principalement intéressées à leurs activités extracellulaires. Le FGF1^{WT} extracellulaire est un facteur neurotrophique et mitogénique. La forme mutante FGF1^{K132E} présente des activités extracellulaires fortement réduites par rapport à celle du FGF1 sauvage (Burgess et al., 1990; Renaud et al., 1996; Klingenberg et al., 1999). La mutation K132E inhibe donc les activités extracellulaires du FGF1. Les formes FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D} présentent également une activité mitogénique réduite par rapport à celle du FGF1^{WT} (Klingenberg et al., 1999). Cependant les activités de différenciation et de survie cellulaires de ces deux formes mutantes n'ont jamais été étudiées.

Le but de mon étude a donc été de caractériser les activités neurotrophique et anti-apoptotique de ces différentes formes mutantes du FGF1 dans les cellules PC12 afin de progresser dans la compréhension du mode d'action intracellulaire du FGF1.

1 Localisation subcellulaire des différentes formes de FGF1

Les précédents travaux de l'équipe ont mis en évidence l'importance de la localisation nucléaire du FGF1 pour ses activités intracellulaires dans les cellules PC12. Nous avons donc étudié la localisation subcellulaire des formes FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D}. Nous avons montré que les formes mutantes du FGF1 sont présentes à la fois dans le cytosol et le

noyau des cellules PC12, et ce, de façon comparable à la forme sauvage. Les différentes mutations étudiées ne modifient pas la localisation subcellulaire du FGF1.

Les différentes équipes qui ont étudié les activités extracellulaires du FGF1 se sont également intéressées à sa localisation subcellulaire suite à son internalisation. En effet, le FGF1 peut, suite à sa liaison aux FGFRs, soit activer classiquement les voies de signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase (MAPK, PI3K/Akt etc.), soit être internalisé avec le récepteur. Suite à son internalisation, le FGF1 peut alors être transloqué dans le noyau (Imamura et al., 1990; Sorensen et al., 2006b). Il a été montré que lorsqu'elles sont ajoutées au milieu de culture de cellules NIH3T3, les formes mutantes FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} et FGF1^{S130E} (forme mutante qui mime la phosphorylation, comme le FGF1^{S130D}) interagissent avec les FGFRs et sont ensuite transloquées dans le noyau comme le FGF1^{WT} (Burgess et al., 1990; Klingenberg et al., 1998). Les mutations K132E, S130A et S130E du FGF1 ne semblent donc modifier ni son internalisation ni sa translocation nucléaire.

Une étude menée plus récemment a montré que le FGF1 internalisé est phosphorylé sur son résidu sérine 130 par la PKC δ au sein du compartiment nucléaire. Cette phosphorylation induirait l'export du FGF1 vers le cytosol où il serait dégradé (Wiedlocha et al., 2005). La phosphorylation du FGF1 internalisé jouerait donc un rôle sur son trafic nucléocytoplasmique. D'autre part, et contrairement aux études précédemment menées, les auteurs observent une différence de localisation subcellulaire entre les formes FGF1^{S130A} et FGF1^{S130E} internalisées : la première serait principalement nucléaire tandis que la seconde serait majoritairement cytosolique.

Nos résultats diffèrent de ceux présentés dans la plus récente de ces études. Celle-ci a été menée sur l'internalisation et la translocation nucléaires de formes recombinantes extracellulaires du FGF1, tandis que nous avons étudié la localisation subcellulaire de formes mutantes intracellulaires du FGF1. Les formes extracellulaires du FGF1 sont internalisées suite à leur liaison aux FGFRs. En revanche les formes intracellulaires du FGF1 sont transloquées dans le noyau indépendamment de leur interaction avec leurs récepteurs. Les mécanismes de translocation nucléaire mis en jeu dans ces deux cas peuvent donc différer et expliquer une apparente contradiction entre les résultats que nous avons obtenus et ceux précédemment publiés par l'équipe de Wiedlocha.

Ensuite, il faut noter que les formes mutantes étudiées par l'équipe de Wiedlocha diffèrent en partie des nôtres puisque nous avons choisi d'utiliser la mutation S130D afin de

mimer la phosphorylation du FGF1 tandis le groupe de Wiedlocha a choisi d'utiliser la forme S130E. Afin de vérifier si ces deux mutations ont bien le même effet sur la localisation subcellulaire du FGF1, nous pourrions étudier la localisation subcellulaire et les activités de cette forme mutante dans notre modèle d'étude, les cellules PC12.

2 Activités intracellulaires du FGF1^{K132E}

2.1 La mutation K132E inhibe l'activité neurotrophique du FGF1

Notre équipe a précédemment montré que le FGF1 intracellulaire induit la différenciation neuronale des cellules PC12. Celle-ci est caractérisée par des extensions neuritiques longues et ramifiées, marqueurs de la différenciation neuronale. Cette différenciation neuronale des cellules PC12 induite par le FGF1 est associée à la survie des cellules en absence de sérum, c'est ce qu'on appelle l'activité neurotrophique du FGF1. Les travaux précédemment menés par l'équipe ont montré que la délétion de la séquence de localisation nucléaire du FGF1 inhibe cette activité. La localisation nucléaire du FGF1 est donc nécessaire à son activité neurotrophique dans les cellules PC12.

La surexpression de la forme mutante FGF1^{K132E} dans les cellules PC12 ne permet ni la différenciation neuronale des cellules ni leur survie en absence de sérum, de façon comparable à la forme mutante délétée de la séquence NLS (FGF1^{ΔNLS}). Or, nous avons montré que la forme FGF1^{K132E} est localisée à la fois dans le cytosol et le noyau, contrairement à la forme FGF1^{ΔNLS} qui est strictement cytosolique. Nos résultats suggèrent donc que si la localisation nucléaire du FGF1 est nécessaire à son activité neurotrophique, elle n'est en revanche pas suffisante. L'activité neurotrophique du FGF1 intracellulaire serait régulée par des mécanismes nucléaires qui restent à caractériser.

Les activités extracellulaires de la forme mutante FGF1^{K132E} ont été étudiées par différentes équipes. Si cette forme mutante est capable d'interagir avec les récepteurs FGFRs, d'activer les MAPK et d'être transloquée dans le noyau comme le FGF1 sauvage, elle est en revanche incapable d'induire la différenciation neuronale des cellules PC12 (Renaud et al., 1996). Il semblerait donc que la forme FGF1^{K132E} n'ait aucune activité neurotrophique, qu'elle agisse de façon intracellulaire ou extracellulaire.

L'activité neurotrophique du FGF1 pourrait être régulée par des modifications post-traductionnelles du FGF1 comme la phosphorylation, l'ubiquitinylation ou encore la méthylation. Il a été montré que le résidu lysine 132 du FGF1 constitue un site de méthylation sur le FGF1 (Harper and Lobb, 1988). La forme mutante FGF1^{K132E}, qui ne présente pas d'activité de différenciation neuronale dans les cellules PC12, n'est pas méthylable. Cette modification post-traductionnelle pourrait donc être impliquée dans la régulation de l'activité de différenciation du FGF1 dans les cellules PC12. D'autre part, le résidu lysine 132 se trouve à proximité du résidu sérine 130, le site de phosphorylation du FGF1 par la PKC δ . Selon certaines études, la mutation K132E pourrait inhiber la phosphorylation du FGF1, inhibant son activité neurotrophique dans les cellules PC12.

Les seules modifications post-traductionnelles du FGF1 connues à ce jour sont les sites de méthylation (K132) et de phosphorylation (S130). Une étude par spectrométrie de masse du FGF1 pourrait permettre d'identifier les différentes modifications post-traductionnelles de ce facteur de croissance. En effet, celles-ci sont détectables grâce à cette technique car elles modifient la masse des acides aminés (Olsen and Mann, 2013). Nous pourrions alors, à l'aide de différentes formes mutantes, étudier le rôle de ces modifications post-traductionnelles sur la régulation des activités intracellulaires du FGF1.

La différenciation neuronale des cellules PC12 a principalement été étudiée suite à l'ajout dans le milieu extracellulaire de NGF (Nerve Growth Factor). Le NGF est un facteur de croissance qui exerce ses activités en se liant à son récepteur de haute affinité TrkA. Il a été montré que l'activation du récepteur TrkA par le NGF induit l'activation de la cascade des MAPK, ce qui conduit à l'activation par phosphorylation du facteur de transcription CREB (Sun et al., 2006). Le NGF induit également l'expression des facteurs c-fos et c-jun qui participent également à la régulation de la transcription de certains gènes et à la différenciation neuronale (Gizang-Ginsberg and Ziff, 1990; Dragunow et al., 2000). Le FGF1 intracellulaire pourrait, comme le NGF, induire l'activation du facteur de transcription CREB et l'expression des facteurs c-jun et c-fos. L'action du FGF1 sur ces facteurs pourrait être directe, *via* une interaction par exemple, soit indirecte, *via* l'inhibition des voies de signalisation permettant l'activation de ces facteurs. L'interaction directe entre le FGF1 et les protéines CREB, c-fos et c-jun suggérerait un rôle de facteur ou de co-facteur de transcription pour le FGF1. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions effectuer des expériences de co-immunoprécipitations avec les formes mutantes et sauvage du FGF1. Par exemple, la forme

mutante FGF1^{K132E} pourrait inhiber ces facteurs, bloquant ainsi la différenciation neuronale des cellules PC12.

2.2 La mutation K132E inhibe l'activité anti-apoptotique du FGF1

Le FGF1 intracellulaire présente, en plus de son activité neurotrophique, une activité anti-apoptotique dans les cellules PC12 suite à l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose par p53. La localisation nucléaire du FGF1 est également nécessaire à cette activité.

L'activité de la protéine p53 est régulée notamment par des modifications post-traductionnelles comme des ubiquitinations ou des phosphorylations (Lavin and Gueven, 2006; Olsson et al., 2007). L'un des marqueurs principaux de l'activation de la protéine p53 par l'ajout d'étoposide est la phosphorylation du résidu sérine 15. Une fois activée, la protéine p53 va réguler la transcription de nombreux gènes cibles et en particulier des gènes codant pour des protéines de la famille Bcl-2, impliquées dans la signalisation de la voie intrinsèque de l'apoptose. p53 va notamment induire la transactivation du gène codant pour la protéine PUMA, qui fait partie de la sous-famille des « BH3-only » (Nakano and Vousden, 2001). La protéine PUMA va participer à la relocalisation de la protéine Bax au niveau de la membrane externe mitochondriale, entraînant la dépolarisation et la perméabilisation des membranes mitochondriales. Des facteurs pro-apoptotiques sont alors libérés dans le cytosol, où ils permettent l'activation et le clivage des caspases-9 et -3, les protéines effectrices de l'apoptose. La phase finale de l'apoptose est caractérisée par une condensation de la cellule et du noyau et par une fragmentation de l'ADN.

Nous avons étudié l'effet du FGF1^{K132E} sur l'apoptose dépendante de p53. Nous avons tout d'abord analysé le taux de survie des différentes lignées cellulaires. Puis nous avons étudié différents marqueurs de l'apoptose par western blot : phosphorylation de la protéine p53, expression de la protéine pro-apoptotique PUMA, clivage de la caspase-3.

Le FGF1^{WT} induit une diminution de la phosphorylation de p53, de la trans-activation de PUMA et du clivage de la caspase-3. La diminution de ces différents marqueurs de l'apoptose est plus faible en présence du FGF1^{K132E} et du FGF1^{ΔNLS}. Nos résultats montrent que la localisation nucléaire du FGF1 est nécessaire mais insuffisante à son activité anti-apoptotique.

L'activité anti-apoptotique du FGF1 pourrait être régulée par différentes modifications post-traductionnelles, comme son activité neurotrophique. Le FGF1 pourrait également être impliqué dans des complexes protéiques participant à la régulation de l'apoptose, comme des complexes protéiques régulateurs de la transcription ou bien des complexes répresseurs de protéines pro-apoptotiques (activation des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2).

L'étude de ces complexes protéiques pourrait être réalisée par spectrométrie de masse suite à l'immunoprécipitation des différentes formes de FGF1.

3 Activités intracellulaires des formes FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D}

La première partie de notre étude a montré que la mutation K132E inhibe les activités neurotrophique et anti-apoptotique du FGF1 intracellulaire, comme le FGF1^{ΔNLS}. En revanche, la forme FGF1^{K132E} est localisée à la fois dans le cytosol et le noyau, contrairement au FGF1^{ΔNLS} qui est strictement cytosolique. La localisation nucléaire du FGF1 est nécessaire mais insuffisante à ses activités intracellulaires. Le FGF1 doit donc être impliqué dans un ou plusieurs événements nucléaires participant à la régulation de ses activités : modifications post-traductionnelles, implication dans des complexes protéiques régulateurs de la transcription, etc. Ces événements seraient modifiés par la mutation du résidu lysine 132.

Le FGF1 est phosphorylé dans le compartiment nucléaire par la PKCδ sur son résidu sérine 130 (Mascarelli et al., 1989; Wiedlocha et al., 2005). La mutation K132E, à proximité de ce résidu pourrait inhiber la phosphorylation du FGF1 et donc ses activités intracellulaires et nucléaires.

Afin de déterminer le rôle de la phosphorylation du FGF1 sur ses activités intracellulaires, nous avons étudié deux autres formes mutantes du FGF1, le FGF1^{S130A} et le FGF1^{S130D}. La mutation S130A inhibe la phosphorylation du FGF1, tandis que la mutation S130D mime une phosphorylation constitutive grâce à la charge négative apportée par l'acide aspartique en position 130.

3.1 Les formes mutantes FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D} induisent la différenciation des cellules PC12.

Comme pour le FGF1^{K132E}, nous avons étudié la formation d'extensions neuritiques longues et ramifiées en présence des formes FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D}. Nous n'avons observé aucune différence entre ces deux formes mutantes du FGF1 par comparaison avec la forme sauvage. Il semble donc que la phosphorylation du FGF1 ne soit pas impliquée dans la régulation de l'activité de différenciation du FGF1 dans les cellules PC12. Ces résultats suggèrent également que la mutation du résidu lysine 132 n'affecte pas la phosphorylation du FGF1. En effet, si la mutation K132E inhibait ou mimait la phosphorylation, le FGF1^{K132E} présenterait la même activité neurotrophique que le FGF1^{S130A} ou le FGF1^{S130D}, ce qui n'est pas le cas. En effet, la mutation K132E inhibe l'activité neurotrophique du FGF1 tandis que

les deux formes mutantes pour le site de phosphorylation présentent la même activité de différenciation neuronale que le FGF1^{WT}.

Si la phosphorylation du FGF1 ne semble pas impliquée dans la régulation de l'activité neurotrophique du FGF1, d'autres modifications post-traductionnelles pourraient jouer un rôle sur cette activité intracellulaire du FGF1.

3.2 Le FGF1^{S130A} présente une activité anti-apoptotique contrairement au FGF1^{S130D}.

Nous avons montré que la forme mutante FGF1^{S130A}, contrairement à la forme FGF1^{S130D}, présente une forte activité anti-apoptotique vis-à-vis de l'apoptose dépendante de p53 dans les cellules PC12. En présence de FGF1^{S130A} (dont la phosphorylation est inhibée), on observe une diminution de la phosphorylation de p53, de la trans-activation de PUMA et du clivage de la caspase-3, comme pour le FGF1 sauvage. A l'inverse, l'effet du FGF1^{S130D} (dont la phosphorylation est mimée) sur ces différents marqueurs de l'apoptose est fortement réduit par rapport à ce qui est observé pour le FGF1^{S130A}. Il semble donc que la phosphorylation du FGF1 inhibe partiellement ses activités intracellulaires. La phosphorylation du FGF1 diminue notamment son action sur les différents acteurs de la voie mitochondriale de l'apoptose, ce qui se traduit par une forte diminution de son activité anti-apoptotique.

Les études précédemment menées sur les activités extracellulaires du FGF1 ont permis de mettre en évidence le site de phosphorylation du FGF1, cible de la kinase PKC δ , ainsi que la localisation de cette phosphorylation, qui a lieu dans le noyau (Mascarelli et al., 1989; Wiedlocha et al., 2005). En revanche, le rôle de cette phosphorylation sur les activités intra- ou extracellulaires du FGF1 restait largement méconnu. Les études menées sur les activités extracellulaires de formes mutantes FGF1^{S130A} et FGF1^{S130E} (qui mime également la phosphorylation du FGF1) ont montré que ces deux formes sont capables d'interagir avec les FGFRs, d'induire la voie des MAPK et qu'elles présentent toutes deux une activité mitogénique comparable.

Nos résultats permettent donc pour la première fois de mettre en évidence le rôle régulateur de la phosphorylation du FGF1 sur son activité anti-apoptotique dans les cellules PC12. Ces résultats sont confirmés par une étude menée au sein de notre équipe sur les activités intracellulaires du FGF1 dans des cellules issues d'un neuroblastome humain, les cellules SH-SY5Y. Dans ces cellules, l'ajout d'étoposide induit l'apoptose dépendante de p53, et l'expression des formes FGF1^{WT} et FGF1^{S130A} inhibe cette apoptose contrairement à

l'expression de la forme FGF1^{S130D} (résultats non publiés). L'ensemble de ces résultats montre que dans deux modèles de cellules neuronales le FGF1 a une activité anti-apoptotique et que sa phosphorylation inhibe cette activité.

Toutefois, nos résultats ont été obtenus avec une forme mutante qui mime la phosphorylation du FGF1 et non pas avec une forme de FGF1 constitutivement phosphorylée. Il se peut donc que l'ajout de la charge négative en position 130 de FGF1 inhibe son activité anti-apoptotique indépendamment de sa phosphorylation. D'autre part, parmi les différentes formes de FGF1 étudiées, seule la forme FGF1^{S130A} présente la même activité anti-apoptotique que le FGF1^{WT}. En effet, la forme FGF1^{K132E} ne protège pas les cellules PC12 de l'apoptose dépendante de p53, comme la forme FGF1^{S130D}. Les mutations K132E et S130D inhibent toutes les deux l'activité anti-apoptotique du FGF1. Ces mutations amènent chacune une charge négative au niveau du domaine C-terminal du FGF1. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le domaine C-terminal joue un rôle important dans la régulation de l'activité anti-apoptotique du FGF1. L'ajout d'une charge négative au niveau de ce domaine C-terminal pourrait modifier la structure du FGF1, ses interactions avec d'éventuels partenaires nucléaires ou bien ses activités potentielles de co-facteur de transcription.

L'étude des activités extracellulaires de différentes formes mutantes du FGF1 semble confirmer cette hypothèse. Le FGF1^{WT} extracellulaire, ajouté au milieu de culture des cellules NIH3T3 est transloqué dans le cytosol et le noyau des cellules et a une activité mitogénique. La forme mutante FGF1^{K132E} extracellulaire présente une activité mitogénique fortement réduite par rapport au FGF1^{WT}. En revanche, la forme mutante FGF1^{K132A}, qui inhibe la méthylation du FGF1 sans ajouter de charge négative, possède une activité mitogénique comparable à celle du FGF1^{WT} (Klingenberg et al., 1999). Les deux formes mutantes FGF1^{K132E} et FGF1^{K132A} sont transloquées dans le cytosol et le noyau de façon comparable. Il semblerait donc que l'ajout d'une charge négative au niveau du domaine C-terminal du FGF1 inhibe ses activités extra- et intracellulaires. Des modifications post-traductionnelles du domaine C-terminal du FGF1 pourraient donc être impliquées dans la régulation des activités de ce facteur de croissance.

Afin de confirmer cette hypothèse, une étude de l'activité anti-apoptotique du FGF1 intracellulaire pourrait être réalisée avec la forme mutante FGF1^{K132A}. Celle-ci modifierait le domaine C-terminal sans ajout de charge négative. Les résultats de cette étude devraient permettre de déterminer le rôle exact des modifications post-traductionnelles sur l'activité

anti-apoptotique du FGF1 intracellulaire, ainsi que l'importance du domaine C-terminal dans la régulation des activités intracellulaires du FGF1.

4 Interaction des différentes formes de FGF1 avec la protéine p53

Notre équipe a montré pour la première fois une interaction entre la protéine p53 et le FGF1 intracellulaire dans les cellules PC12 par immunoprécipitation. La forme mutante FGF1^{ΔNLS} n'est pas co-immunoprécipitée avec p53. Dans les cellules PC12, l'activité anti-apoptotique du FGF1^{WT} se traduit par une diminution de l'activation de p53. L'interaction entre p53 et le FGF1 pourrait participer à cette inhibition et pourrait également être impliquée dans la régulation des activités transcriptionnelles de p53.

Afin de mieux comprendre le rôle de l'interaction entre p53 et le FGF1, nous avons entrepris d'étudier l'interaction entre p53 et les formes mutantes FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D}. Les résultats obtenus restent préliminaires et doivent être confirmés. Toutefois les formes FGF1^{K132E} et FGF1^{S130A} interagiraient avec la protéine p53, contrairement à la forme FGF1^{S130D}.

Les différentes formes de FGF1 présentant une activité anti-apoptotique interagissent avec la protéine p53 (FGF1^{WT}, FGF1^{S130A}). La forme mutante FGF1^{K132E}, qui ne présente pas d'activité anti-apoptotique, interagit également avec p53, contrairement aux autres formes FGF1^{S130D} et FGF1^{ΔNLS} qui ne présentent également aucune activité anti-apoptotique. Ces données suggèrent que l'interaction entre p53 et le FGF1 n'est pas suffisante pour expliquer l'activité anti-apoptotique du FGF1 intracellulaire.

Ces résultats nous permettent d'émettre plusieurs hypothèses :

- p53 et le FGF1 font partie d'un large complexe protéique impliqué dans la régulation de l'expression de gènes codant pour des protéines régulatrices de l'apoptose,
- le FGF1 peut faire partie de différents complexes protéiques régulateurs de la cascade apoptotique, impliqués ou non dans la régulation de la transcription.

4.1 Implication du FGF1 dans un complexe protéique régulateur de la transcription.

La protéine p53 est un facteur de transcription régulant un grand nombre de mécanismes cellulaires. C'est notamment un activateur majeur de la voie intrinsèque de l'apoptose. La protéine p53 va principalement induire l'apoptose en régulant la transcription de nombreux gènes cibles et notamment de gènes codant pour des protéines de la famille Bcl-2. En effet, p53 active la transcription de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques comme

PUMA et réprime l'expression de gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2.

L'activité transcriptionnelle de p53 est régulée par des modifications post-traductionnelles (phosphorylations, ubiquitylations...) ou par des interactions avec différents partenaires protéiques comme MDM2 (qui induit sa dégradation) ou CBP/p300 (protéine co-activatrice de la transcription).

La protéine p53 pourrait donc interagir avec le FGF1 au sein d'un complexe protéique plus large. Une modification des partenaires protéiques présents au sein de complexe pourrait participer à la diminution de l'activité transcriptionnelle de p53 et donc à l'inhibition de l'apoptose par le FGF1.

Le complexe protéique p53/FGF1 pourrait ainsi interagir avec des protéines impliquées dans la transcription comme la protéine CBP/p300. Cette protéine est un co-activateur transcriptionnel de p53 (Gu et al., 1997; Grossman, 2001). Il a également été montré que la protéine CBP/p300 peut interagir avec le récepteur FGFR1 nucléarisé, permettant au FGFR1 de participer à la régulation du gène codant pour le FGF2 (Peng et al., 2001; Fang et al., 2005). La nucléarisation des récepteurs aux FGFs suppose une internalisation préalable, le plus souvent suite à la liaison de leurs ligands comme le FGF1. Il se pourrait donc que le FGF1, un facteur de croissance intracellulaire et nucléaire soit également capable d'interagir avec la protéine CBP/p300. Cette interaction inhiberait l'activité co-activatrice de cette dernière, induisant une diminution de l'activité transcriptionnelle de p53.

De façon plus générale, on peut envisager que le FGF1 ait une activité de facteur ou de co-facteur de transcription de façon dépendante ou non de son interaction avec p53. En effet, des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe semblent montrer que le FGF1 est localisé dans le même sous-compartiment nucléaire que certains facteurs de transcription comme le TFIID et qu'il peut interagir avec la forme phosphorylée de la protéine p53 (phosphorylation de la sérine 15, marqueur de l'activation transcriptionnelle de p53) (résultats non publiés). Ces deux résultats sont à confirmer, toutefois, ils semblent indiquer que le FGF1 pourrait jouer un rôle actif dans la régulation de la transcription, en association avec p53 ou d'autres facteurs et co-facteurs de transcription.

Afin de déterminer le potentiel rôle de facteur ou co-facteur de transcription du FGF1, une étude est actuellement en cours dans notre équipe. Différentes formes mutantes de FGF1 taguées ont été générées et transfectées de façon stable dans les cellules PC12. Ces formes possèdent un tag V5/Histidine qui permet leur immunoprécipitation spécifique. Des expériences sont en cours afin de déterminer si le FGF1 interagit (directement ou non) avec la

chromatine. Si c'est le cas, des expériences de ChIP-Seq seront menées afin de déterminer quels sont les gènes cibles régulés ou co-régulés par le FGF1.

4.2 Implication du FGF1 dans des complexes protéiques régulateurs de la voie de signalisation de l'apoptose dépendante de p53.

Le FGF1 pourrait participer à la régulation de la signalisation de l'apoptose dépendante de p53 en régulant la stabilité de p53 ou sa localisation subcellulaire. Pour cela, le FGF1 pourrait interagir avec différents partenaires protéiques comme par exemple des kinases.

Le FGF1 pourrait ainsi réguler l'activation et la stabilité de p53 *via* son interaction avec la kinase CK2. Il a été montré que le FGF1 interagit avec la protéine CK2 et que cette interaction régule l'activité mitogénique du FGF1. Mais cette interaction pourrait également modifier la phosphorylation de p53 par la CK2. En effet, suite à des dommages à l'ADN, la CK2 peut phosphoryler p53 sur son résidu sérine 392 (Keller et al., 2001) localisé dans le domaine régulateur situé en C-terminal de p53. La phosphorylation de ce résidu favorise la liaison de p53 à l'ADN ainsi que son activité transcriptionnelle (Hupp et al., 1992; Keller and Lu, 2002). L'interaction entre le FGF1 et la kinase CK2 pourrait diminuer l'activité de cette dernière et donc la phosphorylation de la sérine 392 de p53, ce qui inhiberait en partie les activités transcriptionnelles de p53. Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions doser l'activité de la CK2, et étudier la phosphorylation de la sérine 392 de p53 en présence ou en absence des différentes formes de FGF1.

La localisation subcellulaire de p53 participe également à la régulation de ses activités. Suite à son activation, la protéine p53 est principalement relocalisée dans le compartiment nucléaire où elle va exercer ses activités de facteur de transcription. Il a été montré que la protéine RSK2 interagit avec la protéine p53 phosphorylée (sur son résidu sérine 15). L'interaction entre ces deux protéines induit une accumulation nucléaire de p53. RSK2 participe également à la régulation de l'activité transcriptionnelle de p53 (Cho et al., 2005). La protéine RSK2 a également pour partenaire protéique le FGF2 intracellulaire de faible poids moléculaire (Soulet et al., 2005). Le FGF2 fait partie de la même sous-famille que le FGF1 et leurs activités intracellulaires sont souvent comparables, en particulier leurs activités neurotrophique, mitogénique et tumorigène. On peut donc émettre l'hypothèse que le FGF1 pourrait également interagir avec la protéine RSK2, inhibant l'interaction entre p53 et RSK2 et éventuellement la nucléarisation de p53 et ses activités transcriptionnelles.

L'étude des partenaires protéiques du FGF1 par spectrométrie de masse permettra de progresser dans la compréhension de son mode d'action intracellulaire.

5 Conclusions et perspectives

Le FGF1 est un facteur de croissance atypique, majoritairement intracellulaire et nucléaire. Il induit la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires. Il est également impliqué dans les processus de tumorigenèse et peut conférer aux tumeurs le surexprimant une résistance aux chimiothérapies.

Notre équipe travaille depuis plusieurs années à la caractérisation des voies de signalisation du FGF1 intracellulaire. L'équipe a ainsi montré que le FGF1 intracellulaire a une activité anti-apoptotique dans plusieurs modèle cellulaires : cellules REtsAF, PC12 ou SH-SY5Y suite à l'induction de l'apoptose dépendante de p53. Dans les cellules PC12, un modèle d'étude de la différenciation neuronale, le FGF1 présente également une activité neurotrophique.

A l'aide de différentes formes mutantes du FGF1, j'ai cherché à mieux caractériser ses activités neurotrophique et anti-apoptotique dans les cellules PC12. J'ai ainsi pu montrer que :

- La phosphorylation du FGF1 inhibe son activité anti-apoptotique, mais ne modifie pas son activité de différenciation cellulaire.
- Le domaine C-terminal du FGF1, et ses éventuelles modifications post-traductionnelles, sont importants pour la régulation de ses activités intracellulaires.

Nos résultats mettent donc en évidence pour la première fois le rôle régulateur de la phosphorylation du FGF1 sur ses activités intracellulaires. Ils mettent également en évidence le rôle important que joue le domaine C-terminal du FGF1 dans la régulation de ces mêmes activités. Les études précédemment menées dans différentes équipes ont montré que ce domaine est important pour l'interaction entre le FGF1 extracellulaire et les HSPG. En revanche, l'implication de ce domaine dans la régulation des activités du FGF1 intracellulaire n'avait pas été étudiée auparavant.

Afin de mieux comprendre le rôle du domaine C-terminal du FGF1 dans la régulation de ses activités intracellulaires, nous envisageons d'étudier différentes formes du FGF1 mutées au niveau de ce domaine. Nous pourrions ainsi étudier les activités de différentes formes de FGF1 dont le domaine C-terminal serait plus ou moins tronqué afin de délimiter plus précisément la région impliquée dans la régulation des activités du FGF1. Nous pourrions

également étudier différentes formes du FGF1 mutées sur différents résidus du domaine C-terminal. L'activité de ce domaine semble étroitement liée aux modifications post-traductionnelles déjà décrites du FGF1 (phosphorylation de la sérine 130 ; méthylation de la lysine 132). Toutefois, le domaine C-terminal du FGF1 pourrait subir d'autres modifications post-traductionnelles comme des acétylations, des ubiquitylations ou encore des sumoylations. Nous envisageons donc de réaliser des expériences de spectrométrie de masse selon la technique décrite par Olsen et Mann, ce qui nous permettrait d'identifier d'éventuelles modifications post-traductionnelles susceptibles de réguler les activités intracellulaires du FGF1.

D'autre part, mes travaux préliminaires sur les interactions entre la protéine p53 et les différentes formes mutantes de FGF1 suggèrent que le FGF1 pourrait soit faire partie de complexes protéiques régulateurs de la transcription soit interagir avec des protéines régulatrices de l'activité de p53.

L'étude des interactions entre p53 et le FGF1 a été réalisée par immunoprécipitation. Malheureusement, de nombreux problèmes techniques ont perturbé cette étude. Notre objectif principal a été d'améliorer la spécificité des co-immunoprécipitations et la détection des protéines par western blot. Afin d'optimiser notre technique d'immunoprécipitation, des vecteurs permettant l'expression de différentes formes tagguées (tag V5/His) du FGF1 ont été générés au laboratoire. Des cellules PC12 ont été transfectées de façon stable avec ces différents vecteurs. Les lignées ainsi obtenues nous permettront de mieux comprendre le mode d'action du FGF1 au sein de la cellule et plus particulièrement au sein du compartiment nucléaire. En effet, nous l'avons évoqué, l'une de nos hypothèses est que le FGF1 est impliqué dans la régulation de la transcription soit en tant que facteur de transcription, indépendamment ou non de la protéine p53, soit en tant que co-facteur de transcription, au sein de larges complexes protéiques.

Afin de tester cette hypothèse, nous envisageons tout d'abord de confirmer les interactions observées entre les différentes formes mutantes de FGF1 et la protéine p53 grâce à des immunoprécipitations des protéines FGF1 tagguées (sauvage ou mutantes). En effet, nous avons jusqu'à présent étudié ces interactions grâce à des immunoprécipitations de la protéine p53. L'immunoprécipitation des différentes formes de FGF1 *via* leur tag devrait nous permettre de réduire considérablement les interactions non spécifiques observées jusqu'à présent.

Nous chercherons également à déterminer si le FGF1 peut jouer un rôle de facteur ou de co-facteur de transcription grâce à des expériences de ChIP-Seq. L'activité anti-apoptotique du FGF1 dans les cellules PC12 se traduit par une diminution de la transactivation de la protéine pro-apoptotique PUMA, codée par un gène-cible de p53. Nous envisageons donc que le FGF1, s'il a une activité de facteur ou de co-facteur de transcription, participe à la répression transcriptionnelle de certains gènes-cibles de p53, et notamment ceux codant pour des protéines pro-apoptotiques comme Noxa et PUMA ou bien ceux codant pour des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire comme p21 ou 14-3-3 σ . Mais le FGF1 pourrait également réguler et activer la transcription de gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques comme des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ou des protéines de la famille des IAPs.

Enfin, nous essaierons d'identifier de nouveaux partenaires protéiques du FGF1 par spectrométrie de masse sur les complexes obtenus après immunoprécipitation. Nous envisageons que le FGF1 puisse interagir avec des protéines impliquées dans la régulation de la transcription comme CBP/p300 ou TFIID. Mais il pourrait également former des complexes protéiques avec différents régulateurs de la protéine p53 comme les kinases ATM, ATR ou CK2.

L'ensemble de ces travaux permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'action impliqués dans l'activité anti-apoptotique du FGF1 et de progresser dans la caractérisation d'autres activités du FGF1 intracellulaire comme son activité de prolifération cellulaire et son implication dans les mécanismes de tumorigenèse et de résistance aux chimiothérapies. En effet, de récentes études ont montré le rôle oncogénique du FGF1 dans différents types de cancers, et notamment dans certains cancers des ovaires. Lorsqu'il est surexprimé, le FGF1 permet aux cellules issues de cancers des ovaires de survivre à la mort cellulaire induite par des dérivés du platine utilisés en chimiothérapie. Mes travaux de thèse ont permis de mieux caractériser l'activité anti-apoptotique du FGF1 intracellulaire. Ces données pourraient également permettre de progresser dans la caractérisation de l'activité oncogénique du FGF1 dans des modèles cellulaires issus de cancers des ovaires. Ce projet de recherche vient d'être initié dans notre équipe.

Bibliographie

- Abraham JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman J, Hjerrild KA, Gospodarowicz D, Fiddes JC. 1986a. Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233:545-548.
- Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J, Gospodarowicz D, Fiddes JC. 1986b. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J* 5:2523-2528.
- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9:423-432.
- Achanta G, Huang P. 2004. Role of p53 in sensing oxidative DNA damage in response to reactive oxygen species-generating agents. *Cancer Res* 64:6233-6239.
- Adimoolam S, Ford JM. 2002. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12985-12990.
- Afshari CA, Nichols MA, Xiong Y, Mudryj M. 1996. A role for a p21-E2F interaction during senescence arrest of normal human fibroblasts. *Cell Growth Differ* 7:979-988.
- Alam KY, Frostholm A, Hackshaw KV, Evans JE, Rotter A, Chiu IM. 1996. Characterization of the 1B promoter of fibroblast growth factor 1 and its expression in the adult and developing mouse brain. *J Biol Chem* 271:30263-30271.
- Alterio J, Courtois Y, Robelin J, Bechet D, Martelly I. 1990. Acidic and basic fibroblast growth factor mRNAs are expressed by skeletal muscle satellite cells. *Biochem Biophys Res Commun* 166:1205-1212.
- Annis MG, Soucie EL, Dlugosz PJ, Cruz-Aguado JA, Penn LZ, Leber B, Andrews DW. 2005. Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J* 24:2096-2103.
- Antoine M, Reimers K, Dickson C, Kiefer P. 1997. Fibroblast growth factor 3, a protein with dual subcellular localization, is targeted to the nucleus and nucleolus by the concerted action of two nuclear localization signals and a nucleolar retention signal. *J Biol Chem* 272:29475-29481.
- Antoine M, Reimers K, Wirz W, Gressner AM, Muller R, Kiefer P. 2005. Fibroblast growth factor 3, a protein with a dual subcellular fate, is interacting with human ribosomal protein S2. *Biochem Biophys Res Commun* 338:1248-1255.
- Araki M, Suzuki H, Layer P. 2007. Differential enhancement of neural and photoreceptor cell differentiation of cultured pineal cells by FGF-1, IGF-1, and EGF. *Dev Neurobiol* 67:1641-1654.
- Arese M, Chen Y, Florkiewicz RZ, Gualandris A, Shen B, Rifkin DB. 1999. Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals. *Mol Biol Cell* 10:1429-1444.
- Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, Heath JK, Lonai P. 1998. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5082-5087.
- Armelin HA. 1973. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:2702-2706.
- Arnaud E, Touriol C, Boutonnet C, Gensac MC, Vagner S, Prats H, Prats AC. 1999. A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. *Mol Cell Biol* 19:505-514.
- Bailly K, Soulet F, Leroy D, Amalric F, Bouche G. 2000. Uncoupling of cell proliferation and differentiation activities of basic fibroblast growth factor. *FASEB J* 14:333-344.
- Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. 1990. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249:912-915.
- Bakhanashvili M. 2001. Exonucleolytic proofreading by p53 protein. *Eur J Biochem* 268:2047-2054.

- Bakhanashvili M, Hizi A, Rahav G. 2010. The interaction of p53 with 3'-terminal mismatched DNA. *Cell Cycle* 9:1380-1389.
- Baldin V, Roman AM, Bosc-Bierne I, Amalric F, Bouche G. 1990. Translocation of bFGF to the nucleus is G1 phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells. *EMBO J* 9:1511-1517.
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281:1674-1677.
- Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W. 1993. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73:431-445.
- Bargonetti J, Manfredi JJ, Chen X, Marshak DR, Prives C. 1993. A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev* 7:2565-2574.
- Bergeaud M, Mathieu L, Guillaume A, Moll UM, Mignotte B, Le Floch N, Vayssiere JL, Rincheval V. 2013. Mitochondrial p53 mediates a transcription-independent regulation of cell respiration and interacts with the mitochondrial F(1)F0-ATP synthase. *Cell Cycle* 12:2781-2793.
- Berger W, Setinek U, Mohr T, Kindas-Mugge I, Vetterlein M, Dekan G, Eckersberger F, Caldas C, Micksche M. 1999. Evidence for a role of FGF-2 and FGF receptors in the proliferation of non-small cell lung cancer cells. *Int J Cancer* 83:415-423.
- Bernett MJ, Somasundaram T, Blaber M. 2004. An atomic resolution structure for human fibroblast growth factor 1. *Proteins* 57:626-634.
- Bieging KT, Attardi LD. 2012. Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends Cell Biol* 22:97-106.
- Bikfalvi A, Dupuy E, Inyang AL, Fayein N, Leseche G, Courtois Y, Tobelem G. 1989. Binding, internalization, and degradation of basic fibroblast growth factor in human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 181:75-84.
- Birrer MJ, Johnson ME, Hao K, Wong KK, Park DC, Bell A, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC. 2007. Whole genome oligonucleotide-based array comparative genomic hybridization analysis identified fibroblast growth factor 1 as a prognostic marker for advanced-stage serous ovarian adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 25:2281-2287.
- Blanquet PR, Patte C, Fayein N, Courtois Y. 1989. Identification and isolation from bovine epithelial lens cells of two basic fibroblast growth factor receptors that possess bFGF-enhanced phosphorylation activities. *Biochem Biophys Res Commun* 160:1124-1131.
- Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270:7795-7798.
- Bonnet H, Filhol O, Truchet I, Brethenou P, Cochet C, Amalric F, Bouche G. 1996. Fibroblast growth factor-2 binds to the regulatory beta subunit of CK2 and directly stimulates CK2 activity toward nucleolin. *J Biol Chem* 271:24781-24787.
- Borner C. 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39:615-647.
- Bossard C, Laurell H, Van den Berghe L, Meunier S, Zanibellato C, Prats H. 2003. Translokine is an intracellular mediator of FGF-2 trafficking. *Nat Cell Biol* 5:433-439.
- Bouche G, Gas N, Prats H, Baldin V, Tauber JP, Teissie J, Amalric F. 1987. Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0---G1 transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:6770-6774.

- Bouleau S, Grimal H, Rincheval V, Godefroy N, Mignotte B, Vayssiere JL, Renaud F. 2005. FGF1 inhibits p53-dependent apoptosis and cell cycle arrest via an intracrine pathway. *Oncogene* 24:7839-7849.
- Bouleau S, Parvu-Ferecatu I, Rodriguez-Enfedaque A, Rincheval V, Grimal H, Mignotte B, Vayssiere JL, Renaud F. 2007. Fibroblast Growth Factor 1 inhibits p53-dependent apoptosis in PC12 cells. *Apoptosis* 12:1377-1387.
- Bredel M, Pollack IF, Campbell JW, Hamilton RL. 1997. Basic fibroblast growth factor expression as a predictor of prognosis in pediatric high-grade gliomas. *Clin Cancer Res* 3:2157-2164.
- Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 11:3155-3162.
- Bryckaert M, Guillonnet X, Hecquet C, Courtois Y, Mascarelli F. 1999. Both FGF1 and bcl-x synthesis are necessary for the reduction of apoptosis in retinal pigmented epithelial cells by FGF2: role of the extracellular signal-regulated kinase 2. *Oncogene* 18:7584-7593.
- Bugler B, Amalric F, Prats H. 1991. Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biol* 11:573-577.
- Bugra K, Hicks D. 1997. Acidic and basic fibroblast growth factor messenger RNA and protein show increased expression in adult compared to developing normal and dystrophic rat retina. *J Mol Neurosci* 9:13-25.
- Bugra K, Oliver L, Jacquemin E, Laurent M, Courtois Y, Hicks D. 1993. Acidic fibroblast growth factor is expressed abundantly by photoreceptors within the developing and mature rat retina. *Eur J Neurosci* 5:1586-1595.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282:1497-1501.
- Burgess WH, Mehlman T, Marshak DR, Fraser BA, Maciag T. 1986. Structural evidence that endothelial cell growth factor beta is the precursor of both endothelial cell growth factor alpha and acidic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7216-7220.
- Burgess WH, Shaheen AM, Ravera M, Jaye M, Donohue PJ, Winkles JA. 1990. Possible dissociation of the heparin-binding and mitogenic activities of heparin-binding (acidic fibroblast) growth factor-1 from its receptor-binding activities by site-directed mutagenesis of a single lysine residue. *J Cell Biol* 111:2129-2138.
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. 1998. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281:1677-1679.
- Cao Y, Ekstrom M, Pettersson RF. 1993. Characterization of the nuclear translocation of acidic fibroblast growth factor. *J Cell Sci* 104 (Pt 1):77-87.
- Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Meflah K, Vallette FM, Juin P. 2004. The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell* 16:807-818.
- Casciola-Rosen LA, Anhalt GJ, Rosen A. 1995. DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J Exp Med* 182:1625-1634.
- Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG. 1997. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 138:1379-1394.
- Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD. 1999. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13777-13782.

- Chen J, Marechal V, Levine AJ. 1993. Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* 13:4107-4114.
- Chen J, Sadowski I. 2005. Identification of the mismatch repair genes PMS2 and MLH1 as p53 target genes by using serial analysis of binding elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4813-4818.
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17:393-403.
- Chi YH, Kumar TK, Kathir KM, Lin DH, Zhu G, Chiu IM, Yu C. 2002. Investigation of the structural stability of the human acidic fibroblast growth factor by hydrogen-deuterium exchange. *Biochemistry* 41:15350-15359.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81:505-512.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303:1010-1014.
- Chiu IM, Touhalisky K, Baran C. 2001. Multiple controlling mechanisms of FGF1 gene expression through multiple tissue-specific promoters. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 70:155-174.
- Cho YY, He Z, Zhang Y, Choi HS, Zhu F, Choi BY, Kang BS, Ma WY, Bode AM, Dong Z. 2005. The p53 protein is a novel substrate of ribosomal S6 kinase 2 and a critical intermediary for ribosomal S6 kinase 2 and histone H3 interaction. *Cancer Res* 65:3596-3603.
- Choi JH, Ryu SH, Suh PG. 2007. On/off-regulation of phospholipase C-gamma 1-mediated signal transduction. *Adv Enzyme Regul* 47:104-116.
- Chotani MA, Chiu IM. 1997. Differential regulation of human fibroblast growth factor 1 transcripts provides a distinct mechanism of cell-specific growth factor expression. *Cell Growth Differ* 8:999-1013.
- Chotani MA, Touhalisky K, Chiu IM. 2000. The small GTPases Ras, Rac, and Cdc42 transcriptionally regulate expression of human fibroblast growth factor 1. *J Biol Chem* 275:30432-30438.
- Chu CL, Goerges AL, Nugent MA. 2005. Identification of common and specific growth factor binding sites in heparan sulfate proteoglycans. *Biochemistry* 44:12203-12213.
- Citores L, Khnykin D, Sorensen V, Wesche J, Klingenberg O, Wiedlocha A, Olsnes S. 2001. Modulation of intracellular transport of acidic fibroblast growth factor by mutations in the cytoplasmic receptor domain. *J Cell Sci* 114:1677-1689.
- Citores L, Wesche J, Kolpakova E, Olsnes S. 1999. Uptake and intracellular transport of acidic fibroblast growth factor: evidence for free and cytoskeleton-anchored fibroblast growth factor receptors. *Mol Biol Cell* 10:3835-3848.
- Claus P, Doring F, Gringel S, Muller-Ostermeyer F, Fuhrott J, Kraft T, Grothe C. 2003. Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein. *J Biol Chem* 278:479-485.
- Coope RC, Browne PJ, Yiangou C, Bansal GS, Walters J, Groome N, Shousha S, Johnston CL, Coombes RC, Gomm JJ. 1997. The location of acidic fibroblast growth factor in the breast is dependent on the activity of proteases present in breast cancer tissue. *Br J Cancer* 75:1621-1630.
- Cote J, Ruiz-Carrillo A. 1993. Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* 261:765-769.
- Craig A, Scott M, Burch L, Smith G, Ball K, Hupp T. 2003. Allosteric effects mediate CHK2 phosphorylation of the p53 transactivation domain. *EMBO Rep* 4:787-792.

- Crook NE, Clem RJ, Miller LK. 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 67:2168-2174.
- Cuevas P, Carceller F, Gimenez-Gallego G. 1995. Acidic fibroblast growth factor prevents post-axotomy neuronal death of the newborn rat facial nerve. *Neurosci Lett* 197:183-186.
- Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. 2005. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:233-247.
- Dang CV, Lee WM. 1989. Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J Biol Chem* 264:18019-18023.
- Danial NN. 2007. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res* 13:7254-7263.
- Davis MG, Zhou M, Ali S, Coffin JD, Doetschman T, Dorn GW, 2nd. 1997. Intracrine and autocrine effects of basic fibroblast growth factor in vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 29:1061-1072.
- Dawson R, Muller L, Dehner A, Klein C, Kessler H, Buchner J. 2003. The N-terminal domain of p53 is natively unfolded. *J Mol Biol* 332:1131-1141.
- DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. 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* 76:2420-2424.
- Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. 1996. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84:911-921.
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC. 1999. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144:891-901.
- Desire L, Courtois Y, Jeanny JC. 1998. Suppression of fibroblast growth factors 1 and 2 by antisense oligonucleotides in embryonic chick retinal cells in vitro inhibits neuronal differentiation and survival. *Exp Cell Res* 241:210-221.
- Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. 1999. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 18:5242-5251.
- Deveraux QL, Reed JC. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239-252.
- Di Serio C, Doria L, Pellerito S, Prudovsky I, Micucci I, Massi D, Landriscina M, Marchionni N, Masotti G, Tarantini F. 2008. The release of fibroblast growth factor-1 from melanoma cells requires copper ions and is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt intracellular signaling pathway. *Cancer Lett* 267:67-74.
- Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, Schaller M, Raju U, Milas L, Chen DJ, Kehlbach R, Rodemann HP. 2005. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280:31182-31189.
- Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Du N, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Baverel F, Pecheux C, Le Tessier D, Cruaud C, Delpech M, Speleman F, Vermeulen S, Amalfitano A, Bachelot Y, Bouchard P, Cabrol S, Carel JC, Delemarre-van de Waal H, Goulet-Salmon B, Kottler ML, Richard O, Sanchez-Franco F, Saura R, Young J, Petit C, Hardelin JP. 2003. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 33:463-465.
- Domingues I, Rino J, Demmers JA, de Lanerolle P, Santos SC. 2011. VEGFR2 translocates to the nucleus to regulate its own transcription. *PLoS One* 6:e25668.

- Donato NJ, Perez M. 1998. Tumor necrosis factor-induced apoptosis stimulates p53 accumulation and p21WAF1 proteolysis in ME-180 cells. *J Biol Chem* 273:5067-5072.
- Dorey K, Amaya E. 2010. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development* 137:3731-3742.
- Dorkin TJ, Robinson MC, Marsh C, Neal DE, Leung HY. 1999. aFGF immunoreactivity in prostate cancer and its co-localization with bFGF and FGF8. *J Pathol* 189:564-569.
- Dover K, Solinas S, D'Angelo E, Goldfarb M. 2010. Long-term inactivation particle for voltage-gated sodium channels. *J Physiol* 588:3695-3711.
- Dragunow M, Xu R, Walton M, Woodgate A, Lawlor P, MacGibbon GA, Young D, Gibbons H, Lipski J, Muravlev A, Pearson A, During M. 2000. c-Jun promotes neurite outgrowth and survival in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 83:20-33.
- Dreyfuss JL, Regatieri CV, Jarrouge TR, Cavalheiro RP, Sampaio LO, Nader HB. 2009. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc* 81:409-429.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
- E G, Cao Y, Bhattacharya S, Dutta S, Wang E, Mukhopadhyay D. 2012. Endogenous vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) maintains endothelial cell homeostasis by regulating VEGF receptor-2 transcription. *J Biol Chem* 287:3029-3041.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383-424.
- Eckenstein F, Woodward WR, Nishi R. 1991a. Differential localization and possible functions of aFGF and bFGF in the central and peripheral nervous systems. *Ann N Y Acad Sci* 638:348-360.
- Eckenstein FP, Shipley GD, Nishi R. 1991b. Acidic and basic fibroblast growth factors in the nervous system: distribution and differential alteration of levels after injury of central versus peripheral nerve. *J Neurosci* 11:412-419.
- Eckhart L, Ballaun C, Hermann M, VandeBerg JL, Sipos W, Uthman A, Fischer H, Tschachler E. 2008. Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Mol Biol Evol* 25:831-841.
- el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, et al. 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54:1169-1174.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825.
- El Yazidi I, Renaud F, Laurent M, Courtois Y, Boilly-Marer Y. 1998. Production and oestrogen regulation of FGF1 in normal and cancer breast cells. *Biochim Biophys Acta* 1403:127-140.
- Elde R, Cao YH, Cintra A, Brelje TC, Pelto-Huikko M, Junttila T, Fuxe K, Pettersson RF, Hokfelt T. 1991. Prominent expression of acidic fibroblast growth factor in motor and sensory neurons. *Neuron* 7:349-364.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.
- Engelmann GL, Dionne CA, Jaye MC. 1993. Acidic fibroblast growth factor and heart development. Role in myocyte proliferation and capillary angiogenesis. *Circ Res* 72:7-19.

- Entesarian M, Dahlqvist J, Shashi V, Stanley CS, Falahat B, Reardon W, Dahl N. 2007. FGF10 missense mutations in aplasia of lacrimal and salivary glands (ALSG). *Eur J Hum Genet* 15:379-382.
- Esch F, Ueno N, Baird A, Hill F, Denoroy L, Ling N, Gospodarowicz D, Guillemin R. 1985. Primary structure of bovine brain acidic fibroblast growth factor (FGF). *Biochem Biophys Res Commun* 133:554-562.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20:929-935.
- Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, Mignotte B. 2012. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 942:157-183.
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:139-149.
- Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, Jacobson-Dickman EE, Eliseenkova AV, Ma J, Dwyer A, Quinton R, Na S, Hall JE, Huot C, Alois N, Pearce SH, Cole LW, Hughes V, Mohammadi M, Tsai P, Pitteloud N. 2008. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest* 118:2822-2831.
- Fang X, Stachowiak EK, Dunham-Ems SM, Klejbor I, Stachowiak MK. 2005. Control of CREB-binding protein signaling by nuclear fibroblast growth factor receptor-1: a novel mechanism of gene regulation. *J Biol Chem* 280:28451-28462.
- Ferecatu I, Bergeaud M, Rodriguez-Enfedaque A, Le Floch N, Oliver L, Rincheval V, Renaud F, Vallette FM, Mignotte B, Vayssiere JL. 2009. Mitochondrial localization of the low level p53 protein in proliferative cells. *Biochem Biophys Res Commun* 387:772-777.
- Fiandalo MV, Kyprianou N. 2012. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp Oncol* 34:165-175.
- Fields S, Jang SK. 1990. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249:1046-1049.
- Fioravanti L, Cappelletti V, Coradini D, Miodini P, Borsani G, Daidone MG, Di Fronzo G. 1997. int-2 oncogene amplification and prognosis in node-negative breast carcinoma. *Int J Cancer* 74:620-624.
- Florkiewicz RZ, Majack RA, Buechler RD, Florkiewicz E. 1995. Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J Cell Physiol* 162:388-399.
- Florkiewicz RZ, Sommer A. 1989. Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3978-3981.
- Fogal V, Hsieh JK, Royer C, Zhong S, Lu X. 2005. Cell cycle-dependent nuclear retention of p53 by E2F1 requires phosphorylation of p53 at Ser315. *EMBO J* 24:2768-2782.
- Foletti A, Vuadens F, Beermann F. 2003. Nuclear localization of mouse fibroblast growth factor 2 requires N-terminal and C-terminal sequences. *Cell Mol Life Sci* 60:2254-2265.
- Fox JC, Hsu AY, Swain JL. 1994. Myogenic differentiation triggered by antisense acidic fibroblast growth factor RNA. *Mol Cell Biol* 14:4244-4250.
- Friesel R, Burgess WH, Mehlman T, Maciag T. 1986. The characterization of the receptor for endothelial cell growth factor by covalent ligand attachment. *J Biol Chem* 261:7581-7584.
- Fu YM, Spirito P, Yu ZX, Biro S, Sasse J, Lei J, Ferrans VJ, Epstein SE, Casscells W. 1991. Acidic fibroblast growth factor in the developing rat embryo. *J Cell Biol* 114:1261-1273.
- Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, Wu X, Ronai Z. 1998. Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene* 17:2543-2547.

- Fuentes-Prior P, Salvesen GS. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384:201-232.
- Gecz J, Baker E, Donnelly A, Ming JE, McDonald-McGinn DM, Spinner NB, Zackai EH, Sutherland GR, Mulley JC. 1999. Fibroblast growth factor homologous factor 2 (FHF2): gene structure, expression and mapping to the Borjeson-Forssman-Lehmann syndrome region in Xq26 delineated by a duplication breakpoint in a BFLS-like patient. *Hum Genet* 104:56-63.
- Ghayur T, Hugunin M, Talanian RV, Ratnofsky S, Quinlan C, Emoto Y, Pandey P, Datta R, Huang Y, Kharbanda S, Allen H, Kamen R, Wong W, Kufe D. 1996. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Exp Med* 184:2399-2404.
- Gimenez-Gallego G, Rodkey J, Bennett C, Rios-Candelore M, DiSalvo J, Thomas K. 1985. Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete amino acid sequence and homologies. *Science* 230:1385-1388.
- Giri D, Ropiquet F, Ittmann M. 1999. Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 5:1063-1071.
- Gizang-Ginsberg E, Ziff EB. 1990. Nerve growth factor regulates tyrosine hydroxylase gene transcription through a nucleoprotein complex that contains c-Fos. *Genes Dev* 4:477-491.
- Goldfarb M. 2005. Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:215-220.
- Goldfarb M, Schoorlemmer J, Williams A, Diwakar S, Wang Q, Huang X, Giza J, Tchetchik D, Kelley K, Vega A, Matthews G, Rossi P, Ornitz DM, D'Angelo E. 2007. Fibroblast growth factor homologous factors control neuronal excitability through modulation of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 55:449-463.
- Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ, Shore GC. 1998. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* 143:207-215.
- Gospodarowicz D. 1974. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249:123-127.
- Gospodarowicz D. 1975. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J Biol Chem* 250:2515-2520.
- Gospodarowicz D, Greene G, Moran J. 1975. Fibroblast growth factor can substitute for platelet factor to sustain the growth of Balb/3T3 cells in the presence of plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 65:779-787.
- Gospodarowicz D, Handley HH. 1975. Stimulation of division of Y1 adrenal cells by a growth factor isolated from bovine pituitary glands. *Endocrinology* 97:102-107.
- Gospodarowicz D, Jones KL, Sato G. 1974. Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:2295-2299.
- Gospodarowicz D, Massoglia S, Cheng J, Fujii DK. 1986. Effect of retina-derived basic and acidic fibroblast growth factor and lipoproteins on the proliferation of retina-derived capillary endothelial cells. *Exp Eye Res* 43:459-476.
- Gospodarowicz D, Moran J. 1974a. Effect of a fibroblast growth factor, insulin, dexamethasone, and serum on the morphology of BALB/c 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:4648-4652.
- Gospodarowicz D, Moran JS. 1974b. Stimulation of division of sparse and confluent 3T3 cell populations by a fibroblast growth factor, dexamethasone, and insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:4584-4588.
- Gospodarowicz D, Moran JS. 1975. Mitogenic effect of fibroblast growth factor on early passage cultures of human and murine fibroblasts. *J Cell Biol* 66:451-457.
- Gospodarowicz D, Moran JS. 1976. Growth factors in mammalian cell culture. *Annu Rev Biochem* 45:531-558.

- Goudelock DM, Jiang K, Pereira E, Russell B, Sanchez Y. 2003. Regulatory interactions between the checkpoint kinase Chk1 and the proteins of the DNA-dependent protein kinase complex. *J Biol Chem* 278:29940-29947.
- Grossman SR. 2001. p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J Biochem* 268:2773-2778.
- Gu W, Roeder RG. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90:595-606.
- Gu W, Shi XL, Roeder RG. 1997. Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* 387:819-823.
- Gupta S, Kass GE, Szegezdi E, Joseph B. 2009. The mitochondrial death pathway: a promising therapeutic target in diseases. *J Cell Mol Med* 13:1004-1033.
- Hainaut P, Hernandez T, Robinson A, Rodriguez-Tome P, Flores T, Hollstein M, Harris CC, Montesano R. 1998. IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res* 26:205-213.
- Hammond EM, Denko NC, Dorie MJ, Abraham RT, Giaccia AJ. 2002. Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest. *Mol Cell Biol* 22:1834-1843.
- Hanada N, Lo HW, Day CP, Pan Y, Nakajima Y, Hung MC. 2006. Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol Carcinog* 45:10-17.
- Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, Nishida E. 2002. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4:850-858.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816.
- Harper JW, Lobb RR. 1988. Reductive methylation of lysine residues in acidic fibroblast growth factor: effect on mitogenic activity and heparin affinity. *Biochemistry* 27:671-678.
- Haugsten EM, Sorensen V, Brech A, Olsnes S, Wesche J. 2005. Different intracellular trafficking of FGF1 endocytosed by the four homologous FGF receptors. *J Cell Sci* 118:3869-3881.
- Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 2002. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277:432-438.
- Hemmings BA, Restuccia DF. 2012. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a011189.
- Henkels KM, Turchi JJ. 1997. Induction of apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 57:4488-4492.
- Henriksson ML, Edin S, Dahlin AM, Oldenborg PA, Oberg A, Van Guelpen B, Rutegard J, Stenling R, Palmqvist R. 2011. Colorectal cancer cells activate adjacent fibroblasts resulting in FGF1/FGFR3 signaling and increased invasion. *Am J Pathol* 178:1387-1394.
- Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. 1997. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1:3-11.
- Hidai C, Masako O, Ikeda H, Nagashima H, Matsuoka R, Quertermous T, Kasanuki H, Kokubun S, Kawana M. 2003. FGF-1 enhanced cardiogenesis in differentiating embryonal carcinoma cell cultures, which was opposite to the effect of FGF-2. *J Mol Cell Cardiol* 35:421-425.
- Hinds MG, Norton RS, Vaux DL, Day CL. 1999. Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol* 6:648-651.

- Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. 2002. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 277:3247-3257.
- Holley RW, Kiernan JA. 1974. Control of the initiation of DNA synthesis in 3T3 cells: low-molecular weight nutrients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:2942-2945.
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H. 1997. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420:25-27.
- Hosang M, Shooter EM. 1987. The internalization of nerve growth factor by high-affinity receptors on pheochromocytoma PC12 cells. *EMBO J* 6:1197-1202.
- Howe CL, Valletta JS, Rusnak AS, Mobley WC. 2001. NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* 32:801-814.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. 1996. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84:299-308.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81:495-504.
- Hsu SC, Miller SA, Wang Y, Hung MC. 2009. Nuclear EGFR is required for cisplatin resistance and DNA repair. *Am J Transl Res* 1:249-258.
- Hsu YC, Kao CY, Chung YF, Chen MS, Chiu IM. 2012. Ciliogenic RFX transcription factors regulate FGF1 gene promoter. *J Cell Biochem* 113:2511-2522.
- Hsu YC, Liao WC, Kao CY, Chiu IM. 2010. Regulation of FGF1 gene promoter through transcription factor RFX1. *J Biol Chem* 285:13885-13895.
- Hu Y, Ding L, Spencer DM, Nunez G. 1998. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 273:33489-33494.
- Huang A, Jin H, Wright JA. 1994. Aberrant expression of basic fibroblast growth factor in NIH-3T3 cells alters drug resistance and gene amplification potential. *Exp Cell Res* 213:335-339.
- Huang P. 1998. Excision of mismatched nucleotides from DNA: a potential mechanism for enhancing DNA replication fidelity by the wild-type p53 protein. *Oncogene* 17:261-270.
- Huang SS, Tsai CC, Adams SP, Huang JS. 1987. Neuron localization and neuroblastoma cell expression of brain-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 144:81-87.
- Hung LY, Tseng JT, Lee YC, Xia W, Wang YN, Wu ML, Chuang YH, Lai CH, Chang WC. 2008. Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleic Acids Res* 36:4337-4351.
- Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP. 1992. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 71:875-886.
- Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G. 1999. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:424-428.
- Imamura T, Engleka K, Zhan X, Tokita Y, Forough R, Roeder D, Jackson A, Maier JA, Hla T, Maciag T. 1990. Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science* 249:1567-1570.
- Imamura T, Oka S, Tanahashi T, Okita Y. 1994. Cell cycle-dependent nuclear localization of exogenously added fibroblast growth factor-1 in BALB/c 3T3 and human vascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 215:363-372.
- Itoh N. 2007. The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biol Pharm Bull* 30:1819-1825.
- Itoh N, Nagata S. 1993. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268:10932-10937.

- Itoh N, Ornitz DM. 2011. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem* 149:121-130.
- Jackson A, Friedman S, Zhan X, Engleka KA, Forough R, Maciag T. 1992. Heat shock induces the release of fibroblast growth factor 1 from NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10691-10695.
- Jackson A, Tarantini F, Gamble S, Friedman S, Maciag T. 1995. The release of fibroblast growth factor-1 from NIH 3T3 cells in response to temperature involves the function of cysteine residues. *J Biol Chem* 270:33-36.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354.
- Jacquemin E, Halley C, Alterio J, Laurent M, Courtois Y, Jeanny JC. 1990. Localization of acidic fibroblast growth factor (aFGF) mRNA in mouse and bovine retina by in situ hybridization. *Neurosci Lett* 116:23-28.
- Janicke RU, Sohn D, Schulze-Osthoff K. 2008. The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53. *Cell Death Differ* 15:959-976.
- Jaye M, Howk R, Burgess W, Ricca GA, Chiu IM, Ravera MW, O'Brien SJ, Modi WS, Maciag T, Drohan WN. 1986. Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science* 233:541-545.
- Jiang P, Du W, Heese K, Wu M. 2006. The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 26:9071-9082.
- Johnston CL, Cox HC, Gomm JJ, Coombes RC. 1995. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) localize in different cellular compartments. A splice variant of FGFR-3 localizes to the nucleus. *J Biol Chem* 270:30643-30650.
- Jones KL, Gospodarowicz D. 1974. Biological activity of a growth factor for ovarian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:3372-3376.
- Jouanneau J, Gavrilovic J, Caruelle D, Jaye M, Moens G, Caruelle JP, Thiery JP. 1991. Secreted or nonsecreted forms of acidic fibroblast growth factor produced by transfected epithelial cells influence cell morphology, motility, and invasive potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2893-2897.
- Jouanneau J, Plouet J, Moens G, Thiery JP. 1997. FGF-2 and FGF-1 expressed in rat bladder carcinoma cells have similar angiogenic potential but different tumorigenic properties in vivo. *Oncogene* 14:671-676.
- Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. 1998. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* 8:1001-1008.
- Kan SH, Elanko N, Johnson D, Cornejo-Roldan L, Cook J, Reich EW, Tomkins S, Verloes A, Twigg SR, Rannan-Eliya S, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Wall SA, Muenke M, Wilkie AO. 2002. Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis. *Am J Hum Genet* 70:472-486.
- Kao CY, Hsu YC, Liu JW, Lee DC, Chung YF, Chiu IM. 2013. The mood stabilizer valproate activates human FGF1 gene promoter through inhibiting HDAC and GSK-3 activities. *J Neurochem*.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51:6304-6311.
- Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ, Jr. 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71:587-597.
- Kaul SC, Deocaris CC, Wadhwa R. 2007. Three faces of mortalin: a housekeeper, guardian and killer. *Exp Gerontol* 42:263-274.
- Keller DM, Lu H. 2002. p53 serine 392 phosphorylation increases after UV through induction of the assembly of the CK2.hSPT16.SSRP1 complex. *J Biol Chem* 277:50206-50213.

- Keller DM, Zeng X, Wang Y, Zhang QH, Kapoor M, Shu H, Goodman R, Lozano G, Zhao Y, Lu H. 2001. A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1. *Mol Cell* 7:283-292.
- Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. 1991. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252:1708-1711.
- 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.
- Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP, Lavin MF. 1998. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet* 20:398-400.
- Kiefer P, Acland P, Pappin D, Peters G, Dickson C. 1994. Competition between nuclear localization and secretory signals determines the subcellular fate of a single CUG-initiated form of FGF3. *EMBO J* 13:4126-4136.
- Kiefer P, Dickson C. 1995. Nucleolar association of fibroblast growth factor 3 via specific sequence motifs has inhibitory effects on cell growth. *Mol Cell Biol* 15:4364-4374.
- Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH. 2009. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 36:487-499.
- Kim J, Jahng WJ, Di Vizio D, Lee JS, Jhaveri R, Rubin MA, Shisheva A, Freeman MR. 2007. The phosphoinositide kinase PIKfyve mediates epidermal growth factor receptor trafficking to the nucleus. *Cancer Res* 67:9229-9237.
- Kirov A, Duarte M, Guay J, Karolak M, Yan C, Oxburgh L, Prudovsky I. 2012. Transgenic expression of nonclassically secreted FGF suppresses kidney repair. *PLoS One* 7:e36485.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14:5579-5588.
- Kiuru-Kuhlefelt S, Sarlomo-Rikala M, Larramendy ML, Soderlund M, Hedman K, Miettinen M, Knuutila S. 2000. FGF4 and INT2 oncogenes are amplified and expressed in Kaposi's sarcoma. *Mod Pathol* 13:433-437.
- Klingenberg O, Wiedlocha A, Rapak A, Munoz R, Falnes P, Olsnes S. 1998. Inability of the acidic fibroblast growth factor mutant K132E to stimulate DNA synthesis after translocation into cells. *J Biol Chem* 273:11164-11172.
- Klingenberg O, Wiedlocha A, Olsnes S. 1999. Effects of mutations of a phosphorylation site in an exposed loop in acidic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 274:18081-18086.
- Klingenberg O, Wiedlocha A, Citores L, Olsnes S. 2000. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activity for translocation of exogenous aFGF to the cytosol and nucleus. *J Biol Chem* 275:11972-11980.
- Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132-1136.
- Koch S, Claesson-Welsh L. 2012. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006502.
- Kolpakova E, Frengen E, Stokke T, Olsnes S. 2000. Organization, chromosomal localization and promoter analysis of the gene encoding human acidic fibroblast growth factor intracellular binding protein. *Biochem J* 352 Pt 3:629-635.
- Kolpakova E, Rusten TE, Olsnes S. 2003. Characterization and tissue expression of acidic fibroblast growth factor binding protein homologue in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 310:185-191.

- Kolpakova E, Wiedlocha A, Stenmark H, Klingenberg O, Falnes PO, Olsnes S. 1998. Cloning of an intracellular protein that binds selectively to mitogenic acidic fibroblast growth factor. *Biochem J* 336 (Pt 1):213-222.
- Kornmann M, Ishiwata T, Beger HG, Korc M. 1997. Fibroblast growth factor-5 stimulates mitogenic signaling and is overexpressed in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine actions. *Oncogene* 15:1417-1424.
- Kovalenko D, Yang X, Nadeau RJ, Harkins LK, Friesel R. 2003. Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J Biol Chem* 278:14087-14091.
- Kraiss S, Quaiser A, Oren M, Montenarh M. 1988. Oligomerization of oncoprotein p53. *J Virol* 62:4737-4744.
- Kress M, May E, Cassingena R, May P. 1979. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* 31:472-483.
- Kroemer G, Martin SJ. 2005. Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11:725-730.
- Kruse JP, Gu W. 2009. Modes of p53 regulation. *Cell* 137:609-622.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387:299-303.
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17:525-535.
- La Rosa S, Sessa F, Colombo L, Tibiletti MG, Furlan D, Capella C. 2001. Expression of acidic fibroblast growth factor (aFGF) and fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) in breast fibroadenomas. *J Clin Pathol* 54:37-41.
- LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. 2008. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 27:6252-6275.
- Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E. 2006. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol* 174:593-604.
- Landriscina M, Soldi R, Bagala C, Micucci I, Bellum S, Tarantini F, Prudovsky I, Maciag T. 2001. S100A13 participates in the release of fibroblast growth factor 1 in response to heat shock in vitro. *J Biol Chem* 276:22544-22552.
- Lane DP. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16.
- Lane DP, Crawford LV. 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278:261-263.
- LaVallee TM, Tarantini F, Gamble S, Mouta Carreira C, Jackson A, Maciag T. 1998. Synaptotagmin-1 is required for fibroblast growth factor-1 release. *J Biol Chem* 273:22217-22223.
- Lavin MF, Gueven N. 2006. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 13:941-950.
- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115:2665-2672.
- Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK, Avraham S. 2007. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med* 4:e186.
- Lees-Miller SP, Sakaguchi K, Ullrich SJ, Appella E, Anderson CW. 1992. Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol Cell Biol* 12:5041-5049.
- Lejbkowitz F, Goldberg-Cohen I, Levy AP. 2005. New horizons for VEGF. Is there a role for nuclear localization? *Acta Histochem* 106:405-411.

- Lemmon MA, Schlessinger J. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141:1117-1134.
- Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL. 2004. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 6:443-450.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
- Li J, Yin Q, Wu H. 2013. Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. *Adv Immunol* 119:135-153.
- Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W. 2003. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 302:1972-1975.
- Li M, Luo J, Brooks CL, Gu W. 2002. Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* 277:50607-50611.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
- Liang SH, Clarke MF. 1999. A bipartite nuclear localization signal is required for p53 nuclear import regulated by a carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem* 274:32699-32703.
- Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC. 2001. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3:802-808.
- Lin YZ, Yao SY, Hawiger J. 1996. Role of the nuclear localization sequence in fibroblast growth factor-1-stimulated mitogenic pathways. *J Biol Chem* 271:5305-5308.
- Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB. 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6:1389-1399.
- Linzer DI, Levine AJ. 1979. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17:43-52.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147-157.
- Liu X, Miller CW, Koeffler PH, Berk AJ. 1993. The p53 activation domain binds the TATA box-binding polypeptide in Holo-TFIID, and a neighboring p53 domain inhibits transcription. *Mol Cell Biol* 13:3291-3300.
- Lo HW, Ali-Seyed M, Wu Y, Bartholomeusz G, Hsu SC, Hung MC. 2006. Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1. *J Cell Biochem* 98:1570-1583.
- Lo HW, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Huang SF, Hung MC. 2005. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res* 65:338-348.
- Londono C, Osorio C, Gama V, Alzate O. 2012. Mortalin, Apoptosis, and Neurodegeneration. *Biomolecules* 2:143-164.
- Longo L, Lee J, Blaber M. 2012. Experimental support for the foldability-function tradeoff hypothesis: segregation of the folding nucleus and functional regions in fibroblast growth factor-1. *Protein Sci* 21:1911-1920.
- Lotto RB, Clausen JA, Price DJ. 1997. A role for neurotrophins in the survival of murine embryonic thalamic neurons. *Eur J Neurosci* 9:1940-1949.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.
- MacLachlan TK, El-Deiry WS. 2002. Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9492-9497.

- Maher PA. 1996. Nuclear Translocation of fibroblast growth factor (FGF) receptors in response to FGF-2. *J Cell Biol* 134:529-536.
- Maier JA, Morelli D, Menard S, Colnaghi MI, Balsari A. 1996. Tumor-necrosis-factor-induced fibroblast growth factor-1 acts as a survival factor in a transformed endothelial cell line. *Am J Pathol* 149:945-952.
- Maki CG, Huijbregtse JM, Howley PM. 1996. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res* 56:2649-2654.
- Malecki J, Wesche J, Skjerpen CS, Wiedlocha A, Olsnes S. 2004. Translocation of FGF-1 and FGF-2 across vesicular membranes occurs during G1-phase by a common mechanism. *Mol Biol Cell* 15:801-814.
- Malecki J, Wiedlocha A, Wesche J, Olsnes S. 2002. Vesicle transmembrane potential is required for translocation to the cytosol of externally added FGF-1. *EMBO J* 21:4480-4490.
- Maltzman W, Czyzyk L. 1984. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 4:1689-1694.
- Marchenko ND, Zaika A, Moll UM. 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275:16202-16212.
- Marchetti L, Sabbieti MG, Agas D, Menghi M, Materazzi G, Menghi G, Hurley MM. 2006. PGF2alpha increases FGF-2 and FGFR2 trafficking in Pyla rat osteoblasts via clathrin independent and importin beta dependent pathway. *J Cell Biochem* 97:1379-1392.
- Maret A, Galy B, Arnaud E, Bayard F, Prats H. 1995. Inhibition of fibroblast growth factor 2 expression by antisense RNA induced a loss of the transformed phenotype in a human hepatoma cell line. *Cancer Res* 55:5075-5079.
- Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J. 2002. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 277:439-444.
- Mascarelli F, Raulais D, Courtois Y. 1989. Fibroblast growth factor phosphorylation and receptors in rod outer segments. *EMBO J* 8:2265-2273.
- Mashima T, Naito M, Noguchi K, Miller DK, Nicholson DW, Tsuruo T. 1997. Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* 14:1007-1012.
- Matsunaga H, Ueda H. 2006. Evidence for serum-deprivation-induced co-release of FGF-1 and S100A13 from astrocytes. *Neurochem Int* 49:294-303.
- Maxwell M, Naber SP, Wolfe HJ, Hedley-Whyte ET, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Antoniades HN. 1991. Expression of angiogenic growth factor genes in primary human astrocytomas may contribute to their growth and progression. *Cancer Res* 51:1345-1351.
- McKinney K, Mattia M, Gottifredi V, Prives C. 2004. p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus. *Mol Cell* 16:413-424.
- Melero JA, Stitt DT, Mangel WF, Carroll RB. 1979. Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. *Virology* 93:466-480.
- Micheau O, Tschopp J. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114:181-190.
- Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB. 1992. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol* 151:81-93.
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11:577-590.
- Millau JF, Bastien N, Drouin R. 2009. P53 transcriptional activities: a general overview and some thoughts. *Mutat Res* 681:118-133.

- Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen SF, Wang L, Kirschmeier P, Bishop WR, Nielsen LL, Pickett CB, Liu S. 2002. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 21:2613-2622.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9:1799-1805.
- Miyashita T, Reed JC. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-299.
- Mizukoshi E, Suzuki M, Loupatov A, Uruno T, Hayashi H, Misono T, Kaul SC, Wadhwa R, Imamura T. 1999. Fibroblast growth factor-1 interacts with the glucose-regulated protein GRP75/mortalin. *Biochem J* 343 Pt 2:461-466.
- Mizukoshi E, Suzuki M, Misono T, Loupatov A, Munekata E, Kaul SC, Wadhwa R, Imamura T. 2001. Cell-cycle dependent tyrosine phosphorylation on mortalin regulates its interaction with fibroblast growth factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1203-1209.
- Moenner M, Chevallier B, Badet J, Barritault D. 1986. Evidence and characterization of the receptor to eye-derived growth factor I, the retinal form of basic fibroblast growth factor, on bovine epithelial lens cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5024-5028.
- Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahim OA. 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:107-137.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69:1237-1245.
- Moore JW, Dionne C, Jaye M, Swain JL. 1991. The mRNAs encoding acidic FGF, basic FGF and FGF receptor are coordinately downregulated during myogenic differentiation. *Development* 111:741-748.
- Moroni MC, Hickman ES, Lazzerini Denchi E, Caprara G, Colli E, Cecconi F, Muller H, Helin K. 2001. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* 3:552-558.
- Moscatelli D. 1987. High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. *J Cell Physiol* 131:123-130.
- Mouta Carreira C, Landriscina M, Bellum S, Prudovsky I, Maciag T. 2001. The comparative release of FGF1 by hypoxia and temperature stress. *Growth Factors* 18:277-285.
- Mouta Carreira C, LaVallee TM, Tarantini F, Jackson A, Lathrop JT, Hampton B, Burgess WH, Maciag T. 1998. S100A13 is involved in the regulation of fibroblast growth factor-1 and p40 synaptotagmin-1 release in vitro. *J Biol Chem* 273:22224-22231.
- Muenke M, Gripp KW, McDonald-McGinn DM, Gaudenz K, Whitaker LA, Bartlett SP, Markowitz RI, Robin NH, Nwokoro N, Mulvihill JJ, Losken HW, Mulliken JB, Guttmacher AE, Wilroy RS, Clarke LA, Hollway G, Ades LC, Haan EA, Mulley JC, Cohen MM, Jr., Bellus GA, Francomano CA, Moloney DM, Wall SA, Wilkie AO, et al. 1997. A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. *Am J Hum Genet* 60:555-564.
- Muller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. 1998. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 188:2033-2045.
- Mummenbrauer T, Janus F, Muller B, Wiesmuller L, Deppert W, Grosse F. 1996. p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* 85:1089-1099.

- Munoz-Sanjuan I, Smallwood PM, Nathans J. 2000. Isoform diversity among fibroblast growth factor homologous factors is generated by alternative promoter usage and differential splicing. *J Biol Chem* 275:2589-2597.
- Munoz R, Klingenberg O, Wiedlocha A, Rapak A, Falnes PO, Olsnes S. 1997. Effect of mutation of cytoplasmic receptor domain and of genistein on transport of acidic fibroblast growth factor into cells. *Oncogene* 15:525-536.
- Myers RL, Payson RA, Chotani MA, Deaven LL, Chiu IM. 1993. Gene structure and differential expression of acidic fibroblast growth factor mRNA: identification and distribution of four different transcripts. *Oncogene* 8:341-349.
- Myers RL, Ray SK, Eldridge R, Chotani MA, Chiu IM. 1995. Functional characterization of the brain-specific FGF-1 promoter, FGF-1.B. *J Biol Chem* 270:8257-8266.
- Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-365.
- Nakano K, Vousden KH. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7:683-694.
- Neufeld G, Gospodarowicz D. 1986. Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors. *J Biol Chem* 261:5631-5637.
- Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G. 2001. gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 294:2179-2181.
- 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* 288:1053-1058.
- 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* 102:849-862.
- Offer H, Wolkowicz R, Matas D, Blumenstein S, Livneh Z, Rotter V. 1999. Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Lett* 450:197-204.
- Offterdinger M, Schofer C, Weipoltshammer K, Grunt TW. 2002. c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 157:929-939.
- Ohlsson C, Kley N, Werner H, LeRoith D. 1998. p53 regulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor expression and IGF-I-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1. *Endocrinology* 139:1101-1107.
- Okunieff P, Fenton BM, Zhang L, Kern FG, Wu T, Greg JR, Ding I. 2003. Fibroblast growth factors (FGFS) increase breast tumor growth rate, metastases, blood flow, and oxygenation without significant change in vascular density. *Adv Exp Med Biol* 530:593-601.
- Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. 2011. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 351:41-58.
- Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B. 1993. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362:857-860.
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. 2002. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 19:607-614.
- Olsen JV, Mann M. 2013. Status of large-scale analysis of post-translational modifications by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 12:3444-3452.
- Olsson A, Manzl C, Strasser A, Villunger A. 2007. How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression? *Cell Death Differ* 14:1561-1575.
- Ornitz DM, Itoh N. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2:REVIEWS3005.

- Oulion S, Bertrand S, Escriva H. 2012. Evolution of the FGF Gene Family. *Int J Evol Biol* 2012:298147.
- Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E, et al. 1995. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 15:3032-3040.
- Palmen M, Daemen MJ, De Windt LJ, Willems J, Dassen WR, Heeneman S, Zimmermann R, Van Bilsen M, Doevendans PA. 2004. Fibroblast growth factor-1 improves cardiac functional recovery and enhances cell survival after ischemia and reperfusion: a fibroblast growth factor receptor, protein kinase C, and tyrosine kinase-dependent mechanism. *J Am Coll Cardiol* 44:1113-1123.
- Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H. 2007. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol* 25:561-586.
- Patil M, Pabla N, Dong Z. 2013. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell Mol Life Sci* 70:4009-4021.
- Patry V, Bugler B, Maret A, Potier M, Prats H. 1997. Endogenous basic fibroblast growth factor isoforms involved in different intracellular protein complexes. *Biochem J* 326 (Pt 1):259-264.
- Pavletich NP, Chambers KA, Pabo CO. 1993. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev* 7:2556-2564.
- Payson RA, Canatan H, Chotani MA, Wang WP, Harris SE, Myers RL, Chiu IM. 1993. Cloning of two novel forms of human acidic fibroblast growth factor (aFGF) mRNA. *Nucleic Acids Res* 21:489-495.
- Payson RA, Chotani MA, Chiu IM. 1998. Regulation of a promoter of the fibroblast growth factor 1 gene in prostate and breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 66:93-103.
- Pearson AS, Spitz FR, Swisher SG, Kataoka M, Sarkiss MG, Meyn RE, McDonnell TJ, Cristiano RJ, Roth JA. 2000. Up-regulation of the proapoptotic mediators Bax and Bak after adenovirus-mediated p53 gene transfer in lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 6:887-890.
- Peng H, Moffett J, Myers J, Fang X, Stachowiak EK, Maher P, Kratz E, Hines J, Fluharty SJ, Mizukoshi E, Bloom DC, Stachowiak MK. 2001. Novel nuclear signaling pathway mediates activation of fibroblast growth factor-2 gene by type 1 and type 2 angiotensin II receptors. *Mol Biol Cell* 12:449-462.
- Peng H, Myers J, Fang X, Stachowiak EK, Maher PA, Martins GG, Popescu G, Berezney R, Stachowiak MK. 2002. Integrative nuclear FGFR1 signaling (INFS) pathway mediates activation of the tyrosine hydroxylase gene by angiotensin II, depolarization and protein kinase C. *J Neurochem* 81:506-524.
- Petit PX, Lecoer H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. 1995. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 130:157-167.
- Pietrzak M, Puzianowska-Kuznicka M. 2008. p53-dependent repression of the human MCL-1 gene encoding an anti-apoptotic member of the BCL-2 family: the role of Sp1 and of basic transcription factor binding sites in the MCL-1 promoter. *Biol Chem* 389:383-393.
- Piotrowicz RS, Martin JL, Dillman WH, Levin EG. 1997. The 27-kDa heat shock protein facilitates basic fibroblast growth factor release from endothelial cells. *J Biol Chem* 272:7042-7047.
- Planque N. 2006. Nuclear trafficking of secreted factors and cell-surface receptors: new pathways to regulate cell proliferation and differentiation, and involvement in cancers. *Cell Commun Signal* 4:7.

- Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, Mohammadi M. 1999. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 98:641-650.
- Polanska UM, Fernig DG, Kinnunen T. 2009. Extracellular interactome of the FGF receptor-ligand system: complexities and the relative simplicity of the worm. *Dev Dyn* 238:277-293.
- Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, Powell MA, Mallon MA, Davies H, Mohammadi M, Futreal PA, Stratton MR, Trent JM, Goodfellow PJ. 2007. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene* 26:7158-7162.
- Pop C, Salvesen GS. 2009. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 284:21777-21781.
- Popovici C, Roubin R, Coulier F, Birnbaum D. 2005. An evolutionary history of the FGF superfamily. *Bioessays* 27:849-857.
- Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. 2000. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7:165-197.
- Prats H, Kaghad M, Prats AC, Klagsbrun M, Lelias JM, Liauzun P, Chalon P, Tauber JP, Amalric F, Smith JA, et al. 1989. High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1836-1840.
- Prudovsky I, Kumar TK, Sterling S, Neivandt D. 2013. Protein-phospholipid interactions in nonclassical protein secretion: problem and methods of study. *Int J Mol Sci* 14:3734-3772.
- Quarto N, Finger FP, Rifkin DB. 1991. The NH₂-terminal extension of high molecular weight bFGF is a nuclear targeting signal. *J Cell Physiol* 147:311-318.
- Quarto N, Fong KD, Longaker MT. 2005. Gene profiling of cells expressing different FGF-2 forms. *Gene* 356:49-68.
- Raguenez G, Desire L, Lantrua V, Courtois Y. 1999. BCL-2 is upregulated in human SH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated by overexpression of fibroblast growth factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 258:745-751.
- Rajagopalan S, Andreeva A, Rutherford TJ, Fersht AR. 2010. Mapping the physical and functional interactions between the tumor suppressors p53 and BRCA2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8587-8592.
- Rakowicz-Szulczynska EM, Koprowski H. 1989. Antagonistic effect of PDGF and NGF on transcription of ribosomal DNA and tumor cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 163:649-656.
- Rakowicz-Szulczynska EM, Reddy U, Vorbodt A, Herlyn D, Koprowski H. 1991. Chromatin and cell surface receptors mediate melanoma cell growth response to nerve growth factor. *Mol Carcinog* 4:388-396.
- Rakowicz-Szulczynska EM, Rodeck U, Herlyn M, Koprowski H. 1986. Chromatin binding of epidermal growth factor, nerve growth factor, and platelet-derived growth factor in cells bearing the appropriate surface receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3728-3732.
- Rand V, Huang J, Stockwell T, Ferriera S, Buzko O, Levy S, Busam D, Li K, Edwards JB, Eberhart C, Murphy KM, Tsiamouri A, Beeson K, Simpson AJ, Venter JC, Riggins GJ, Strausberg RL. 2005. Sequence survey of receptor tyrosine kinases reveals mutations in glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14344-14349.
- Rao L, Perez D, White E. 1996. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135:1441-1455.
- Ravi R, Bedi A, Fuchs EJ. 1998. CD95 (Fas)-induced caspase-mediated proteolysis of NF-kappaB. *Cancer Res* 58:882-886.

- Ray SK, Yang XQ, Chiu IM. 1997. Transcriptional activation of fibroblast growth factor 1.B promoter is mediated through an 18-base pair cis-acting element. *J Biol Chem* 272:7546-7555.
- Raycroft L, Wu HY, Lozano G. 1990. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* 249:1049-1051.
- Reilly JF, Maher PA. 2001. Importin beta-mediated nuclear import of fibroblast growth factor receptor: role in cell proliferation. *J Cell Biol* 152:1307-1312.
- Reimers K, Antoine M, Zapatka M, Blecken V, Dickson C, Kiefer P. 2001. NoBP, a nuclear fibroblast growth factor 3 binding protein, is cell cycle regulated and promotes cell growth. *Mol Cell Biol* 21:4996-5007.
- Reith W, Herrero-Sanchez C, Kobr M, Silacci P, Berte C, Barras E, Fey S, Mach B. 1990. MHC class II regulatory factor RFX has a novel DNA-binding domain and a functionally independent dimerization domain. *Genes Dev* 4:1528-1540.
- Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL. 1997. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 57:963-969.
- Renaud F, Desset S, Oliver L, Gimenez-Gallego G, Van Obberghen E, Courtois Y, Laurent M. 1996. The neurotrophic activity of fibroblast growth factor 1 (FGF1) depends on endogenous FGF1 expression and is independent of the mitogen-activated protein kinase cascade pathway. *J Biol Chem* 271:2801-2811.
- Renaud F, Oliver L, Desset S, Tassin J, Romquin N, Courtois Y, Laurent M. 1994. Up-regulation of aFGF expression in quiescent cells is related to cell survival. *J Cell Physiol* 158:435-443.
- Riedl SJ, Shi Y. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:897-907.
- Rodriguez-Enfedaque A, Bouleau S, Laurent M, Courtois Y, Mignotte B, Vayssiere JL, Renaud F. 2009. FGF1 nuclear translocation is required for both its neurotrophic activity and its p53-dependent apoptosis protection. *Biochim Biophys Acta* 1793:1719-1727.
- Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Lane DP, Hay RT. 2000. Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 20:8458-8467.
- Romero A, Pineda-Lucena A, Gimenez-Gallego G. 1996. X-ray structure of native full-length human fibroblast-growth factor at 0.25-nm resolution. *Eur J Biochem* 241:453-461.
- Ropiquet F, Giri D, Kwabi-Addo B, Mansukhani A, Ittmann M. 2000. Increased expression of fibroblast growth factor 6 in human prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Cancer Res* 60:4245-4250.
- Rosen A, Sevela P, Klein M, Dobianer K, Hruza C, Czerwenka K, Hanak H, Vavra N, Salzer H, Leodolter S, et al. 1993. First experience with FGF-3 (INT-2) amplification in women with epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 67:1122-1125.
- Rosenbaum-Dekel Y, Fuchs A, Yakirevich E, Azriel A, Mazareb S, Resnick MB, Levi BZ. 2005. Nuclear localization of long-VEGF is associated with hypoxia and tumor angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 332:271-278.
- Rudland PS, Eckhart W, Gospodarowicz D, Seifert W. 1974a. Cell transformation mutants are not susceptible to growth activation by fibroblast growth factor at permissive temperatures. *Nature* 250:337-339.
- Rudland PS, Seifert W, Gospodarowicz D. 1974b. Growth control in cultured mouse fibroblasts: induction of the pleiotypic and mitogenic responses by a purified growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:2600-2604.

- Russell JC, Szufliata N, Khatri R, Laterra J, Hossain MA. 2006. Transgenic expression of human FGF-1 protects against hypoxic-ischemic injury in perinatal brain by intervening at caspase-XIAP signaling cascades. *Neurobiol Dis* 22:677-690.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23:2861-2874.
- Sakaguchi K, Sakamoto H, Lewis MS, Anderson CW, Erickson JW, Appella E, Xie D. 1997. Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry* 36:10117-10124.
- Sano H, Forough R, Maier JA, Case JP, Jackson A, Engleka K, Maciag T, Wilder RL. 1990. Detection of high levels of heparin binding growth factor-1 (acidic fibroblast growth factor) in inflammatory arthritic joints. *J Cell Biol* 110:1417-1426.
- Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. 2011. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Sasaki A, Taketomi T, Kato R, Saeki K, Nonami A, Sasaki M, Kuriyama M, Saito N, Shibuya M, Yoshimura A. 2003. Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Cell Cycle* 2:281-282.
- Sasaki S, Ohta, H, Nakajima, Y, Konishi, M, Miyake, A and Itoh, N editor. 2011. The FGF Family in Humans, Mice, and Zebrafish: Development, Physiology, and Pathophysiology.
- Sawey ET, Chanrion M, Cai C, Wu G, Zhang J, Zender L, Zhao A, Busuttill RW, Yee H, Stein L, French DM, Finn RS, Lowe SW, Powers S. 2011. Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening. *Cancer Cell* 19:347-358.
- Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS. 2002. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* 4:842-849.
- Schell U, Hehr A, Feldman GJ, Robin NH, Zackai EH, de Die-Smulders C, Viskochil DH, Stewart JM, Wolff G, Ohashi H, et al. 1995. Mutations in FGFR1 and FGFR2 cause familial and sporadic Pfeiffer syndrome. *Hum Mol Genet* 4:323-328.
- Scherer SJ, Maier SM, Seifert M, Hanselmann RG, Zang KD, Muller-Hermelink HK, Angel P, Welter C, Scharl M. 2000. p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV. *J Biol Chem* 275:37469-37473.
- Schneider BP, Winer EP, Foulkes WD, Garber J, Perou CM, Richardson A, Sledge GW, Carey LA. 2008. Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets. *Clin Cancer Res* 14:8010-8018.
- Schnurch H, Risau W. 1991. Differentiating and mature neurons express the acidic fibroblast growth factor gene during chick neural development. *Development* 111:1143-1154.
- Schoorlemmer J, Goldfarb M. 2001. Fibroblast growth factor homologous factors are intracellular signaling proteins. *Curr Biol* 11:793-797.
- Schoorlemmer J, Goldfarb M. 2002. Fibroblast growth factor homologous factors and the islet brain-2 scaffold protein regulate activation of a stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277:49111-49119.
- Seo YR, Fishel ML, Amundson S, Kelley MR, Smith ML. 2002. Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence. *Oncogene* 21:731-737.
- Shain SA, Saric T, Ke LD, Nannen D, Yoas S. 1996. Endogenous fibroblast growth factor-1 or fibroblast growth factor-2 modulate prostate cancer cell proliferation. *Cell Growth Differ* 7:573-586.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Ze'ev A, Rotter V. 1990. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 10:6565-6577.
- Sheng Z, Liang Y, Lin CY, Comai L, Chirico WJ. 2005. Direct regulation of rRNA transcription by fibroblast growth factor 2. *Mol Cell Biol* 25:9419-9426.

- Sherman L, Stocker KM, Morrison R, Ciment G. 1993. Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts intracellularly to cause the transdifferentiation of avian neural crest-derived Schwann cell precursors into melanocytes. *Development* 118:1313-1326.
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91:325-334.
- Shieh SY, Taya Y, Prives C. 1999. DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *EMBO J* 18:1815-1823.
- Shikama N, Lee CW, France S, Delavaine L, Lyon J, Krstic-Demonacos M, La Thangue NB. 1999. A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response. *Mol Cell* 4:365-376.
- Shin JT, Opalenik SR, Wehby JN, Mahesh VK, Jackson A, Tarantini F, Maciag T, Thompson JA. 1996. Serum-starvation induces the extracellular appearance of FGF-1. *Biochim Biophys Acta* 1312:27-38.
- Silke J, Ekert PG, Day CL, Hawkins CJ, Baca M, Chew J, Pakusch M, Verhagen AM, Vaux DL. 2001. Direct inhibition of caspase 3 is dispensable for the anti-apoptotic activity of XIAP. *EMBO J* 20:3114-3123.
- Skalski V, Lin ZY, Choi BY, Brown KR. 2000. Substrate specificity of the p53-associated 3'-5' exonuclease. *Oncogene* 19:3321-3329.
- Skjerpen CS, Nilsen T, Wesche J, Olsnes S. 2002a. Binding of FGF-1 variants to protein kinase CK2 correlates with mitogenicity. *EMBO J* 21:4058-4069.
- Skjerpen CS, Wesche J, Olsnes S. 2002b. Identification of ribosome-binding protein p34 as an intracellular protein that binds acidic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 277:23864-23871.
- Slattery ML, John EM, Stern MC, Herrick J, Lundgreen A, Giuliano AR, Hines L, Baumgartner KB, Torres-Mejia G, Wolff RK. 2013. Associations with growth factor genes (FGF1, FGF2, PDGFB, FGFR2, NRG2, EGF, ERBB2) with breast cancer risk and survival: the Breast Cancer Health Disparities Study. *Breast Cancer Res Treat* 140:587-601.
- Sletten T, Kostas M, Bober J, Sorensen V, Yadollahi M, Olsnes S, Tomala J, Otlewski J, Zakrzewska M, Wiedlocha A. 2014. Nucleolin regulates phosphorylation and nuclear export of fibroblast growth factor 1 (FGF1). *PLoS One* 9:e90687.
- Smallwood PM, Munoz-Sanjuan I, Tong P, Macke JP, Hendry SH, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J. 1996. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9850-9857.
- Smith G, Ng MT, Shepherd L, Herrington CS, Gourley C, Ferguson MJ, Wolf CR. 2012. Individuality in FGF1 expression significantly influences platinum resistance and progression-free survival in ovarian cancer. *Br J Cancer* 107:1327-1336.
- Soldi R, Mandinova A, Venkataraman K, Hla T, Vadas M, Pitson S, Duarte M, Graziani I, Kolev V, Kacer D, Kirov A, Maciag T, Prudovsky I. 2007. Sphingosine kinase 1 is a critical component of the copper-dependent FGF1 export pathway. *Exp Cell Res* 313:3308-3318.
- Sorensen V, Nilsen T, Wiedlocha A. 2006a. Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. *Bioessays* 28:504-514.
- Sorensen V, Wiedlocha A, Haugsten EM, Khnykin D, Wesche J, Olsnes S. 2006b. Different abilities of the four FGFRs to mediate FGF-1 translocation are linked to differences in the receptor C-terminal tail. *J Cell Sci* 119:4332-4341.
- Soulet F, Bailly K, Roga S, Lavigne AC, Amalric F, Bouche G. 2005. Exogenously added fibroblast growth factor 2 (FGF-2) to NIH3T3 cells interacts with nuclear ribosomal S6 kinase 2 (RSK2) in a cell cycle-dependent manner. *J Biol Chem* 280:25604-25610.

- Spirito P, Fu YM, Yu ZX, Epstein SE, Casscells W. 1991. Immunohistochemical localization of basic and acidic fibroblast growth factors in the developing rat heart. *Circulation* 84:322-332.
- St-Denis NA, Litchfield DW. 2009. Protein kinase CK2 in health and disease: From birth to death: the role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival. *Cell Mol Life Sci* 66:1817-1829.
- Stachowiak EK, Fang X, Myers J, Dunham S, Stachowiak MK. 2003. cAMP-induced differentiation of human neuronal progenitor cells is mediated by nuclear fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1). *J Neurochem* 84:1296-1312.
- Stachowiak MK, Maher PA, Joy A, Mordechai E, Stachowiak EK. 1996a. Nuclear accumulation of fibroblast growth factor receptors is regulated by multiple signals in adrenal medullary cells. *Mol Biol Cell* 7:1299-1317.
- Stachowiak MK, Maher PA, Joy A, Mordechai E, Stachowiak EK. 1996b. Nuclear localization of functional FGF receptor 1 in human astrocytes suggests a novel mechanism for growth factor action. *Brain Res Mol Brain Res* 38:161-165.
- Stauber DJ, DiGabriele AD, Hendrickson WA. 2000. Structural interactions of fibroblast growth factor receptor with its ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:49-54.
- Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ, Wahl GM. 1999. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J* 18:1660-1672.
- Strasser A, Harris AW, Huang DC, Krammer PH, Cory S. 1995. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J* 14:6136-6147.
- Sun C, Cai M, Gunasekera AH, Meadows RP, Wang H, Chen J, Zhang H, Wu W, Xu N, Ng SC, Fesik SW. 1999. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature* 401:818-822.
- Sun P, Watanabe H, Takano K, Yokoyama T, Fujisawa J, Endo T. 2006. Sustained activation of M-Ras induced by nerve growth factor is essential for neuronal differentiation of PC12 cells. *Genes Cells* 11:1097-1113.
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. 2001. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8:613-621.
- Tajrishi MM, Tuteja R, Tuteja N. 2011. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun Integr Biol* 4:267-275.
- Takahashi JA, Mori H, Fukumoto M, Igarashi K, Jaye M, Oda Y, Kikuchi H, Hatanaka M. 1990. Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5710-5714.
- Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC. 1998. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 273:7787-7790.
- Takimoto R, El-Deiry WS. 2000. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene* 19:1735-1743.
- Tan X, Martin SJ, Green DR, Wang JY. 1997. Degradation of retinoblastoma protein in tumor necrosis factor- and CD95-induced cell death. *J Biol Chem* 272:9613-9616.
- Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W. 2008. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* 133:612-626.
- Tarantini F, LaVallee T, Jackson A, Gamble S, Mouta Carreira C, Garfinkel S, Burgess WH, Maciag T. 1998. The extravesicular domain of synaptotagmin-1 is released with the latent fibroblast growth factor-1 homodimer in response to heat shock. *J Biol Chem* 273:22209-22216.
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74:845-853.

- Tavormina PL, Bellus GA, Webster MK, Bamshad MJ, Fraley AE, McIntosh I, Szabo J, Jiang W, Jabs EW, Wilcox WR, Wasmuth JJ, Donoghue DJ, Thompson LM, Francomano CA. 1999. A novel skeletal dysplasia with developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys650Met mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *Am J Hum Genet* 64:722-731.
- Taylor WR, Greenberg AH, Turley EA, Wright JA. 1993. Cell motility, invasion, and malignancy induced by overexpression of K-FGF or bFGF. *Exp Cell Res* 204:295-301.
- Tekin M, Hisimi BO, Fitoz S, Ozdag H, Cengiz FB, Sirmaci A, Aslan I, Inceoglu B, Yuksel-Konuk EB, Yilmaz ST, Yasun O, Akar N. 2007. Homozygous mutations in fibroblast growth factor 3 are associated with a new form of syndromic deafness characterized by inner ear agenesis, microtia, and microdontia. *Am J Hum Genet* 80:338-344.
- Thisse B, Thisse C. 2005. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol* 287:390-402.
- Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
- Thorns V, Walter GF, Licastro F. 2002. Effects of IL6 and IL1beta on aFGF expression and excitotoxicity in NT2N cells. *J Neuroimmunol* 127:22-29.
- Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, Abraham RT. 1999. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13:152-157.
- Togari A, Dickens G, Kuzuya H, Guroff G. 1985. The effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *J Neurosci* 5:307-316.
- Tomita Y, Marchenko N, Erster S, Nemajerova A, Dehner A, Klein C, Pan H, Kessler H, Pancoska P, Moll UM. 2006. WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem* 281:8600-8606.
- Tomlinson DC, Baldo O, Harnden P, Knowles MA. 2007. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J Pathol* 213:91-98.
- Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, Maekawa M, Nishida E. 2004. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell* 7:33-44.
- Touriol C, Bornes S, Bonnal S, Audigier S, Prats H, Prats AC, Vagner S. 2003. Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons. *Biol Cell* 95:169-178.
- Tsang M, Dawid IB. 2004. Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Sci STKE* 2004:pe17.
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226:1097-1099.
- Tulin S, Stathopoulos A. 2010. Extending the family table: Insights from beyond vertebrates into the regulation of embryonic development by FGFs. *Birth Defects Res C Embryo Today* 90:214-227.
- Unger T, Juven-Gershon T, Moallem E, Berger M, Vogt Sionov R, Lozano G, Oren M, Haupt Y. 1999. Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J* 18:1805-1814.
- Van den Berghe L, Laurell H, Huez I, Zanibellato C, Prats H, Bugler B. 2000. FIF [fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-interacting-factor], a nuclear putatively antiapoptotic factor, interacts specifically with FGF-2. *Mol Endocrinol* 14:1709-1724.
- van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. 2002a. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 9:1031-1042.

- van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenabeele P. 2001. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* 8:1136-1142.
- van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W, Vandenabeele P. 2002b. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 9:20-26.
- van Swieten JC, Brusse E, de Graaf BM, Krieger E, van de Graaf R, de Koning I, Maat-Kievit A, Leegwater P, Dooijes D, Oostra BA, Heutink P. 2003. A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia [corrected]. *Am J Hum Genet* 72:191-199.
- Vayssiere JL, Petit PX, Risler Y, Mignotte B. 1994. Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11752-11756.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53.
- Vousden KH, Prives C. 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137:413-431.
- Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, et al. 1994. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78:343-352.
- Wang J, Stockton DW, Ittmann M. 2004. The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression. *Clin Cancer Res* 10:6169-6178.
- Wanner G, Mayer C, Kehlbach R, Rodemann HP, Dittmann K. 2008. Activation of protein kinase Cepsilon stimulates DNA-repair via epidermal growth factor receptor nuclear accumulation. *Radiother Oncol* 86:383-390.
- Warnick CT, Dabbas B, Ford CD, Strait KA. 2001. Identification of a p53 response element in the promoter region of the hMSH2 gene required for expression in A2780 ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 276:27363-27370.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292:727-730.
- Wesche J, Haglund K, Haugsten EM. 2011. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J* 437:199-213.
- Wesche J, Malecki J, Wiedlocha A, Skjerpen CS, Claus P, Olsnes S. 2006. FGF-1 and FGF-2 require the cytosolic chaperone Hsp90 for translocation into the cytosol and the cell nucleus. *J Biol Chem* 281:11405-11412.
- Widmann C, Gerwins P, Johnson NL, Jarpe MB, Johnson GL. 1998. MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 18:2416-2429.
- Wiedlocha A, Falnes PO, Madshus IH, Sandvig K, Olsnes S. 1994. Dual mode of signal transduction by externally added acidic fibroblast growth factor. *Cell* 76:1039-1051.
- Wiedlocha A, Falnes PO, Rapak A, Munoz R, Klingenberg O, Olsnes S. 1996. Stimulation of proliferation of a human osteosarcoma cell line by exogenous acidic fibroblast growth factor requires both activation of receptor tyrosine kinase and growth factor internalization. *Mol Cell Biol* 16:270-280.

- Wiedlocha A, Nilsen T, Wesche J, Sorensen V, Malecki J, Marcinkowska E, Olsnes S. 2005. Phosphorylation-regulated nucleocytoplasmic trafficking of internalized fibroblast growth factor-1. *Mol Biol Cell* 16:794-810.
- Wiedlocha A, Sorensen V. 2004. Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol* 286:45-79.
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315:856-859.
- Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, et al. 1994. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370:270-275.
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139:1281-1292.
- Wu S, Wu X, Zhu W, Cai WJ, Schaper J, Schaper W. 2010. Immunohistochemical study of the growth factors, aFGF, bFGF, PDGF-AB, VEGF-A and its receptor (Flk-1) during arteriogenesis. *Mol Cell Biochem* 343:223-229.
- Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. 1993. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7:1126-1132.
- Wu Y, Mehew JW, Heckman CA, Arcinas M, Boxer LM. 2001. Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 20:240-251.
- Wyllie AH. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-556.
- Xia W, Wei Y, Du Y, Liu J, Chang B, Yu YL, Huo LF, Miller S, Hung MC. 2009. Nuclear expression of epidermal growth factor receptor is a novel prognostic value in patients with ovarian cancer. *Mol Carcinog* 48:610-617.
- Yamaguchi TP, Harpal K, Henkemeyer M, Rossant J. 1994. fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev* 8:3032-3044.
- Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Beger HG, Uchida E, Onda M, Kobrin MS, Korc M. 1993. Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res* 53:5289-5296.
- Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML, Du C. 2003. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* 17:1487-1496.
- Yoshimura N, Sano H, Hashiramoto A, Yamada R, Nakajima H, Kondo M, Oka T. 1998. The expression and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in human breast cancer. *Clin Immunol Immunopathol* 89:28-34.
- Yu C, Wang F, Kan M, Jin C, Jones RB, Weinstein M, Deng CX, McKeehan WL. 2000. Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. *J Biol Chem* 275:15482-15489.
- Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B. 2001. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 7:673-682.
- Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, Nakada S, Utsugisawa T, Shioya H, Utsugisawa Y, Yokoyama K, Weichselbaum R, Shi Y, Kufe D. 1999. Role for p300 in stabilization of p53 in the response to DNA damage. *J Biol Chem* 274:1883-1886.
- Zaharieva BM, Simon R, Diener PA, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Rist M, Wilber K, Hering F, Schonenberger A, Flury R, Jager P, Fehr JL, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G, Toncheva DI. 2003. High-throughput tissue microarray analysis of 11q13 gene amplification (CCND1, FGF3, FGF4, EMS1) in urinary bladder cancer. *J Pathol* 201:603-608.

- Zakrzewska M, Sorensen V, Jin Y, Wiedlocha A, Olsnes S. 2011. Translocation of exogenous FGF1 into cytosol and nucleus is a periodic event independent of receptor kinase activity. *Exp Cell Res* 317:1005-1015.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere JL, Petit PX, Kroemer G. 1995. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med* 181:1661-1672.
- Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace AJ, Jr. 1999. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18:2892-2900.
- Zhan X, Hu X, Friedman S, Maciag T. 1992. Analysis of endogenous and exogenous nuclear translocation of fibroblast growth factor-1 in NIH 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 188:982-991.
- Zhan X, Hu X, Friesel R, Maciag T. 1993. Long term growth factor exposure and differential tyrosine phosphorylation are required for DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells. *J Biol Chem* 268:9611-9620.
- Zhang L, Kharbanda S, McLeskey SW, Kern FG. 1999. Overexpression of fibroblast growth factor 1 in MCF-7 breast cancer cells facilitates tumor cell dissemination but does not support the development of macrometastases in the lungs or lymph nodes. *Cancer Res* 59:5023-5029.
- Zhang X, Bao L, Yang L, Wu Q, Li S. 2012. Roles of intracellular fibroblast growth factors in neural development and functions. *Sci China Life Sci* 55:1038-1044.
- Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. 2006. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* 281:15694-15700.
- Zhang Y, Moheban DB, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA. 2000. Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci* 20:5671-5678.
- Zhang Y, Xiong Y. 2001. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 292:1910-1915.
- Zhen Y, Sorensen V, Skjerpen CS, Haugsten EM, Jin Y, Walchli S, Olsnes S, Wiedlocha A. 2012. Nuclear import of exogenous FGF1 requires the ER-protein LRRC59 and the importins Kpnalpha1 and Kpnbeta1. *Traffic* 13:650-664.
- Zhong LT, Sarafian T, Kane DJ, Charles AC, Mah SP, Edwards RH, Bredesen DE. 1993. bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4533-4537.
- Zhou J, Ahn J, Wilson SH, Prives C. 2001. A role for p53 in base excision repair. *EMBO J* 20:914-923.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90:405-413.

Annexes



zVAD-fmk upregulates caspase-9 cleavage and activity in etoposide-induced cell death of mouse embryonic fibroblasts

Aida Rodríguez-Enfedaque, Elisabeth Delmas, Arnaud Guillaume, Sébastien Gaumer, Bernard Mignotte, Jean-Luc Vayssière, Flore Renaud *

Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 45 avenue des Etats-Unis, 78035 Versailles Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 December 2011
Received in revised form 4 May 2012
Accepted 10 May 2012
Available online 18 May 2012

Keywords:

Caspase-9
zVAD-fmk
p53-dependent cell death
Mouse embryonic fibroblast

ABSTRACT

Caspases are key effectors of programmed cell death. Down- and up-regulation of their activity are involved in different pathologies. In most cells, zVAD-fmk prevents apoptosis. However, unexpected effects of zVAD-fmk have been characterized in different laboratories, cell models and cell death processes. We have previously shown that zVAD-fmk accelerates p53-dependent apoptosis in rat embryonic fibroblasts. In this study, we pursued our investigations on zVAD-fmk effects and focused our study at the mitochondrial level in mouse embryonic fibroblasts (MEFs). In both primary and immortalized (by AgT or 3T9 protocol) MEFs, zVAD-fmk increased etoposide-induced loss of $\Delta\Psi_m$. This increase correlated with an increase of the number of apoptotic cells in primary and 3T9 MEFs, but did not in AgT MEFs. In both types of immortalized MEFs, zVAD-fmk regulated neither p53 levels nor transcriptional activities, suggesting that zVAD-fmk acts downstream of p53. In MEFs, zVAD-fmk increased p53-dependent loss of $\Delta\Psi_m$, cytochrome c release and caspase-9 activity. Indeed, zVAD-fmk inhibited effector caspases (caspases-3, -6, -7) as expected but increased caspase-9 cleavage and activity in etoposide-treated MEFs. Q-VD-OPh, another caspase inhibitor, also increased both loss of $\Delta\Psi_m$ and caspase-9 cleavage in etoposide-treated MEFs. Invalidation of *bax* and *bak* suppressed p53-dependent cell death and zVAD-fmk regulation of this process. Invalidation of *caspase-9* did not inhibit mitochondrial membrane depolarization but suppressed zVAD-fmk amplification of this process. Altogether, our data suggest that caspase-9 activity is up-regulated by zVAD-fmk and is involved in an amplification loop of etoposide-induced cell death at the mitochondrial level in MEFs.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Programmed cell death (PCD) is a physiological process required for embryogenesis, metamorphosis, tissue homeostasis and elimination of cells that are potentially detrimental to the organism. Misregulation of PCD has been implicated in many pathologies, such as cancers, neurodegenerative and autoimmune diseases [1,2]. Different types of PCD have been described including apoptosis, necrosis and autophagy, which diverge on criteria such as the initiating death signals, morphological alterations, mitochondrial events, protease and/or nuclease activations, as well as functional and immunological aspects [3,4]. We focused our study on mitochondrial-dependent cell death induced by the tumor suppressor p53. In response to stresses such as DNA damages, oncogene activation or hypoxia, the transcription factor p53 induces the intrinsic pathway of apoptosis [5,6] by trans-activating genes encoding proteins involved in the induction of apoptosis, such

as proapoptotic Bcl-2 family members (Bax, Puma or noxa) [7,8]. These proteins as well as p53 itself [9] can induce mitochondrial modifications, such as mitochondrial internal membrane depolarization and outer membrane permeabilization. These modifications induce the release of apoptogenic proteins, including cytochrome c and Smac/DIABLO, from the mitochondrial inter-membrane space to the cytosol. Cytochrome c release results in the formation of the apoptosome, a large complex composed of cytochrome c, ATP/dATP, Apaf-1 and procaspase-9. The formation of this apoptosome requires the interaction of Apaf-1 and procaspase-9 via their respective CARD domain, and activates the initiator caspase-9, which in turn activates effector caspases (caspase-3, -6 and -7) [10,11]. Smac/DIABLO cooperates to the regulation of the apoptotic process by neutralizing the caspase-3, -7, -9 inhibitor XIAP in the cytosol [12,13]. In some cell types, p53 also regulates the extrinsic apoptotic pathway by controlling the expression of genes coding for death receptor family members. This pathway is activated by death receptors able to cross-activate the intrinsic pathway via the caspase-8-dependent cleavage of Bid, a proapoptotic Bcl-2 family member [14].

A molecular hallmark of apoptosis is the activation of caspases, cysteine proteases that execute cell death through the cleavage of a broad

* Corresponding author at: Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589 UVSQ/EPHE, 45 avenue des Etats-Unis, 78035 Versailles, France. Tel.: +33 1 39253658; fax: +33 1 39253655.

E-mail address: flore.renaud@uvsq.fr (F. Renaud).

spectrum of cellular protein targets after an Asp residue [11,15–17]. Apoptotic caspases can be classified as initiator (caspase-2, -8, -9, -10) or effector caspases (caspase-3, -6, -7). The classical apoptotic pathways require a sequential activation of initiator caspases (requiring adapter proteins) and effector caspases (cleaved by activated initiator or effector caspases). Most of the studies on both the function and the regulation of caspases have been performed using pharmacological inhibitors [18]. Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone (zVAD-fmk) is the most used cell permeable broad-caspase inhibitor. In most of the cells, zVAD-fmk prevents the apoptotic process. However, we have previously shown that zVAD-fmk increases p53-dependent cell death in rat embryonic fibroblasts [19–21]. In RETsAFs, a rat embryonic fibroblast cell line immortalized with a temperature-sensitive mutant (tsA58) of the simian virus 40 large tumor antigen (AgT), we have shown that p53-dependent cell death in the presence of zVAD-fmk diverges from the classical pathway. This cell death process induced in the presence of zVAD-fmk could not be inhibited by Bcl-2 overexpression, in contrast to the classical pathway [19,21]. Furthermore, we have shown that zVAD-fmk could modify p53-transcriptional activities in these cells. Indeed, p53-dependent trans-activation was decreased while p53-dependent trans-repression was increased in the presence of zVAD-fmk as shown by the study of p53 target gene expression and microarray analysis [20]. Different laboratories presented evidences that zVAD-fmk can induce switches between apoptotic, necrotic and autophagic cell deaths [22,23] and that zVAD-fmk cannot prevent all types of caspase-dependent apoptosis [19–21,24,25]. These unexpected effects of zVAD-fmk were detected on different cell death pathways, in different cell types and after different cell death stimuli. Altogether, these results suggest that the inability of zVAD-fmk to prevent some apoptotic cell deaths or to induce a switch in the cell death process might be due to the fact that this inhibitor does not inhibit all caspases to the same extent. To test this hypothesis and to progress in the comprehension of zVAD-fmk effect on p53-dependent cell death, we pursued our investigations on the zVAD-fmk effect in mouse embryonic fibroblasts (MEFs), in primary cultures and in immortalized cell lines issued from wild type, *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-} and *caspase-9*^{-/-} mice. In the present study, we show that: (i) zVAD-fmk accelerates mitochondrial membrane depolarization and cytochrome c release occurring during etoposide-induced cell death; (ii) although zVAD-fmk classically inhibited effector caspases, it did not inhibit the initiator caspase-9 but in contrast it induced the accumulation of the active form of this caspase; and (iii) caspase-9 induces a mitochondrial amplification loop during etoposide-induced cell death in MEFs.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and drugs

Primary cultures of mouse embryonic fibroblasts (primary MEFs) were a generous gift from Alice Jouneau (INRA, Jouy-en-Josas, France). Established cell lines from wild type (3T9 MEFs) and *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-} (DKO 3T9 MEFs) mouse embryonic fibroblasts were a generous gift from Peter Daniel (Clinical and Molecular Oncology, University Medical Center Charité, Berlin, Germany). SV40 Antigen T immortalized MEFs from wild type (AgT MEFs) and *Caspase-9*^{-/-} (C9KO AgT MEFs) mice were a generous gift from Richard Flavell (Yale School of Medicine, Department of Immunology, New Haven, USA). MEFs were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% (3T9, AgT, C9KO AgT and primary MEFs, HeLa cells) or 15% (DKO 3T9 MEFs) fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 1% Glutamax at 37 °C in 5% CO₂ humidified atmosphere. Etoposide (50 µg/ml, Sigma), which is an inhibitor of Topoisomerase II and a DNA damage-inducing drug, was used to induce p53-dependent cell death. zVAD-fmk (50 µM, Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone, Bachem) and Q-VD-OPh (20 µM, Quinolyl-Val-Asp-OPh, Biovision) were used as caspase inhibitors.

2.2. Flow cytometry analysis of cell death

Cells were plated in 12-well plates at a density of 7.10⁴ cells/ml. At 70% confluence, different treatments (etoposide, zVAD-fmk and/or Q-VD-OPh) were performed. Both attached and floating cells were collected and analyzed by flow cytometry after DiOC₆(3) and propidium iodide (PI) staining as previously described [26]. Three parameters were examined: the DiOC₆(3) staining (representative of the mitochondrial membrane potential, ΔΨ_m), cell size (representative of the condensation of the cells), and the PI staining (representative of primary or secondary necrotic cells). In this study, we focused our attention on: cells with low ΔΨ_m which correspond to cells with low DiOC₆(3) and low PI staining cells; and, apoptotic cells which correspond to cells with small cell size, low DiOC₆(3) and low PI staining cells. MitoTracker® Red CMXRos was used to analyze the mitochondrial membrane potential of transfected cells. Cells were incubated with 150 nM MitoTracker® Red CMXRos for 30 min at 37 °C before flow cytometry analysis.

2.3. ROS production analysis by flow cytometry

3T9 MEFs cells and HeLa cells were plated in 12-well plates at a density of 7.10⁴ cells/ml. At 70% confluence, etoposide and/or zVAD-fmk treatments were performed and reactive oxygen species (ROS) production was evaluated by flow cytometry after DCFH-DA staining as previously described (Dumay et al., 2006).

2.4. RT-PCR assay

At 70% confluence, 3T9 MEFs were incubated with or without etoposide +/- zVAD-fmk. After 16 h of treatment, total RNA was isolated using the guanidium isothiocyanate method. RT-PCR was performed to examine the levels of p53, mdm2, p21 and noxa mRNAs as previously described [26]. RT-PCR of 18S rRNA was used as a control.

2.5. Cytosol fraction preparation

At 70% confluence, 3T9 MEFs were incubated with etoposide +/- zVAD-fmk for different treatment times (0, 4, 8, 12, 16 and 19 h). Attached and floating cells were collected and centrifuged 5 min at 200 g. Pellets were resuspended in 200 µl of Lysis buffer (10 mM HEPES-KOH pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM sucrose, 1 mM protease inhibitor cocktail AEBSF (Roche)). After 30 min incubation at 4 °C, cell disruption was completed by passing the cells through a 0.4 × 20 mm needle 10 times. 1/3 of the extract was conserved as the total extract, 2/3 of the extract was centrifuged for 5 min at 4 °C at 52 g to eliminate nuclei. The supernatant was further centrifuged 30 min at 4 °C at 7000 g to eliminate mitochondria and reticulum. The supernatant corresponded to the cytosol fraction and was analyzed by Western blot.

2.6. Western blot analysis

At 70% confluence, MEFs were incubated with or without etoposide, zVAD-fmk and/or Q-VD-OPh. After different treatment times, cells were harvested, lysed and frozen at -20 °C. Proteins (10–30 µg), from total cell extracts or from cytosolic extracts, were separated in NuPAGE 4–12% Bis-Tris polyacrylamide gels according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) and transferred onto a PVDF membrane (Millipore). The primary antibodies used were anti-p53 (Pab 122, gift from E. May, IRSC, Villejuif, France), anti-phospho-p53 (Ser-15, Cell Signaling), anti-actin (Sigma), anti-cytochrome c (BD Pharmingen), anti-VDAC (gift from C. Brenner, UVSQ, Versailles, France), anti-lamin A/C (Cell Signaling), anti-enolase (gift from N. Lamande, College de France, Paris), anti-caspase-9 (5B4, Abcam), anti-cleaved caspase-3 (Asp175, Cell Signaling), anti-cleaved caspase-6 (Asp162, Cell Signaling), and anti-tubulin (MAS078, Sera-Lab). Secondary antibodies (peroxidase-

conjugated) were anti-rabbit, anti-mouse or anti-rat immunoglobulin (Biosystem). Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using the Immobilon kit (Millipore).

2.7. Immunocytochemistry

3T9 MEFs were plated onto glass coverslips in complete medium. At 60% confluence, cells were incubated with or without etoposide and/or zVAD-fmk. Immunocytochemistry analysis was performed as previously described [26]. In the present study, we used a mouse monoclonal anti-cytochrome c (BD Bioscience) as primary antibody and a FITC-conjugated anti-mouse antibody (Jackson Immuno-Research Laboratory) as secondary antibody. Nuclei were stained with Hoechst 33342. Immunolabeled cells were examined by epifluorescence under a DMR Leica microscope equipped with an Olympus DP70 photo camera using the DP Manager software.

2.8. Caspase-3/7 and caspase-9 activity assays

The Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay and the Caspase-Glo™ 9 Assay (Promega) were used to detect caspase-3/-7 and caspase-9 activities in 3T9 MEFs treated with etoposide +/- zVAD-fmk according to the manufacturer's instructions.

2.9. Cell transfection

Caspase-9 KO AgT MEFs were plated in 12-well plates for flow cytometry analysis, and in 60 mm diameter plates for Western-blot analysis at a density of 10^5 cells/ml. At 80% confluence, cells were transfected with 125 ng (for 12-well plate) or 1 μ g (for 60 mm plate) pCDNA₃-caspase-9 expression vector in the presence of Lipofectamine™ Transfection Reagent and PLUS™ Reagent in DMEM (Invitrogen) and incubated for 5 h at 37 °C according to the manufacturer's instructions. Human caspase-9 expression vector was a generous gift from Patrick Melhen (Apoptosis, Cancer and Development Laboratory, Centre Léon Bérard, Lyon, France). After 24 h of culture in complete medium, transfected cells were incubated with etoposide for 16 h. Then, the mitochondrial membrane potential was analyzed by flow cytometry after Mito Tracker Red CMXRos staining and cell lysates were analyzed by Western-blot as previously described.

2.10. Statistical analysis

Each bar of the different graphs indicates the average measure and standard error of at least three independent experiments, and *P*-values are from paired two-tailed Student's *t*-tests.

3. Results

3.1. zVAD-fmk increases etoposide-induced mitochondrial membrane depolarization in MEFs

In order to test the effect of zVAD-fmk on p53-dependent apoptosis in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) that are either spontaneously immortalized (3T9 MEFs [27]), immortalized by transfection of SV40 AgT (AgT MEFs) or not immortalized (primary MEFs), we used etoposide, a DNA damage-inducing drug, to activate p53. The cell death process induced by etoposide in the presence or absence of zVAD-fmk was analyzed by flow cytometry after DiOC₆(3) and propidium iodide (PI) staining (Fig. 1). Apoptotic cells corresponded to the cells with three characteristics: low PI staining to exclude primary and secondary necrotic cells, low DiOC₆(3) staining indicating a low mitochondrial membrane potential $\Delta\Psi_m$, and low cell size (*i.e.* condensing cells). In AgT MEFs, etoposide increased the percentage of apoptotic cells and the addition of zVAD-fmk classically decreased this effect (Fig. 1A). In 3T9 MEFs and in primary MEFs,

zVAD-fmk surprisingly increased the percentage of apoptotic cells (Fig. 1B, C). The effect of zVAD-fmk was more pronounced (earlier and higher) in primary MEFs than in the established cell line 3T9 MEFs, suggesting a physiological relevance of this process. Then, we analyzed the percentage of cells with low $\Delta\Psi_m$ (whatever the cell size) in the three types of MEFs. zVAD-fmk increased the percentage of cells with low $\Delta\Psi_m$ in primary and immortalized MEFs. Thus, these results suggest that: (i) zVAD-fmk differently affected late events of apoptosis, in particular cell condensation, depending on the immortalized state, and (ii) zVAD-fmk accelerates the decrease of mitochondrial membrane potential in the three types of MEFs by acting either upstream or at the level of mitochondrial events.

zVAD-fmk has been reported to switch between different cell death modes (apoptosis, necrosis, autophagy, ...) [22,23,28]. In etoposide-treated MEFs, zVAD-fmk did not significantly increase necrosis, autophagy and LEI/L-DNase II caspase-independent cell death (data not shown). Only apoptosis was detected to be regulated by zVAD-fmk in this cellular model.

3.2. zVAD-fmk does not modify p53 transcriptional activity after etoposide treatment in 3T9 MEFs

We have previously shown that zVAD-fmk modifies both p53 stability and p53-transcriptional activities in rat embryonic fibroblasts [20,21]. Therefore, we examined the status of p53 (mRNA and protein levels) and some of its targets (at the mRNA level) in the presence or absence of etoposide and/or zVAD-fmk in mouse embryonic fibroblasts. In 3T9 MEFs, addition of etoposide and/or zVAD-fmk did not modify the levels of p53 mRNAs and protein (Fig. 2). In contrast, addition of etoposide induced an increase of the level in serine 15-phosphorylated p53 (Fig. 2B) as well as in mdm2, p21 and noxa mRNA levels (Fig. 2A), showing that etoposide induces p53-transcriptional activity. The addition of zVAD-fmk modified neither the p53 levels nor the mRNA levels of p53 targets in the presence of etoposide, suggesting that zVAD-fmk does not regulate p53-transcriptional activity in 3T9 MEFs. Altogether, these results suggest that zVAD-fmk increases mitochondrial membrane depolarization downstream of p53 transcriptional activity in mouse embryonic fibroblasts after etoposide treatment.

3.3. Bax and/or Bak are involved in etoposide-induced cell death in the presence or absence of zVAD-fmk

We then examined the possible involvement of Bax/Bak or reactive oxygen species (ROS) accumulation in the cell death process occurring in 3T9 MEFs after etoposide treatment in the absence or in the presence of zVAD-fmk.

To determine whether Bax and Bak are required for etoposide-induced cell death and for the regulation of this process by zVAD-fmk, we used DKO 3T9 MEFs (Bax^{-/-}Bak^{-/-} double knockout MEFs [29]). Mitochondrial membrane depolarization, as assessed by flow cytometric $\Delta\Psi_m$ analysis, induced by etoposide in the presence or absence of zVAD-fmk in 3T9 MEFs (after 16 h of treatment) was not detected in DKO 3T9 MEFs even after longer treatments (16 and 45 h of treatment) (Fig. 3A). Our results show that Bax and/or Bak are required for etoposide-induced loss of $\Delta\Psi_m$ and for zVAD-fmk-induced increase of this depolarization in mouse embryonic fibroblasts.

ROS accumulation could be involved in mitochondrial-membrane potential collapse and cell death. Thus, we examined ROS production induced by etoposide in 3T9 MEF cells in the absence or presence of zVAD-fmk by flow cytometry after DCFH-DA staining. Whatever the treatment (etoposide +/- zVAD-fmk), DCF positive 3T9 MEFs could not be detected by flow cytometry in contrast to DCF positive etoposide-treated HeLa cells, which were used as positive control (Fig. 3B). This result suggests that etoposide in the presence or absence

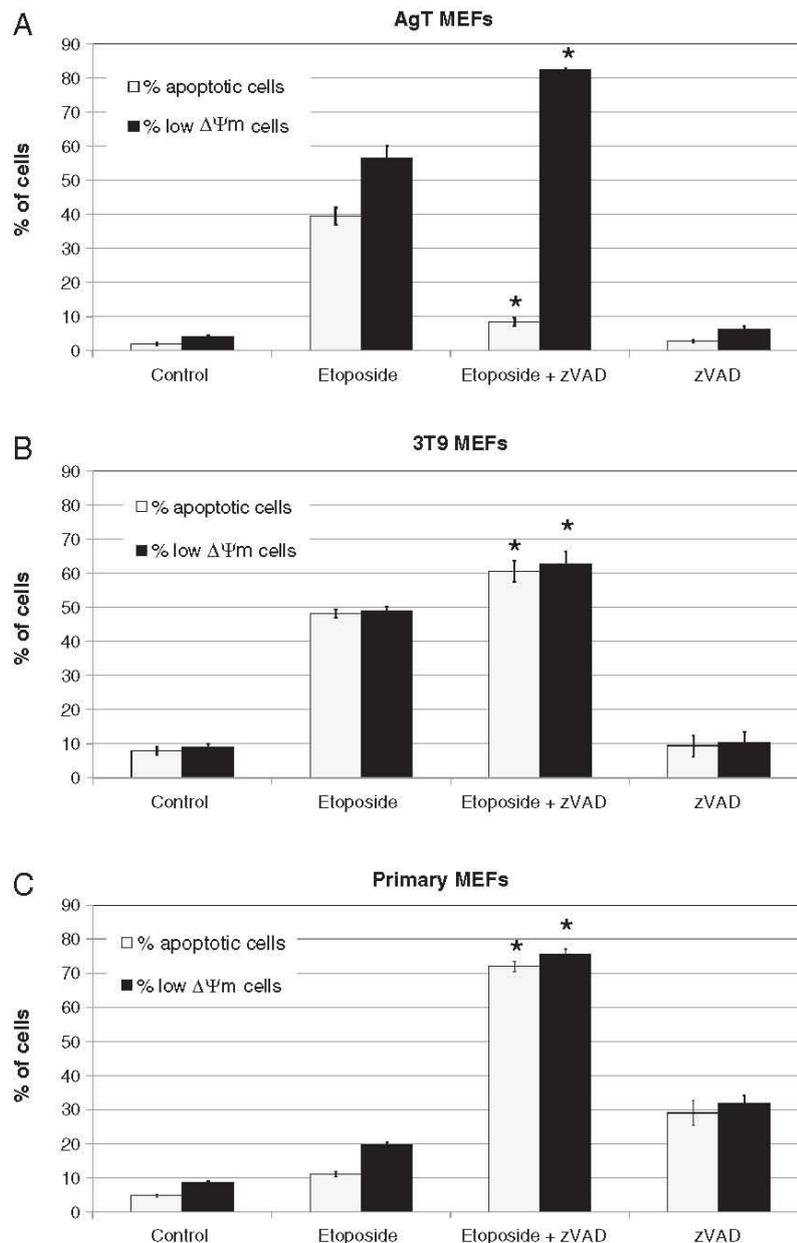


Fig. 1. zVAD-fmk increases mitochondrial membrane depolarization in MEFs after etoposide treatment. AgT MEFs (A), 3T9 MEFs (B) and primary MEFs (C) were untreated or treated with etoposide, both etoposide and zVAD-fmk or zVAD-fmk. After 16 h (for AgT and 3T9 MEFs) or 12 h (for primary MEFs) of treatment, all the cells (attached and floating) were analyzed by flow cytometry after DiOC₆(3) and PI staining. Apoptotic cells are characterized by a low PI staining to exclude primary and secondary necrotic cells, a low DiOC₆(3) staining that correlates with low mitochondrial membrane potential $\Delta\Psi_m$ and a low cell size that reveals cell condensation and late apoptotic events. Cells with low $\Delta\Psi_m$ display a low PI and low DiOC₆(3) staining whatever the size of the cells. Average and Student's *t* tests were performed to compare etoposide versus etoposide and zVAD-fmk (**p* < 0.05).

of zVAD-fmk does not activate ROS production in mouse embryonic fibroblasts.

3.4. zVAD-fmk increases cytochrome *c* release after etoposide-treatment

We then examined the release of cytochrome *c* from mitochondria to the cytosol after etoposide-treatment in the presence or absence of zVAD-fmk in 3T9 MEFs. Immunocytochemistry experiments show that cytochrome *c* was principally detected in the mitochondria in the absence of cell death inducer (Fig. 4A, B). After etoposide treatment, cytochrome *c* release to the cytosol was detected in about 10% of the cells. The addition of zVAD-fmk increased the percentage of cells with cytochrome *c* release in the presence of etoposide up to 34%. zVAD-fmk

alone had no effect on cytochrome *c* localization. After etoposide treatment in the presence or absence of zVAD-fmk, dying cells detached from the Petri dish. Thus, we analyzed the level of cytosolic cytochrome *c* in all cells (both attached and floating cells) after cytosolic extraction and Western-blot analysis (Fig. 4C). The detection of cytosolic enolase and the absence of detection of both mitochondrial VDAC and nuclear lamin A/C in the cytosolic fractions confirmed the efficiency of the enrichment. All these proteins could be detected in total cell extracts (control lanes). The amount of cytochrome *c* detected in the cytosolic fractions after etoposide treatment strongly increased in the presence of zVAD-fmk. Thus, we have shown that zVAD-fmk increases cytochrome *c* release after etoposide treatments in mouse embryonic fibroblasts by two experimental processes.

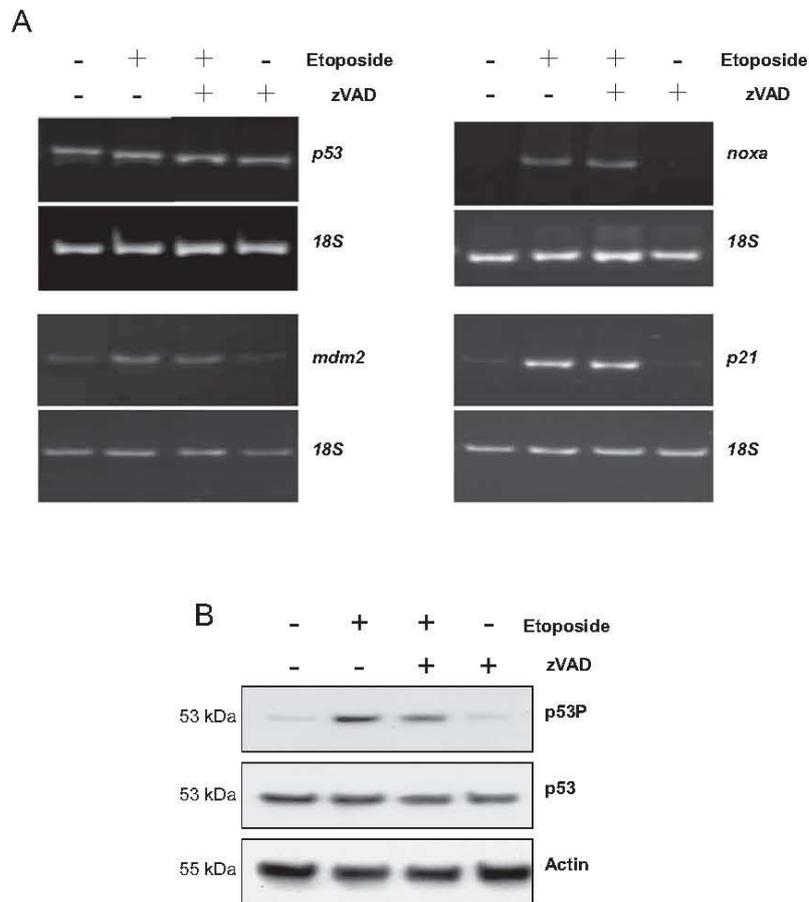


Fig. 2. zVAD-fmk does not affect p53 levels or p53 transcriptional activity in 3T9 MEFs. (A) RT-PCR analysis of p53, mdm2, noxa and p21 mRNAs in 3T9 MEFs incubated with etoposide +/- zVAD-fmk during 16 h. An 18S rRNA RT-PCR amplification is used as a control. (B) The levels of p53, p53P (Ser 15) and actin were detected by Western blot in 3T9 MEFs cultured as in (A).

3.5. zVAD-fmk upregulates initiator caspase-9 but downregulates effector caspases after etoposide treatment

In most of the cells, cytochrome c release induced the formation of the apoptosome and the activation of initiator caspase-9 and effector caspases (-3, -6 and -7). We studied the cleavage and activity status of these caspases in 3T9 MEFs treated with etoposide and/or zVAD-fmk. After etoposide treatment, cleaved forms of caspase-9, caspase-3 and caspase-6 were detected in 3T9 MEFs by Western-blot (Fig. 5A). Surprisingly, the addition of zVAD-fmk in the presence of etoposide increased the level of cleaved caspase-9, while zVAD-fmk modified caspase-3 cleavage and inhibited caspase-6 cleavage. An upper cleaved form of caspase-3 was detected in the presence of zVAD-fmk, which probably corresponded to an incompletely cleaved form of this caspase.

To determine whether the cleaved forms of caspase-9 and caspases-3 detected in the presence of etoposide and zVAD-fmk were functional, we measured caspase-9 and caspase-3/-7 activities. In 3T9 MEFs, the etoposide treatment increased both caspase-9 (Fig. 5B) and caspase-3/-7 (Fig. 5C) activities. Adding zVAD-fmk down-regulated caspase-3/-7 activity but, in contrast, up-regulated caspase-9 activity in mouse embryonic fibroblasts.

In most cells, caspase-6 is cleaved by active caspase-3. The absence of caspase-6 cleavage in the presence of etoposide and zVAD-fmk in 3T9 MEFs (Fig. 5A) suggested that caspase-6 is cleaved by caspase-3 in etoposide-treated MEF cells and that zVAD-fmk inhibited caspase-6 by inhibiting caspase-3. Etoposide treatment in the absence

of zVAD-fmk induced lamin A/C cleavage (a caspase-6 substrate) in 3T9 MEFs suggesting caspase-6 activation in this condition. Addition of zVAD-fmk inhibited both etoposide-induced caspase-6 activity and lamin A/C cleavage in 3T9 MEFs cells.

Altogether, our data showed that during etoposide-induced apoptosis, zVAD-fmk classically inhibited effector caspases in mouse embryonic fibroblasts but surprisingly, increased caspase-9 activity.

3.6. Q-VD-OPh increased etoposide-induced loss of $\Delta\Psi_m$ and caspase-9 cleavage in 3T9 MEFs

We tested another broad-spectrum caspase inhibitor, Q-VD-OPh in 3T9 MEFs. As zVAD-fmk, Q-VD-OPh increased etoposide-induced loss of mitochondrial membrane potential as assessed by flow cytometry analysis of $\Delta\Psi_m$ (Figs. 1B, 3A, 6A). We also showed by Western-blot (Fig. 6B) that Q-VD-OPh increased the level of etoposide-induced cleaved caspase-9 and modified caspase-3 cleavage, to the same extent as zVAD-fmk. Thus, using two different caspase inhibitors, zVAD-fmk and Q-VD-OPh, we demonstrated a correlation between the loss of $\Delta\Psi_m$ and caspase-9 cleavage in 3T9 MEFs.

3.7. Caspase-9 activates an amplification loop at the mitochondrial level

Our study suggests that caspase-9 is a key caspase in the mitochondrial membrane depolarization induced by etoposide in the presence of zVAD-fmk in 3T9 MEFs. In an attempt to progress in the characterization of its function, we analyzed the process induced by

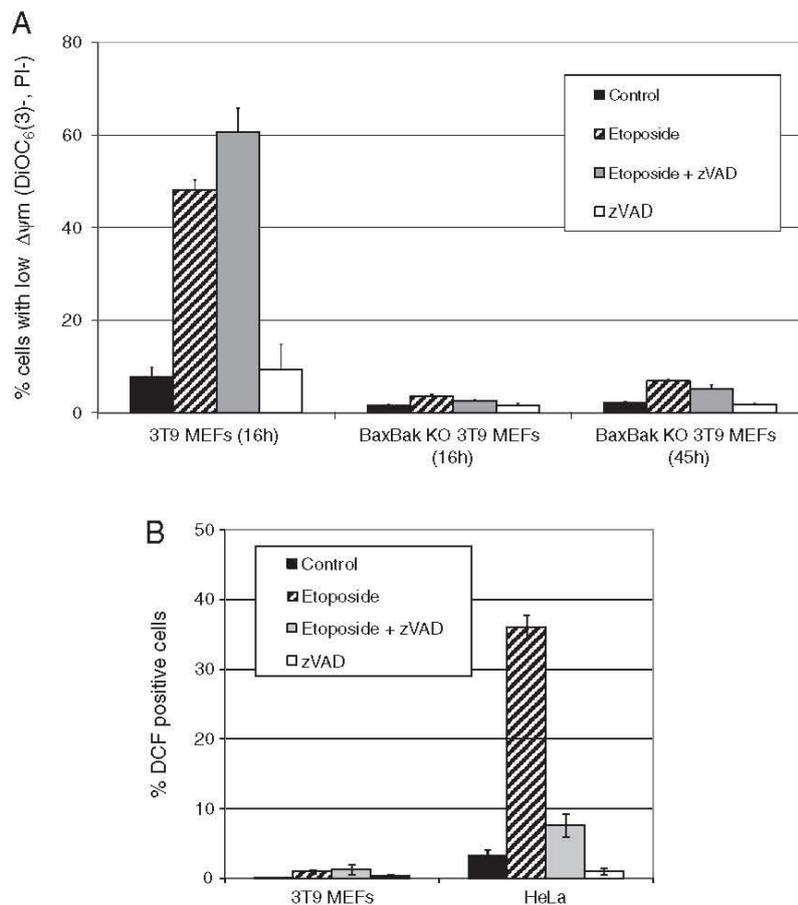


Fig. 3. Bax, Bak and PTP involvement in etoposide-induced loss of $\Delta\Psi_m$ in 3T9 MEFs in the presence or absence of zVAD-fmk. (A) 3T9 MEFs and DKO 3T9 MEFs (*Bax*^{-/-}*Bak*^{-/-} double knockout MEFs) were incubated with etoposide +/- zVAD-fmk for 16 or 45 h. Mitochondrial membrane depolarization was analyzed by flow cytometry after DiOC₆(3)/PI staining. (B) 3T9 MEFs and HeLa cells were incubated with etoposide +/- zVAD-fmk for 20 h and ROS production was evaluated by cytometry after DCF-DA staining.

etoposide in the presence or in the absence of zVAD-fmk in a mouse embryonic fibroblast cell line issued from *caspase-9* knock-out mice (*caspase-9*^{-/-} AgT MEFs).

First, we controlled that etoposide induces p53 transcriptional activity in *caspase-9*^{-/-} AgT MEFs to the same extent as in control AgT MEFs issued from wild type mice (Fig. 7A). Analysis by RT-PCR showed that etoposide in the presence or absence of zVAD-fmk induced a similar increase of noxa, mdm2 and p21 mRNA levels in both cell lines.

Then, we examined the status of caspase-9 and caspase-3 in these cell lines (Fig. 7B). In *caspase-9*^{-/-} AgT MEFs, no proform or cleaved caspase-9 was detected whatever the treatment in contrast to control AgT MEFs. In these control cells, zVAD-fmk increased the level of cleaved caspase-9 after etoposide treatment as previously shown in 3T9 MEFs. In *caspase-9*^{-/-} AgT MEFs, we did not detect cleaved caspase-3 whatever the treatment, showing that caspase-9 is required for caspase-3 activation in MEFs cells after etoposide treatment.

We further analyzed mitochondrial membrane depolarization by cytometry after DiOC₆(3) and PI staining (Fig. 7C). Etoposide treatment increased the percentage of cells loosing $\Delta\Psi_m$ at a similar level in both cell lines. The addition of zVAD-fmk in the presence of etoposide increased this effect in AgT MEFs. In *caspase-9*^{-/-} AgT MEFs, the percentage of cells with a loss of $\Delta\Psi_m$ after etoposide treatment was not modified by the presence of zVAD-fmk. Thus, although caspase-9 is not required for etoposide-dependent mitochondrial membrane depolarization, caspase-9 activity is required for the amplification of this process by zVAD-fmk.

To confirm that caspase-9 can induce an increase of mitochondrial membrane depolarization, we expressed caspase-9 in *caspase-9*^{-/-}

AgT MEFs by transfection and analyzed the loss of $\Delta\Psi_m$ in the absence or in the presence of etoposide in transfected cells (Fig. 7D, E). In the absence of etoposide, overexpression of caspase-9 (both proform and cleaved forms could be detected) induced loss of $\Delta\Psi_m$ to the same extent as etoposide-treated control cells. In the presence of etoposide, cleaved caspase-9 level increased as well as loss of $\Delta\Psi_m$ induced in *caspase-9* transfected cells. Thus, overexpression of caspase-9 in *caspase-9*^{-/-} AgT MEFs increased mitochondrial membrane depolarization induced by etoposide. Altogether, our data show that caspase-9, which was up-regulated by zVAD-fmk or by transfection, induces an amplification loop at the mitochondrial level of the cell death process induced by etoposide in MEFs.

4. Discussion

In the present study, we examined the effect of zVAD-fmk in etoposide-induced cell death in mouse embryonic fibroblasts and showed that zVAD-fmk can regulate this cell death process at the mitochondrial level. Indeed, zVAD-fmk increased etoposide-induced mitochondrial membrane depolarization in MEFs, whether the cells were immortalized (3T9 and AgT MEFs) or not (Figs. 1 and 7). The effect of zVAD-fmk on $\Delta\Psi_m$ was correlated with an increase in the number of apoptotic cells in primary and 3T9 MEFs. This correlation was not detected in AgT MEFs. However, longer etoposide treatment in the presence of zVAD-fmk induced late events of apoptosis, like cell size reduction and DNA fragmentation (data not shown). Our results suggest that immortalization of MEFs by the AgT could modify the level and/or the activity of factors involved in late events of the apoptotic process

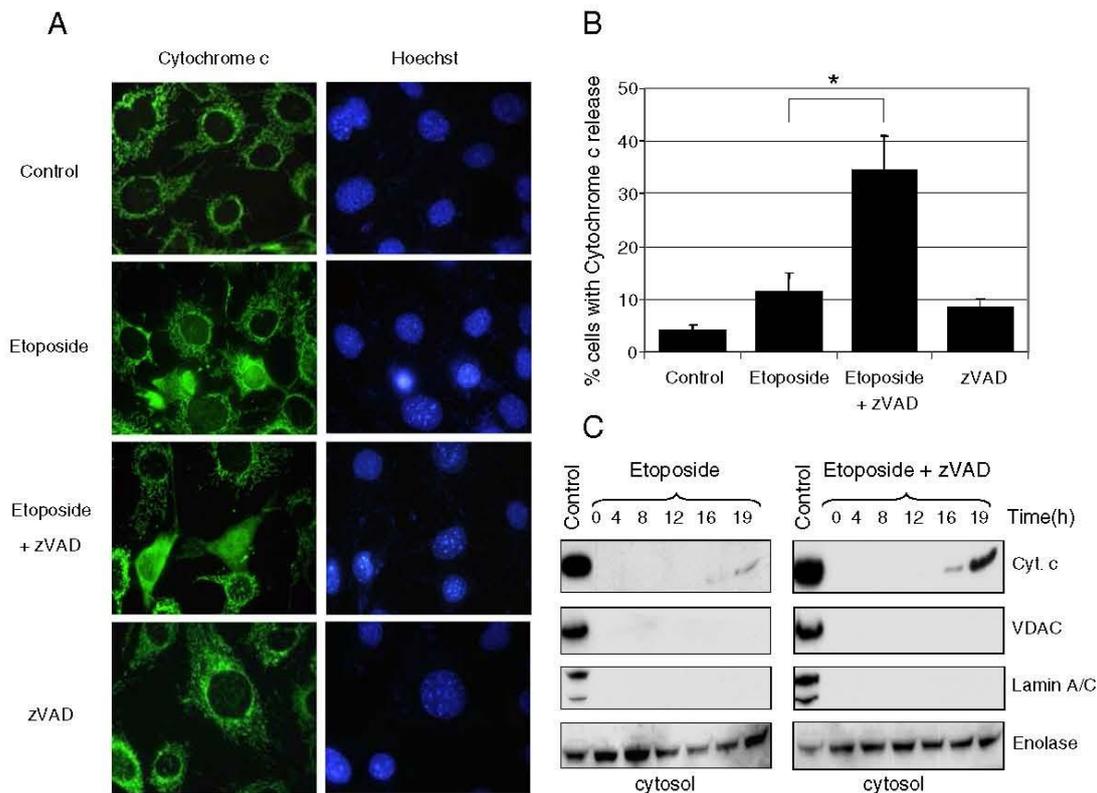


Fig. 4. zVAD-fmk increases cytochrome c release after etoposide-treatment in 3T9 MEFs. (A) 3T9 MEFs were incubated with etoposide +/- zVAD-fmk for 16 h. Immunostaining of cytochrome c (green) and nuclei labeling with Hoechst (blue) are presented. (B) The percentage of cells with released cytochrome c was quantified from immunocytochemistry experiments; 200 to 300 cells were analyzed for each treatment. Student's t tests were performed (* $p < 0.01$). (C) Cytosolic fractions were isolated from 3T9 MEFs treated with etoposide and/or zVAD-fmk for 0, 4, 8, 12, 16 or 19 h. Total cell extracts (control) and cytosolic fractions were analyzed by Western-blot to examine the levels of cytochrome c, VDAC, lamin A/C and enolase. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(nuclear and/or cell condensation) compared to primary MEFs. These modifications remain to be characterized.

In both immortalized MEFs (AgT and 3T9 MEFs), zVAD-fmk modified neither p53 mRNA and protein levels nor p53 transcriptional activities (in particular the trans-activation of *noxa*, *mdm2* and *p21*) induced in the presence of etoposide (Figs. 2 and 7). The regulations of p53-transcriptional activities induced by zVAD-fmk characterized in rat embryonic fibroblasts [20] were not detected in MEFs. These differences between both cellular models could reflect either differences in cellular contents between rat and mouse, or differences in the p53 induction mode (etoposide treatment in MEFs *versus* temperature increase in REtsAF cell lines). Our unpublished data are in favor of the first hypothesis. In etoposide-treated REtsAF cells, zVAD-fmk increased p53 stability and phosphorylation (Ser-15) as well as *puma* trans-activation (data not shown). These data suggest that the effect of zVAD-fmk on etoposide-induced cell death is located downstream of p53 regulation in MEFs. We thus focused our study on mitochondrial events and showed that zVAD-fmk accelerates the loss of $\Delta\Psi_m$, cytochrome c release in the cytosol and caspase-9 activation in etoposide-treated 3T9 MEFs (Figs. 1, 4, 5). We also showed that Bax and Bak are required for etoposide-induced loss of $\Delta\Psi_m$ in the absence or presence of zVAD-fmk, in contrast to ROS production that was not detected in MEF cells (Fig. 3). These data let us hypothesize that zVAD-fmk could induce an amplification loop of an etoposide-induced cell death at the mitochondrial level in MEFs.

Two presumed broad caspase inhibitors, zVAD-fmk and Q-VD-Oph, increased etoposide-induced loss of $\Delta\Psi_m$ in 3T9 MEFs (Figs. 1 and 6), suggesting that both drugs act *via* the regulation of caspase activities. The study of caspase activities by analysis of their cleavage, activity and/or the cleavage of specific targets after etoposide treatment in MEFs

(Figs. 5, 6, 7) showed that: (i) zVAD-fmk classically inhibited effector caspases (*i.e.* caspase-3, -6 and -7), (ii) zVAD-fmk did not inhibit the initiator caspase-9 and in contrast induced an increase of the active forms of this caspase, and (iii) Q-VD-Oph induced an accumulation of auto-cleaved caspase-9. One hypothesis to explain these data is that the catalytic site of the proform and the auto-cleaved form of caspase-9 could not be accessible to zVAD-fmk, and to Q-VD-Oph, due to their integration into the apoptosome and/or post-translational modifications (such as phosphorylation). Indeed, the activation of caspase-9 and its regulations are quite complex [11,16,30–34]. Caspase-9 is activated through autocatalytic intra-chain cleavages into the apoptosome, and at least two cleavages are involved in the generation of mature caspase-9. The pro-, auto-cleaved and mature forms present caspase activity. However, conformational and catalytic specificities of these forms differ. Two previous reports have shown that zVAD-fmk does not inhibit the auto-cleavage of procaspase-9 while it inhibits procaspase-3 cleavage by mature caspase-9 [32,35], suggesting that zVAD-fmk inhibits only mature forms of caspase-9. In the presence of etoposide, zVAD-fmk inhibited neither the auto-cleavage of procaspase-9 nor the processing of procaspase-3 by caspase-9, suggesting that zVAD-fmk does not inhibit any of the different forms of caspase-9 in MEFs. zVAD-fmk inhibited the last processing step of caspase-9, which requires caspase-3 activity and not caspase-9 activity. The increase in both auto-cleaved caspase-9 level and caspase-9 activity could be the result of an increase in the auto-cleavage process and/or the result of an inhibition of the degradation of cleaved caspase-9. zVAD-fmk increases mitochondrial membrane depolarization and cytochrome c release suggesting that it can result in an increase at the cell level in apoptosome activity and thus in an increase of auto-cleaved caspase-9 levels in the presence of zVAD-fmk. However, we cannot exclude the

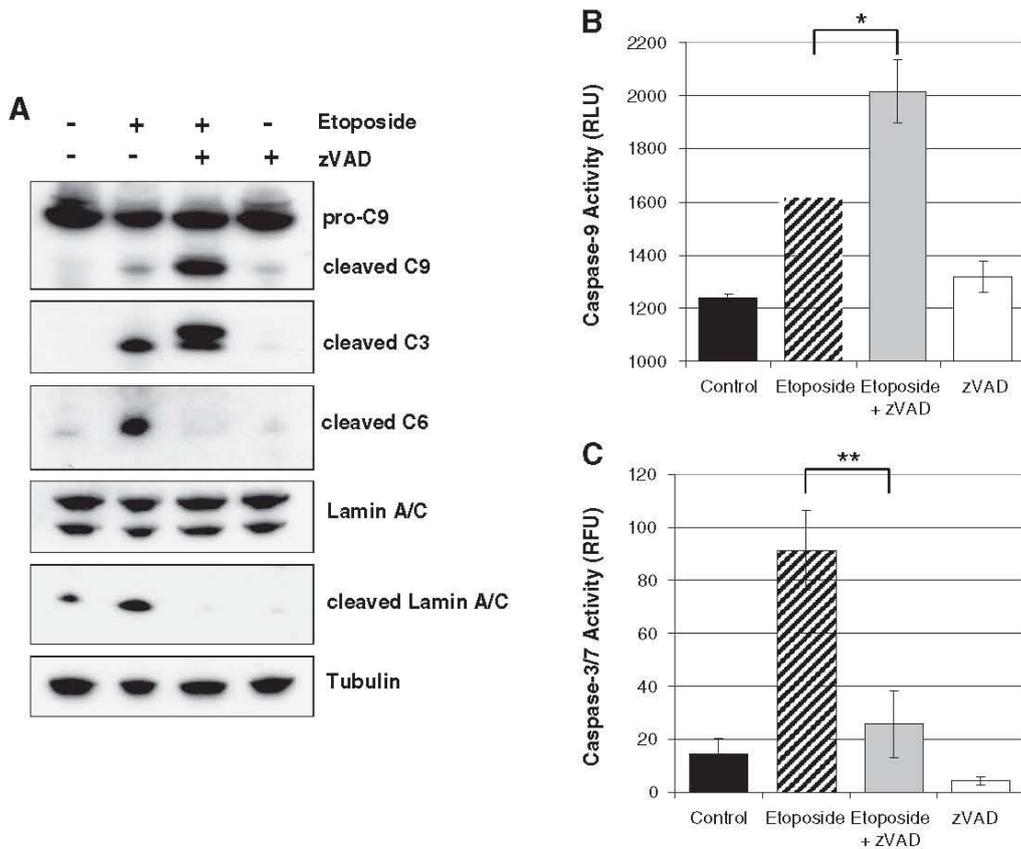


Fig. 5. zVAD-fmk up-regulates caspase-9 and down-regulates effector caspases in 3T9 MEFs. (A) 3T9 MEFs were treated with etoposide +/- zVAD-fmk for 18 h. Caspase-9 (proform and cleaved form), cleaved caspase-3, cleaved caspase-6, and lamin A/C (normal and cleaved forms) were detected by Western-blot. Tubulin detection was used as a control. (B, C) After etoposide +/- zVAD-fmk treatment, caspase-9 (B) and caspase-3/7 (C) activities in 3T9 MEFs were quantified using luminescence (RLU) or fluorescence (RFU) specific caspase activity assays. Student's t tests were performed (*p<0.05, **p<0.01).

hypothesis that zVAD-fmk could also regulate the proteasome activity and that accumulation of auto-cleaved caspase-9 could result in part from this regulation. Interactions between cell death and proteasomal degradation were previously characterized [35,36]. In collaboration with Isabelle Petropoulos (Université Pierre et Marie Curie, UR4 « Vieillesse, Stress et Inflammation », Paris), we studied proteasomal activities (in particular, chymotrypsin-like, post-glutamic hydrolase and trypsin-like activities) in 3T9 MEFs in the absence or in the presence of etoposide and zVAD-fmk. No significant modification of these activities was detected in the presence of etoposide +/- zVAD-fmk, in contrast to what was observed in TNF α -treated 3T9 MEFs (unpublished

data) showing that accumulation of caspases-9 does not result from an unspecific proteasome inhibition.

Altogether, our results indicate that caspases-9 activates an amplification loop at the mitochondrial level during the cell death process induced by etoposide in mouse embryonic fibroblasts. To test this hypothesis, we used AgT MEFs issued from caspase-9^{-/-} mice (AgT MEFs KOC9, Fig. 7). In these cells, etoposide induced mitochondrial membrane depolarization to the same extent in the presence or in the absence of zVAD-fmk, which shows that the absence of caspase-9 completely abolished the acceleration of the loss of $\Delta\Psi_m$ induced by zVAD in MEFs. In caspase-9^{-/-} AgT MEFs, reexpression of

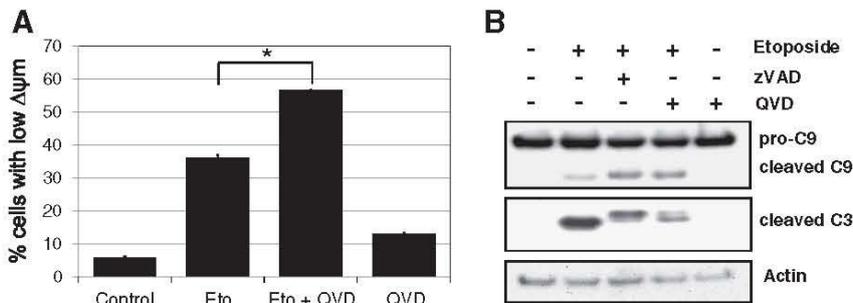


Fig. 6. Q-VD-OPH increases etoposide-induced loss of $\Delta\Psi_m$ and caspase-9 cleavage in 3T9 MEFs. (A) 3T9 MEFs were untreated or treated with etoposide, etoposide and Q-VD-OPH or Q-VD-OPH for 16 h. Cells with mitochondrial membrane depolarization were analyzed by flow cytometry after DiOC₆(3)/PI staining. Student's t tests were performed (*p<0.01). (B) 3T9 MEFs were treated with etoposide +/- Q-VD-OPH +/- zVAD-fmk. Caspase-9 (proform and cleaved form), cleaved caspase-3 and actin were analyzed by Western-blot.

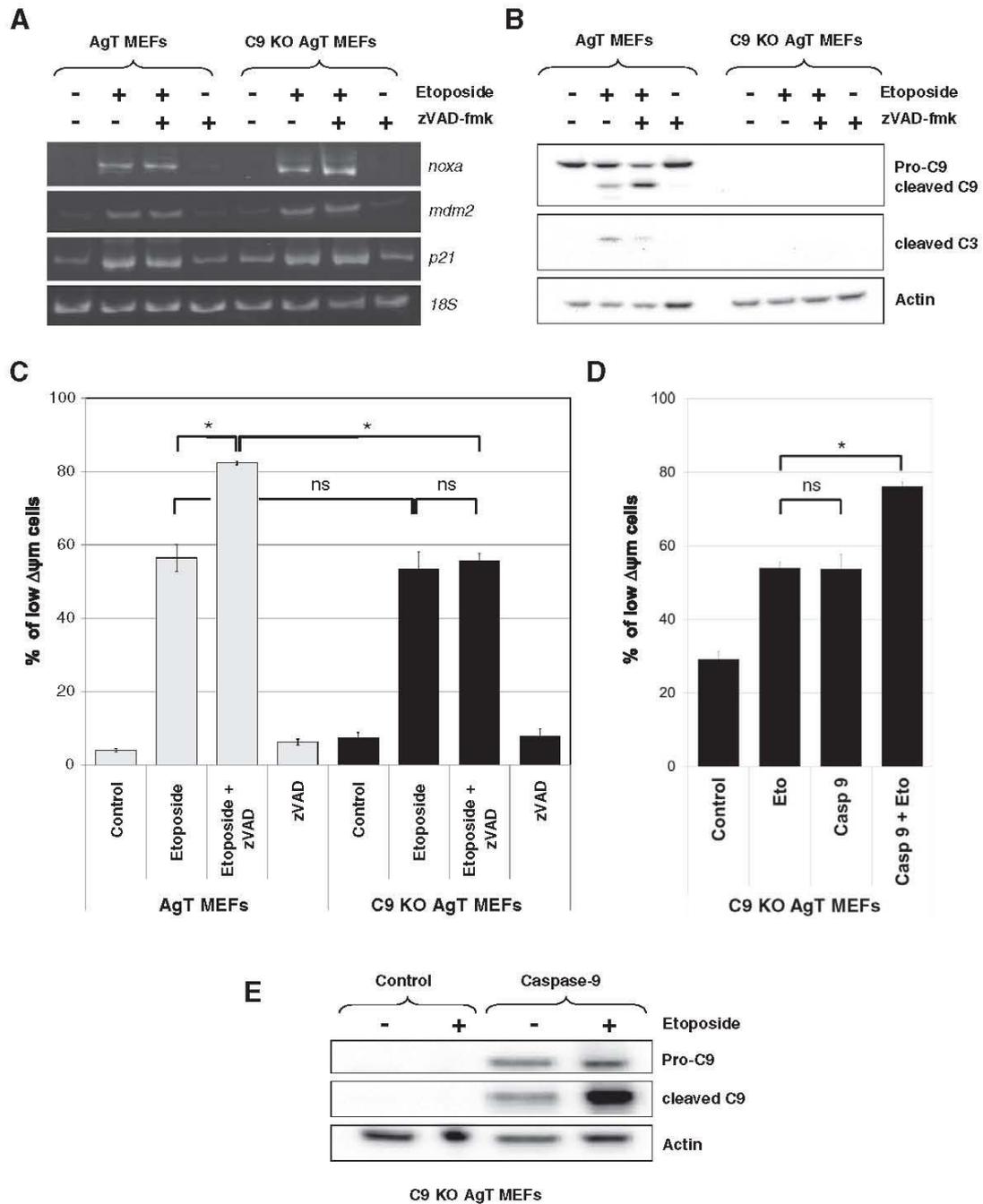


Fig. 7. Caspase-9 induces an amplification loop at the mitochondrial level. (A, B, C) AgT MEFs and Caspase-9^{-/-} AgT MEFs were incubated with etoposide +/- zVAD-fmk for 16 h. Noxa, mdm2, p21 mRNA and 18S rRNA levels were analyzed by RT-PCR (A). Caspase-9 (proform and cleaved form), cleaved caspase-3 and actin levels were analyzed by Western-blot (B). Cells with mitochondrial membrane depolarization were analyzed by flow cytometry after DiOC₆(3)/PI staining (C). Student's t tests were performed (*p<0.001, ns: no significant difference, n=7). (D, E) Caspase-9^{-/-} AgT MEFs were transfected by a human caspase-9 expression vector and incubated with etoposide for 16 h. Cells with mitochondrial membrane depolarization were analyzed by flow cytometry after CMX-ros staining (D). Caspase-9 (proform and cleaved form) and actin levels were analyzed by Western-blot (E). Student's t tests were performed (*p<0.001, ns: no significant difference, n=3).

caspase-9 increased etoposide-induced mitochondrial membrane depolarization. The correlation between cleaved caspase-9 level and loss of $\Delta\Psi_m$ suggests that caspase-9 induces mitochondrial membrane depolarization and an amplification loop of the cell death process induced by etoposide. Thus, although caspase-9 is not required for etoposide-induced loss of $\Delta\Psi_m$ in MEFs cells, caspase-9 is required for the amplification of this process by zVAD-

fmk. Such a positive feedback loop at the mitochondrial level could involve a cleavage of an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family as described in other systems [37,38].

In conclusion, we demonstrate here for the first time that caspase-9, which is up-regulated by zVAD-fmk, induces an amplification loop at the mitochondrial level of the cell death process induced by etoposide in mouse embryonic fibroblasts.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the “Association pour la Recherche Contre le Cancer” (#3819) and the “Ligue Nationale Contre le Cancer”. Aida Rodríguez-Enfedaque and Elisabeth Delmas were supported by fellowships from the “Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche”.

References

- [1] C. Twomey, J.V. McCarthy, Pathways of apoptosis and importance in development, *J. Cell. Mol. Med.* 9 (2005) 345–359.
- [2] B. Fadeel, S. Orrenius, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease, *J. Intern. Med.* 258 (2005) 479–517.
- [3] M. Bras, B. Queenan, S.A. Susin, Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying, *Biochemistry (Mosc.)* 70 (2005) 231–239.
- [4] G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, W.S. El-Deiry, P. Golstein, D.R. Green, M. Hengartner, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M.E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovskiy, G. Melino, Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 3–11.
- [5] M.F. Lavin, N. Gueven, The complexity of p53 stabilization and activation, *Cell Death Differ.* 13 (2006) 941–950.
- [6] L. Bai, W.-G. Zhu, p53: structure function and therapeutic applications, *J. Cancer Mol. 2* (2006) 141–153.
- [7] J. Yu, L. Zhang, The transcriptional targets of p53 in apoptosis control, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331 (2005) 851–858.
- [8] R.J. Youle, A. Strasser, The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 47–59.
- [9] U.M. Moll, S. Wolff, D. Speidel, W. Deppert, Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 (2005) 631–636.
- [10] Y.P. Ow, D.R. Green, Z. Hao, T.W. Mak, Cytochrome c: functions beyond respiration, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 532–542.
- [11] Q. Bao, Y. Shi, Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases, *Cell Death Differ.* 14 (2007) 56–65.
- [12] A.M. Verhagen, E.J. Coulson, D.L. Vaux, Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs, *Genome Biol.* 2 (2001) (REVIEWS3009).
- [13] P. Liston, W.G. Fong, R.G. Korneluk, The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2, *Oncogene* 22 (2003) 8568–8580.
- [14] H. Li, H. Zhu, C.J. Xu, J. Yuan, Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell* 94 (1998) 491–501.
- [15] U. Fischer, R.U. Janicke, K. Schulze-Osthoff, Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates, *Cell Death Differ.* 10 (2003) 76–100.
- [16] P. Fuentes-Prior, G.S. Salvesen, The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition, *Biochem. J.* 384 (2004) 201–232.
- [17] S.J. Riedl, Y. Shi, Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 897–907.
- [18] I.T. Weber, B. Fang, J. Agniswamy, Caspases: structure-guided design of drugs to control cell death, *Mini Rev. Med. Chem.* 8 (2008) 1154–1162.
- [19] V. Rinceval, F. Renaud, C. Lemaire, B. Mignotte, J.L. Vayssiere, Inhibition of Bcl-2-dependent cell survival by a caspase inhibitor: a possible new pathway for Bcl-2 to regulate cell death, *FEBS Lett.* 460 (1999) 203–206.
- [20] N. Godefroy, S. Bouleau, G. Gruel, F. Renaud, V. Rinceval, B. Mignotte, D. Tronik-Le Roux, J.L. Vayssiere, Transcriptional repression by p53 promotes a Bcl-2-insensitive and mitochondria-independent pathway of apoptosis, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 4480–4490.
- [21] N. Godefroy, C. Lemaire, F. Renaud, V. Rinceval, S. Perez, I. Parvu-Ferecatu, B. Mignotte, J.L. Vayssiere, p53 can promote mitochondria- and caspase-independent apoptosis, *Cell Death Differ.* 11 (2004) 785–787.
- [22] P. Vandenabeele, T. Vanden Berghe, N. Festjens, Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways, *Sci. STKE* 2006 (2006) e44.
- [23] C. Scheller, J. Knoferle, A. Ullrich, J. Prottegeier, T. Racek, S. Sopfer, C. Jassoy, A. Rethwilm, E. Koutsilieris, Caspase inhibition in apoptotic T cells triggers necrotic cell death depending on the cell type and the proapoptotic stimulus, *J. Cell. Biochem.* 97 (2006) 1350–1361.
- [24] S.O. Kim, K. Ono, J. Han, Apoptosis by pan-caspase inhibitors in lipopolysaccharide-activated macrophages, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281 (2001) L1095–L1105.
- [25] S.B. Yee, S.J. Baek, H.T. Park, S.H. Jeong, J.H. Jeong, T.H. Kim, J.M. Kim, B.K. Jeong, B.S. Park, T.K. Kwon, I. Yoon, Y.H. Yoo, zVAD-fmk, unlike BocD-fmk, does not inhibit caspase-6 acting on 14-3-3/Bad pathway in apoptosis of p815 mastocytoma cells, *Exp. Mol. Med.* 38 (2006) 634–642.
- [26] S. Bouleau, I. Parvu-Ferecatu, A. Rodríguez-Enfedaque, V. Rinceval, H. Grimal, B. Mignotte, J.L. Vayssiere, F. Renaud, Fibroblast growth factor 1 inhibits p53-dependent apoptosis in PC12 cells, *Apoptosis* 12 (2007) 1377–1387.
- [27] G.J. Todaro, H. Green, Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines, *J. Cell Biol.* 17 (1963) 299–313.
- [28] A. Torriglia, C. Lepretre, L. Padron-Barthe, S. Chahory, E. Martin, Molecular mechanism of L-DNase II activation and function as a molecular switch in apoptosis, *Biochem. Pharmacol.* 76 (2008) 1490–1502.
- [29] M.C. Wei, W.X. Zong, E.H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A.J. Ross, K.A. Roth, G.R. MacGregor, C.B. Thompson, S.J. Korsmeyer, Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death, *Science* 292 (2001) 727–730.
- [30] S.M. Srinivasula, M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri, E.S. Alnemri, Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization, *Mol. Cell* 1 (1998) 949–957.
- [31] H.R. Stennicke, Q.L. Deveraux, E.W. Humke, J.C. Reed, V.M. Dixit, G.S. Salvesen, Caspase-9 can be activated without proteolytic processing, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 8359–8362.
- [32] P. Saikumar, M. Mikhailova, S.L. Pandeswara, Regulation of caspase-9 activity by differential binding to the apoptosome complex, *Front. Biosci.* 12 (2007) 3343–3354.
- [33] L.A. Allan, P.R. Clarke, Apoptosis and autophagy: regulation of caspase-9 by phosphorylation, *FEBS J.* 276 (2009) 6063–6073.
- [34] S. Malladi, M. Challa-Malladi, H.O. Fearnhead, S.B. Bratton, The Apaf-1*procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer, *EMBO J.* 28 (2009) 1916–1925.
- [35] X.M. Sun, M. Butterworth, M. MacFarlane, W. Dubiel, A. Ciechanover, G.M. Cohen, Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis, *Mol. Cell* 14 (2004) 81–93.
- [36] V. Jesenberger, S. Jentsch, Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 112–121.
- [37] M. Chen, A.D. Guerrero, L. Huang, Z. Shabier, M. Pan, T.H. Tan, J. Wang, Caspase-9-induced mitochondrial disruption through cleavage of anti-apoptotic BCL-2 family members, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 33888–33895.
- [38] P. Gomez-Bougie, L. Oliver, S. Le Gouill, R. Bataille, M. Amiot, Melphalan-induced apoptosis in multiple myeloma cells is associated with a cleavage of Mcl-1 and Bim and a decrease in the Mcl-1/Bim complex, *Oncogene* 24 (2005) 8076–8079.

Résumé :

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, joue un rôle majeur au cours du développement embryonnaire et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. La voie mitochondriale de l'apoptose est principalement activée par la protéine oncosuppressive p53. Le FGF1 est un facteur de croissance atypique, majoritairement intracellulaire et nucléaire qui induit la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires. Dans les cellules PC12, le FGF1 présente des activités neurotrophique et anti-apoptotique vis-à-vis de l'apoptose dépendante de p53. De plus, il interagit avec la protéine p53. La localisation nucléaire du FGF1 semble nécessaire à ses activités intracellulaires ainsi qu'à son interaction avec p53.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié les activités neurotrophique et anti-apoptotique de différentes formes mutantes du FGF1. J'ai entrepris l'étude de l'activité intracellulaire de la forme FGF1^{K132E}, forme mutante dont les activités extracellulaires sont inhibées. La mutation du résidu lysine 132 pourrait modifier la phosphorylation du résidu sérine 130 du FGF1, j'ai donc également étudié deux autres formes mutantes : le FGF1^{S130A}, dont la phosphorylation est inhibée et le FGF1^{S130D} dont la phosphorylation est mimée. Les résidus mutés (K132 et S130) sont situés dans le domaine C-terminal du FGF1.

Cette étude nous a permis de montrer que la phosphorylation du FGF1 inhibe son activité anti-apoptotique mais ne modifie pas son activité neurotrophique, et que le domaine C-terminal du FGF1 est fortement impliqué dans la régulation de ses activités intracellulaires. Toutes ces formes mutantes sont capables d'être transloquées dans le noyau ce qui suggère que la localisation nucléaire du FGF1 soit nécessaire mais insuffisante pour ses activités intracellulaires. Par ailleurs, p53 peut interagir avec le FGF1^{WT} et certaines formes mutantes, toutefois cette interaction n'est pas strictement corrélée à l'activité anti-apoptotique du FGF1, ce qui suggère l'existence d'autres régulations nucléaires qui restent à caractériser.

Mes travaux ont permis pour la première fois de mettre en évidence le rôle de la phosphorylation du FGF1 et de son domaine C-terminal dans la régulation de ses activités intracellulaires. La poursuite de cette étude permettra de mieux caractériser le rôle nucléaire de ce facteur de croissance et de caractériser ses éventuelles interactions avec des protéines nucléaires comme p53.

Mots-clé : FGF1, p53, apoptose, phosphorylation, différenciation cellulaire

Abstract:

Apoptosis, a form of programmed cell death, is required for embryonic development and tissue homeostasis. The mitochondrial pathway of apoptosis is mainly induced by p53, an oncosuppressor that acts as a transcription factor. FGF1 is one of the two prototypic members of the FGF family. Contrarily to most FGFs, FGF1 lacks a secretion peptide signal and acts mainly in an intracellular and nuclear manner. Intracellular FGF1 induces cell proliferation, differentiation and survival. In PC12 cells, FGF1 inhibits p53-induced apoptosis and interacts with p53. FGF1 nuclear localization seems to be required for its intracellular activities and its interaction with p53.

To better characterize the FGF1 intracellular pathway, we studied neurotrophic and anti-apoptotic activities of several mutant forms of FGF1: the FGF1^{K132E} that could affect FGF1 phosphorylation, and two phosphorylation-site mutant forms, *i.e.* the FGF1^{S130A} (preventing phosphorylation) and the FGF1^{S130D} (mimicking phosphorylation). All these mutations are localized in the C-terminal domain of FGF1. This study showed that phosphorylation inhibits FGF1 anti-apoptotic activity but not its neurotrophic activity in PC12 cells and that the FGF1 C-terminal domain is strongly involved in the regulation of its intracellular activities. Despite their different activities, all mutant forms are localized both in the cytosol and the nucleus. Therefore, nuclear localization is required but insufficient for FGF1 to display its intracellular activities.

Besides, p53 can interact with wild-type and some of the mutant forms of FGF1. This interaction does not strictly correlate with FGF1 anti-apoptotic activity. Thus, the nuclear mechanisms regulating FGF1 intracellular activities remain to be characterized.

Our study highlights for the first time the role of the phosphorylation and the C-terminal domain of FGF1 on the regulation of its intracellular activities. This work must continue on to further characterize FGF1 nuclear activities and its interactions with nuclear proteins such as p53.

Keywords: FGF1, p53, apoptosis, phosphorylation, cell differentiation