



HAL
open science

La dualité de l'apoptose des cellules du cancer du col de l'utérus ou la face de Janus de l'apoptose : un objectif thérapeutique et une implication dans le transfert horizontal d'oncogènes viraux

Francois Hermetet

► To cite this version:

Francois Hermetet. La dualité de l'apoptose des cellules du cancer du col de l'utérus ou la face de Janus de l'apoptose : un objectif thérapeutique et une implication dans le transfert horizontal d'oncogènes viraux. Médecine humaine et pathologie. Université de Franche-Comté, 2015. Français. NNT : 2015BESA3009 . tel-01408073

HAL Id: tel-01408073

<https://theses.hal.science/tel-01408073>

Submitted on 3 Dec 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.

Université de Franche-Comté

UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques de Besançon

Année universitaire 2014-2015

Thèse

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat de l'Université de Franche-Comté

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement le 2 décembre 2015 par

François HERMETET

Né le 11 avril 1986 à Mulhouse

**La dualité de l'apoptose des cellules du cancer du col de l'utérus ou
la face de Janus de l'apoptose : un objectif thérapeutique
et une implication dans le transfert horizontal d'oncogènes viraux**

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Pr Christiane MOUGIN	Université de Franche-Comté (Besançon)
Rapporteurs :	Dr Murielle MASSON	Université de Strasbourg
	Dr Christophe HOURIOUX	Université François Rabelais de Tours
Examineurs :	Pr Régis DELAGE-MOURROUX	Université de Franche-Comté (Besançon)
	Pr Pierre OUDET	Université de Strasbourg

Résumé

À l'heure actuelle, une large proportion des recherches vouées à l'identification et au développement de nouvelles thérapies anticancéreuses est basée sur l'apoptose. Dans les dernières décennies, divers composés phytochimiques ont été caractérisés comme des agents pharmacologiques susceptibles d'éliminer les cellules cancéreuses *via* l'induction de l'apoptose. Parmi ceux-ci, l'isoliquiritigénine (ILG), un flavonoïde naturellement présent dans les racines de réglisse, se distingue des autres par ses nombreuses propriétés thérapeutiques incluant une activité antitumorale. Chez les mammifères, les cellules apoptotiques (CA) peuvent être complètement dégradées *via* leur capture par des cellules phagocytaires spécialisées ou servir de vecteurs d'ADN dans un processus appelé transfert horizontal de gènes (THG). Ainsi, il a été mis en évidence que des CA dérivées de cancer du col de l'utérus peuvent induire le transfert de séquences d'oncogènes de papillomavirus humains (HPV) à des fibroblastes primaires humains (HPFs) qui acquièrent des propriétés de cellules transformées. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'internalisation de CA par les fibroblastes, un modèle de phagocyte non-professionnel, n'ont pas encore été clairement identifiés et la caractérisation de ces événements qui précèdent le THG est essentielle à la compréhension de ce processus et de la transformation des cellules receveuses qui peut en découler.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse étaient, (i) d'analyser les effets anticancéreux de l'ILG sur des cellules dérivées de cancer du col de l'utérus, (ii) de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la capture des CA par les HPFs, (iii) d'étudier les événements cellulaires qui font suite à ce processus comme la maturation des phagosomes, le THG et l'acquisition de propriétés de transformation et enfin, (iv) de démontrer la preuve de la conservation de la capacité tumorigénique des CA *in vivo*.

Un premier travail a permis de mettre en lumière les propriétés antitumorales de l'ILG *via* une multiplicité d'actions sur des modèles cellulaires de cancer du col de l'utérus *in vitro*, incluant des activités anti-proliférative, pro-apoptotique, anti-migratoire. Concernant la lignée cellulaire Ca Ski, p53 sauvage et représentative du carcinome du col utérin le plus fréquent, associé à une infection transformante par HPV16, l'apoptose induite par l'ILG semble dépendante de p53 et de la mitochondrie, mais aussi de la voie des récepteurs de mort, comme attesté par l'augmentation des niveaux de protéines p53 et p21, la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial, la libération du cytochrome c et le clivage des caspases-9, -8 et -3. Ces effets pourraient être la conséquence de la diminution de l'expression de l'oncoprotéine virale E6 d'HPV16 induite par l'ILG entraînant la restauration de l'expression de p53. Nos travaux révèlent un fort potentiel de l'ILG contre différents

types de cellules malignes et ouvrent le champ à de nouvelles modalités de traitement des cancers associés à HPV.

Après mise au point d'une méthode originale d'analyse quantitative de la capture des CA basée sur la cytométrie en flux, la caractérisation des interactions cellule phagocytaire/CA sur les plans morphologique et moléculaire a révélé que les HPFs se comportent comme des phagocytes non-professionnels, capables d'internaliser, avec une efficacité et une rapidité moindre, comparativement aux phagocytes professionnels tels que des macrophages, des fragments subcellulaires plutôt que des cellules mourantes. Cette capture est dépendante du temps, de la température et des ions bivalents ; elle implique un mécanisme de phagocytose et/ou de macropinocytose. Certains déterminants moléculaires permettant la reconnaissance des CA par les HPFs et/ou nécessaires à la biogenèse ou à la maturation des phagosomes ont aussi été identifiés tels que l'exposition de phosphatidylsérines sur le feuillet externe de la membrane plasmique des CA, un marqueur canonique de l'apoptose dont la reconnaissance par les HPFs implique le récepteur BAI1. Après l'internalisation des CA, la maturation du phagosome implique le processus de *LC3-associated phagocytosis*, préalablement décrit dans des phagocytes professionnels, comme le démontre l'identification de LAMP-1 et de LC3-II à la membrane des phagosomes contenant les CA. Enfin, nos travaux confirment que la capture des CA cancéreuses par les HPFs est indispensable au processus de THG et à l'acquisition consécutive de propriétés de croissance indépendante de l'ancrage dans notre modèle *in vitro* de co-culture.

Les HPFs, des composants majeurs du microenvironnement tumoral, peuvent donc contribuer à l'efférocytose de CA cancéreuses, dont les déterminants cellulaires et moléculaires mis en jeu ont été caractérisés en partie dans ce travail. Au sein d'une tumeur, les CA pourraient donc agir comme des vecteurs d'oncogènes qu'elles pourraient transférer aux cellules du microenvironnement tumoral après leur capture. La poursuite de ce travail chez l'animal permettra d'évaluer la pertinence de ce processus *in vivo*.

Abstract

Most of the research strategies aiming at improving anticancer therapies currently target apoptosis. Over the last decades, several natural products derived from herbal medicine or food have been identified as pharmacological agents for cancer cell elimination through apoptosis induction. Among them, isoliquiritigenin (ILG) is a chalcone derivative isolated from liquorice and shallots which exhibits a wide variety of biological functions including antitumor properties.

In mammals, apoptotic cells (AC) can either be eliminated after their capture by specialized phagocytes or act as vectors of DNA in a process named horizontal gene transfer (HGT). For instance, AC derived from cervical cancer cells can transfer human papillomavirus (HPV) oncogene sequences to human primary fibroblasts (HPFs) which subsequently acquire transformed cell properties. The molecular mechanisms underlying AC uptake by HPFs, a model of non-professional phagocytes, have not been clearly identified. Characterizing these upstream events appears critical to broaden our understanding of HGT and the ultimate transformation of recipient cells which may subsequently occur.

The aims of this work were to (i) study the antitumor effects of ILG on cervical cancer cell lines, (ii) characterize the cellular and molecular mechanisms underlying AC uptake by HPF, (iii) study the cellular events which occur in HPFs following AC engulfment such as phagosome maturation, HGT and acquisition of transformed properties, and (iv) evaluate the tumorigenic properties of AC *in vivo*.

In a first part of this PhD project, we found that ILG exhibits multiple antitumor actions on cervical cancer cells *in vitro* including anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-migration properties. Further studies on apoptosis-related events were conducted in Ca Ski cells (p53_{wt}, HPV16 DNA positive), which are representative of the most frequent cervical carcinoma. The treatment of Ca Ski cells with ILG is associated with increased levels of p53 and p21 proteins, loss of mitochondrial membrane potential, cytochrome c release and caspase-9, -8 and -3 cleavage. These features suggest that ILG-induced apoptosis is dependent on p53 and involve both mitochondrial and death receptor-mediated pathways. The effect of ILG in Ca Ski cells may be partly explained by the decrease of HPV16 E6 oncoprotein expression and the associated raise of p53 levels observed after cell treatment. Our work highlights the potential of ILG as an antitumor agent and provides the opportunity of new treatment.

In the second part of this work, we set up a method based on flow cytometry to quantitatively analyze AC uptake. This original method and microscopy analysis allowed us to show that HPFs act as non-professional phagocytes and are able to engulf subcellular fragments rather than dying whole cells, with lower efficiency and rapidity compared to professional phagocytes as macrophages.

Uptake of AC by HPFs depends on time, temperature and the presence of bivalent ions. Morphological analysis and functional assays using endocytosis inhibitors revealed a mechanism related to phagocytosis and/or macropinocytosis. The recognition of phosphatidylserine exposed on the surface of AC by their receptor BAI1 has emerged as a required event for AC uptake by HPFs. The colocalisation of LC3-II and LAMP-1 on AC-containing phagosomes in HPFs suggests that phagosome maturation may involve LC3-associated phagocytosis as previously observed in professional phagocytes. Finally, our model enabled us to evidence that AC uptake is required for HGT and subsequent acquisition of transformed properties by recipient cells.

Taken together, our results show the evidence that HPFs, the major components of tumor microenvironment, contribute to tumor AC efferocytosis. Some of the molecular mechanisms underlying this unconventional role of HPFs have been characterized *in vitro*. In a tumor, AC may constitute vectors enabling the transfer of oncogenes to the neighbouring cells, including tumor microenvironment components. Further work in animal models will allow us to evaluate the relevance of this process *in vivo*.

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse Madame le Professeur Christiane Mougin, Praticien Hospitalier au CHRU de Besançon et Directrice de l'EA3181, pour m'avoir accueilli dans son équipe. Ainsi elle m'a permis de mener à bien ce projet tout en me donnant l'opportunité de me confronter au monde scientifique lors de différents congrès. J'ai pu apprécier, Madame le Professeur, votre disponibilité, vos conseils et votre gentillesse. Soyez assurée de mon profond respect et de toute ma gratitude.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur le Professeur Jean-Luc Prétet, Praticien Hospitalier au CHRU de Besançon et futur Directeur de l'EA3181, pour nos discussions et ses précieux conseils.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance aux membres de mon jury de thèse :

Madame le Docteur Murielle Masson, rapporteur,

Monsieur le Docteur Christophe Hourieux, rapporteur,

Monsieur le Professeur Régis Delage-Mourroux, examinateur,

Monsieur le Professeur Pierre Oudet, examinateur et président du jury,

pour avoir consacré de leur temps à la lecture, l'analyse et la critique de ce travail.

Je remercie l'Université de Franche-Comté, la SFR-FED4234, le LabEX LipSTIC, le Conseil Régional de Franche-Comté, la Ligue contre le Cancer, le Cancéropôle Grand-Est pour leur soutien matériel et financier.

Mes remerciements vont aux membres de l'EA3181 d'hier et d'aujourd'hui, ainsi qu'à ceux de l'EA3922, avec qui j'ai eu l'avantage et l'honneur de travailler et de partager des moments anthropologiques de convivialité. Je remercie tout particulièrement Adeline et Adrien, membres d'un trio de choc, mousquetaires à la paille comme à la ville, l'une régnant en maître dans la salle dite « des protéines » et disposant d'un talent certain pour la mise en scène et le spectacle (merci pour ma vidéo de thèse), l'autre, ambassadeur d'une communauté à la chevelure critiquée mais jamais égalée, d'une aisance sans pareille tant sur les podiums qu'en « bio mol ». Un grand merci va aussi à Fabienne (adepte de l'isoliquiritigénine et de discussions bizarres venues d'un autre monde appelé La Normandie), à Aurélie (la senior aux multiples casquettes, une fenêtre pleine de lucidité sur la vie après thèse), à Anne (toujours prête à rendre service, gardienne du passé et garante de l'ordre établi pour le présent), à mon maître Jedi Nico, aux membres de mon comité de thèse aux conseils avisés, Gilles Despouy (mon mentor) et François Deryckère, ainsi qu'à Isabelle, Sylvie, Julie, Victor, Koceila, Jérôme, Stéphanie, Sophie, Fatima, Alain, Sandrine, Laura et Aurore.

L'IBCT fût pour moi un lieu de belles rencontres (Dom' avec lequel j'ai eu le plaisir de partager de nombreux moments de rire et de complicité et de trop rares séances de sport ; François toutcourt,

un personnage haut en couleurs toujours de bonne humeur ; les étudiants passés ou actuels avec une mention spéciale pour Romain et Baptiste partis conquérir la capitale), de partage (merci à Mélanie, mon fournisseur officiel de macrophages *made in EFS*, et à Emilie, une des initiatrices de ce beau projet sur le transfert horizontal de gènes), de formation (merci à Sophie, Virginie et Francis pour la transmission de leurs savoirs) et d'émotions mêlant plaisir toujours, solitude parfois (lorsqu'on se retrouve enfermé dehors avec ses clés restées à l'intérieur) !

Merci à mes proches de divers horizons : les amis du scoutisme (Sébi, Pierre et BP entre autres) et de la fac/de l'étage du dessus (Charlotte n°8 mais number one de la « microbio » et son/mon Bruno, Alexandre, Steffi, Cédric et Sophie), les pizzadomiens (la mère de nous tous Laura, mon conscrit préféré Maxou, le très joliment prénommé François, Loïc et Nono et tout(es) leur(s) chéri(e)s et leur joyeuse famille), Françoise (fournisseur officiel de régal culinaire), Thierry, Clémence et toute la famille Jacquin.

Enfin, merci à toute ma famille et en particulier à mes parents Lorraine et Jean-Daniel, mes Mamys Madeleine et Annie, mes Papys Claude et Denis et mes frangins Sam et Ben, sans qui rien n'aurait été possible, ainsi qu'à Elodie, Fanny, Naïlo, Maël, Youna, Soan, Margot et Corentin.

Elise, je te dédie cette thèse et te remercie mille fois pour ton soutien sans limite ni frontière. Je t'ai découvert comme une scientifique et une partenaire de paillasse hors pair, tu m'apparais maintenant comme une évidence. Par ton dévouement, ta force de caractère et ta rigueur, tu forces mon respect et m'inspires au quotidien. « Longue et belle vie à nous ! ».

Table des matières

RESUME	1
ABSTRACT	3
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
TABLE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES ABREVIATIONS	13
PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE	17
1. LA MORT CELLULAIRE	19
1.1. GENERALITES.....	19
1.2. LA MORT CELLULAIRE ACCIDENTELLE	20
1.3. LA MORT CELLULAIRE REGULEE	20
1.4. LES DIFFERENTS TYPES DE MORT CELLULAIRE	20
1.5. APOPTOSE : FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES	23
2. APOPTOSE : DE L'INDUCTION A LA PRISE EN CHARGE DE LA CELLULE APOPTOTIQUE	25
2.1. VOIES D'INDUCTION DE L'APOPTOSE	25
2.1.1. <i>Les caspases</i>	25
2.1.2. <i>Voie intrinsèque ou voie mitochondriale</i>	27
2.1.2.1. Le contrôle de l'apoptose par les protéines de la famille BCL-2	29
2.1.2.2. L'activation des caspases associée à un stress du réticulum endoplasmique	32
2.1.3. <i>Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort</i>	32
2.1.4. <i>Voie du PIDDosome</i>	35
2.1.5. <i>Régulation de l'activation des caspases</i>	36
2.2. FORMATION DE CELLULES APOPTOTIQUES.....	37
2.2.1. <i>Aspects morphologiques de l'apoptose</i>	37
2.2.2. <i>Manifestations biochimiques de l'apoptose</i>	38
2.3. DEVENIR ET ELIMINATION DES CELLULES APOPTOTIQUES	39
2.3.1. <i>Généralités</i>	39
2.3.2. <i>Modifications de surface</i>	41
2.3.2.1. Les signaux " <i>find-me</i> " et " <i>keep-out</i> "	42
2.3.2.2. Les signaux " <i>don't eat-me</i> "	42

2.3.2.3. Les signaux "eat-me"	43
2.3.1. Molécules de reconnaissance	44
2.3.1.1. Les récepteurs membranaires à reconnaissance directe.....	45
2.3.1.2. Les molécules solubles adaptatrices et leurs récepteurs associés	46
2.3.1.3. Les molécules de reconnaissance de la phosphatidylsérine.....	47
2.3.2. Mécanismes de clairance des cellules en apoptose tardive et nécrotiques.....	50
2.3.3. Signalisations intracellulaires inhérentes au remodelage du cytosquelette.....	52
2.3.3.1. Les GTPases de la famille Rho.....	53
2.3.3.2. L'activation de Rac <i>via</i> la voie CrkII-Dock180-ELMO	53
2.3.3.3. L'activation de Rac <i>via</i> la voie LRP/CD91-GULP-ABCA1	55
2.3.4. Mécanismes d'endocytose : cas de l'internalisation des cellules apoptotiques.....	56
2.3.5. Maturation du phagosome et dégradation de la cellule apoptotique	59
2.3.5.1. Les phagosomes précoces et tardifs.....	60
2.3.5.2. Le phagolysosome	62
2.3.6. LC3-associated phagocytosis : une étape cruciale de la maturation du phagosome	63
3. DE L'INDUCTION DE L'APOPTOSE AU TRANSFERT HORIZONTAL DE GENES	67
3.1. LA TOILE DE FOND DU TRANSFERT HORIZONTAL DE GENES CHEZ LES MAMMIFERES	67
3.2. LE TRANSFERT HORIZONTAL DE GENES VIRAUX ET CELLULAIRES	68
3.3. LE TRANSFERT HORIZONTAL DE GENES ET LE SUIVI DES GENES TRANSFERES JUSQU'AU NOYAU DES CELLULES RECEVEUSES.....	69
3.4. DE LA COMPREHENSION DE LA REGULATION DU TRANSFERT HORIZONTAL DE GENES A L'IMPLICATION DU THG DANS LA TRANSFORMATION TUMORALE	70
3.5. TRANSFORMATION PAR TRANSFERT HORIZONTAL D'ONCOGENES	71
3.6. AUTRES MECANISMES POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS LE TRANSFERT HORIZONTAL DE GENES.....	73
3.6.1. <i>L'internalisation d'ADN circulant.....</i>	<i>73</i>
3.6.2. <i>La capture de petites vésicules.....</i>	<i>74</i>
4. PAPILOMAVIRUS HUMAINS ET CANCER	77
4.1. PAPILOMAVIRUS HUMAINS : LES AGENTS ETIOLOGIQUES DU CANCER DU COL DE L'UTERUS	77
4.2. LE CADRAN DES "HALLMARKS OF CANCER" : UN MODELE APPLICABLE A LA CARCINOGENESE ASSOCIEE AUX HPV	78
4.2.1. <i>Rôles de la protéine E7 des HPV-HR dans la carcinogénèse</i>	<i>79</i>
4.2.2. <i>Rôles de la protéine E6 des HPV-HR dans la carcinogénèse</i>	<i>82</i>
5. CONTEXTE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	89

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS.....	91
1. EXPLORATION DES EFFETS ANTICANCEREUX POTENTIELS DE L'ISOLIQUIRITIGENINE DANS LE MODELE DU CANCER DU COL DE L'UTERUS.....	93
1.1. PUBLICATION 1 : ISOLIQUIRITIGENIN INDUCES CASPASE-DEPENDENT APOPTOSIS VIA DOWNREGULATION OF HPV16 E6 EXPRESSION IN CERVICAL CANCER CA SKI CELLS	94
1.1.1. <i>Résumé de la publication 1</i>	94
1.2. TRAVAUX COMPLEMENTAIRES : EFFETS DE L'ISOLIQUIRITIGENINE SUR CERTAINS PHENOTYPES DE CELLULES DU CANCER DU COL DE L'UTERUS ASSOCIES A L'INVASION ET A LA DISSEMINATION METASTATIQUE	105
1.2.1. <i>Objectif</i>	105
1.2.2. <i>Matériel et méthodes</i>	106
1.2.2.1. Test de migration dit de "blessure-cicatrisation"	106
1.2.2.2. Obtention de milieux conditionnés et zymographie	106
1.2.3. <i>Résultats</i>	107
1.2.4. <i>Conclusion</i>	108
1.3. TRAVAUX COMPLEMENTAIRES : EFFETS DE L'ILG DANS UN MODELE MURIN DE XENOGREFFES DE CELLULES TUMORALES DE CANCER DU COL DE L'UTERUS	109
1.3.1. <i>Objectif</i>	109
1.3.2. <i>Matériel et méthodes</i>	109
1.3.2.1. Modèle animal : xénogreffes de cellules tumorales et traitement à l'isoliquiritigénine	109
1.3.3. <i>Résultats</i>	110
1.3.4. <i>Conclusion</i>	111
1.4. CONCLUSION GENERALE	111
2. INTERNALISATION DE CELLULES TUMORALES APOPTOTIQUES PAR DES FIBROBLASTES PRIMAIRES HUMAINS ET TRANSFERT HORIZONTAL D'ONCOGENES VIRAUX : ETUDE DES MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES	113
2.1. PUBLICATION 2 : EFFEROCYTOSIS OF APOPTOTIC HPV-POSITIVE CERVICAL CANCER CELLS BY HUMAN PRIMARY FIBROBLASTS.....	113
2.1.1. <i>Résumé de la publication 2</i>	113
2.1.2. <i>Travaux complémentaires : Caractérisation des mécanismes d'internalisation des cellules en apoptose précoce/mourantes et suivi de l'avancement du processus de mort au cours du temps</i>	153
2.1.2.1. Objectifs.....	153
2.1.2.2. Résultats	153
2.1.2.3. Conclusion	155

2.1.3. Travaux complémentaires : Confirmation de l'expression de BAI1 dans les fibroblastes primaires humains et les macrophages dérivés de monocytes humains et validation de la spécificité de l'anticorps BAI1 H270	155
2.1.3.1. Objectifs.....	155
2.1.3.2. Résultats	155
2.2. TRAVAUX COMPLEMENTAIRES : LA CAPTURE DE CELLULES APOPTOTIQUES HPV+ EST NECESSAIRE AU TRANSFERT DES ONCOGENES ET A L'ACQUISITION CONSECUTIVE D'UNE CAPACITE DE CROISSANCE INDEPENDANTE DE L'ANCRAGE	157
2.2.1. Objectifs.....	157
2.2.2. Matériel et méthodes	157
2.2.2.1. Cytométrie en flux et tri cellulaire	157
2.2.2.2. Test de croissance cellulaire en agar mou	158
2.2.2.3. Extraction d'ADN et détection de gènes par PCR	158
2.2.3. Résultats	159
2.2.4. Conclusion	160
2.3. TRAVAUX COMPLEMENTAIRES : VERS LA DEMONSTRATION DE LA PREUVE <i>IN VIVO</i> DE LA CONSERVATION DE LA CAPACITE TUMORIGENIQUE DES CELLULES APOPTOTIQUES TUMORALES HELA	161
2.3.1. Objectif	161
2.3.2. Matériel et méthodes	161
2.3.2.1. Modèle animal : xénogreffes de cellules apoptotiques tumorales.....	161
2.3.3. Résultats.....	161
2.3.4. Conclusion	162
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	163
CONCLUSION GENERALE.....	187
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	189
ANNEXES	217
1. PUBLICATION 3.....	219
2. COMMUNICATIONS ORALES (CO) DANS DES CONGRES INTERNATIONAUX	237
3. COMMUNICATIONS ORALES DANS DES COLLOQUES/SEMINAIRES INTERREGIONAUX.....	237
4. COMMUNICATION AFFICHEE (CA) DANS UN CONGRES INTERNATIONAL.....	238
5. COMMUNICATIONS AFFICHEES DANS DES COLLOQUES/SEMINAIRES INTERREGIONAUX	238

Table des illustrations

FIGURE 1 : DIFFERENTS TYPES DE MORT CELLULAIRE : APOPTOSE, MORT CELLULAIRE ASSOCIEE A L'AUTOPHAGIE, NECROSE	21
FIGURE 2 : STRUCTURE ET MECANISMES D'ACTIVATION DES CASPASES.....	26
FIGURE 3 : VOIE MITOCHONDRIALE (INTRINSEQUE) DE L'APOPTOSE	28
FIGURE 4 : MODELES D'INTERACTIONS ENTRE LES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2 PARTICIPANT AU CONTROLE DE L'APOPTOSE	30
FIGURE 5 : VOIE DES RECEPTEURS DE MORT (EXTRINSEQUE) DE L'APOPTOSE.....	33
FIGURE 6 : ACTIVATION DE L'APOPTOSE/NECROPTOSE PAR TNFR1.....	35
FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES INDUITES AU COURS DE L'APOPTOSE.....	37
FIGURE 8 : LES PRINCIPALES ETAPES DE LA CLAIRANCE DES CELLULES APOPTOTIQUES PAR LES PHAGOCYTES ET LES EVENEMENTS CELLULAIRES DE SIGNALISATION QUI LES REGULENT	41
FIGURE 9 : MOLECULES IMPLIQUEES DANS LA RECONNAISSANCE ET LA PHAGOCYTOSE DES CELLULES APOPTOTIQUES PAR UN "SUPERPHAGOCYTE"	45
FIGURE 10 : INTERACTIONS MOLECULAIRES SEQUENTIELLES ACTIVANT LA PHAGOCYTOSE DES CELLULES APOPTOTIQUES :.....	49
FIGURE 11 : MECANISMES MOLECULAIRES DE LA CLAIRANCE DES CELLULES APOPTOTIQUES TARDIVES ET NECROTIQUES.....	51
FIGURE 12 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA SIGNALISATION INTRACELLULAIRE IMPLIQUEE DANS LE REARRANGEMENT.....	55
FIGURE 13 : L'EFFEROCYTOSE EST DECRITE COMME UN MECANISME DE PHAGOCYTOSE PARTICULIERE.....	58
FIGURE 14 : MATURATION DU PHAGOSOME : LE TRAITEMENT POST-INTERNALISATION DE LA CELLULE APOPTOTIQUE	61
FIGURE 15 : LES PROCESSUS D'AUTOPHAGIE ET DE <i>LC3-ASSOCIATED PHAGOCYTOSES (LAP)</i>	64
FIGURE 16 : "MARQUES DISTINCTIVES DU CANCER" : UN MODELE APPLICABLE A LA CARCINOGENESE ASSOCIEE AUX HPV	79
FIGURE 17 : PRINCIPALES FONCTIONS DE L'ONCOPROTEINE E7 DANS LA CARCINOGENESE	82
FIGURE 18 : PRINCIPALES FONCTIONS DE L'ONCOPROTEINE E6 DANS LA CARCINOGENESE	87
FIGURE 19 : L'EFFET INHIBITEUR DE L'ILG SUR LA MIGRATION DES CELLULES DU CANCER DU COL DE L'UTERUS CA SKI.....	107
FIGURE 20 : L'EFFET INHIBITEUR DE L'ILG SUR L'ACTIVITE GELATINOLYTIQUE, L'EXPRESSION ET/OU LA SECRETION DE MMP-2 ET -9 DES CELLULES DU CANCER DU COL DE L'UTERUS CA SKI	108
FIGURE 21 : EFFETS DE L'ILG DANS UN MODELE MURIN DE XENOGREFFES DE LIGNEES CELLULAIRES DU CANCER DU COL DE L'UTERUS HELA ET CA SKI.....	110
FIGURE 22 : L'INTERNALISATION DES CELLULES EN APOPTOSE PRECOCE (EAC) PAR LES FIBROBLASTES PRIMAIRES HUMAINS (HPFs) EST INHIBEE A 4°C ET EN PRESENCE D'EDTA, DE CYTOCHALASINE D ET DE DIMETHYLE AMILORIDE.....	154
FIGURE 23 : AVANCEMENT DU PROCESSUS DE MORT DES CELLULES EN APOPTOSE PRECOCE (EAC) AU COURS DU TEMPS.....	154
FIGURE 24 : CONFIRMATION DE L'EXPRESSION DE BAI1 DANS LES FIBROBLASTES PRIMAIRES HUMAINS (HPFs) ET VALIDATION DE LA SPECIFICITE DE L'ANTICORPS BAI1 H270	156
FIGURE 25 : DEPENDANCE DE L'ACQUISITION DE PROPRIETES DE CROISSANCE EN AGAR MOU ET DU THG A LA CAPTURE DES CELLULES APOPTOTIQUES HPV+ PAR LES FIBROBLASTES PRIMAIRES HUMAINS (HPFs)	159
FIGURE 26 : CAPACITE TUMORIGENIQUE DES CELLULES APOPTOTIQUES TUMORALES HELa <i>IN VIVO</i>	162

Table des tableaux

TABLEAU 1 : PROTEINES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS L'INTERNALISATION DES CELLULES APOPTOTIQUES	52
TABLEAU 2 : SEQUENCES DES AMORCES	158
TABLEAU 3 : ACTIVITE CYTOTOXIQUE DE L'ILG SUR LES LIGNEES CELLULAIRES HUMAINES DE CANCER DU COL DE L'UTERUS ET EFFETS MODULATEURS SUR LES PHENOTYPES ASSOCIES A L'INVASION	168

Liste des abréviations

4E-BP : eIF4E Binding Protein

β_2 GPI : β_2 -Glycoprotein I

β_2 GPI-R : β_2 GPI-receptor

$\Delta\psi_m$: potentiel membranaire mitochondrial

A

ABC : ATP-binding-cassette transporter

ACAMP : Apoptotic cell-associated molecular pattern

aCHO : altered carbohydrate

Ada3 : transcriptional adapter 3 homolog

ADN : acide désoxyribonucléique

AIF : apoptosis-inducing factor

ANT : Adenine Nucleotide Translocator

Anx V : annexine V

AP : activator protein

APAF-1 : apoptosis protease activating factor-1

ARF : alternative open reading frame

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

Arp : actin-related protein

ASGPR : asialoglycoprotein receptor

ATF6 α : activating transcription factor 6 α

Atg : autophagy-related protein

ATM : ataxia telangiectasia mutated

ATP : adénosine triphosphate

ATR : ataxia telangiectasia and RAD3-related

B

BAD : BCL-2 antagonist of cell death

BAI1 : Brain-specific angiogenesis inhibitor 1

BAK : BCL-2 antagonist/killer

BAX : BCL-2-associated X

BCL-2 : B-cell lymphoma-2

BCL-W : BCL-2 like 2 protein

BCL-X_l : BCL-2 eXtra large

BH : BCL-2 homology

BH3 : BCL-2 homology 3

BID : BH3-interacting domain death agonist

BIK : BCL-2-interacting killer

BIM : BCL-2-interacting mediator of cell death

BIR : baculoviral IAP repeat

BMF : BCL-2-modifying factor

BMI1 : B Lymphoma Mo-MLV Insertion region 1

BMP : bone morphogenetic protein

BOK : BCL-2-related ovarian killer protein

BR : à bas risque

BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine

C

C- : carboxy

c-myc : cellular-myelocytomatosis

C. elegans : Caenorhabditis elegans

C3PI3K : class III PI3K

CA : cellule apoptotique

Ca²⁺ : calcium

CAD : caspases activated DNase

CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain

CBP : CREB-binding protein

CCR5 : chemokine (C-C motif) receptor 5

CD : cluster of differentiation

CDC : Cell division cycle

CDK : cyclin-dependent kinase

CED : cell-death determining

cFLIP : cellular FLICE inhibitory protein

CHOP : CCAAT/enhancer binding protein homologous protein

ciAP : cellular IAP

CKI : CDK inhibitor

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CR : complement receptor

Cr : conserved region

CREB : cyclic AMP response element binding protein

Crkl : v-crkl avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog

CRP : C-reactive protein

CRT : calréticuline

CXCR4 : chemokine (C-X-C motif) receptor 4

CYLD : cylindromatosis

D

DAMP : damage-associated molecular patterns

DAPK1 : death-associated protein kinase-1

DD : death domain

DED : death-effector domain

DFF40/CAD : DNA fragmentation factor 40/caspase activated-DNase

DFF45/ICAD : DNA fragmentation factor 45/inhibitor of CAD

DH : Dbl-homology

DIABLO : direct IAP-binding protein with low pI

DISC : death-inducing signaling complex

Dlg1 : Drosophila disc large tumor suppressor 1

DMA : diméthyle amiloride

DNMT1 : DNA methyltransferase 1

Dock180 : Dedicator of cytokinesis 1

DR : death receptor
dRPS19 : dimère de la protéine ribosomique S19

E

E6AP : E6-associated protein
E6TP1 : E6-targeted protein 1
EAC : Early Apoptotic/Dying Cells
EBER : EBV-encoded RNA
EBNA1 : Epstein Barr Nuclear Antigen 1
EBV : Epstein Barr virus
EGF : epidermal growth factor
EGFR : EGF Receptor
eIF : eucaryotic Initiation Factor
ELMO : Engulfment and cell motility
EMAP-II : endothelial monocyte activating polypeptide II
EndoG : endonucléase G
ERO : espèces réactives de l'oxygène

F

FADD : Fas-associated protein with DD
FAK : focal adhesion kinase
Fas : apoptosis stimulating fragment
FasL : Fas ligand
FcyR : Fcy receptor
FIP200 : 200 kDa FAK-family interacting protein
FISH : fluorescence in situ hybridization
FKN : fractalkine
FLICE : FADD-like ICE

G

GAP : GTPase-activating protein
Gas : growth-arrest-specific
GDI : guanine nucleotide dissociation inhibitor
GEF : guanine-nucleotide-exchange factors
GFP : green fluorescent protein
GPI : glycosylphosphatidylinositol
Gps : G protein pathway suppressor
GRap : Grb-2 related adaptator protein
Grb-2 : Growth factor receptor-bound protein 2
GRP78 : 78 kDa glucose-regulated protein
GTP : guanosine triphosphate
GULP : engulfment adaptor PTB domain containing

H

H : histone
H-ras^{V12} : Harvey-rat sarcoma viral oncogene homolog
H⁺ : protons
HARE : hyaluronic acid receptor for endocytosis
HAT : histone acetyltransferase

HDAC : histone deacetylase
HDGF : hepatoma-derived growth factor
hDlg : homolog of Drosophila disc large
HERDS : heterogeneous ectopic ribonucleoprotein-derived structure
HIF-1 α : hypoxia-induced factor 1 alpha
hMCM7 : human minichromosome maintenance 7
HMGB-1 : high mobility group box 1 protein
HOPS : homotypic fusion and protein sorting
HPFs : human primary fibroblasts
HPV : human papillomavirus
HR : à haut risque
HRG : histidine-rich glycoprotein
HRK : activator of apoptosis Harakiri
hScrib : homolog of Drosophila scribble
HSPG : heparan sulphate proteoglycan
HSPs : heat shock proteins
hTERT : human telomerase reverse transcriptase
HtrA2 : High temperature requirement protein A2

I

IAP : inhibitor of apoptosis protein
IBM : IAP binding motif
ICAM : intercellular adhesion molecule
ICE : interleukin-1 β converting enzyme
Ig : immunoglobuline
IGFR : insulin-like growth factor receptor
IKK : I κ B kinase
IL : interleukine
IL-6R : récepteur de IL-6
ILG : isoliquritigénine
INSR : insulin receptor
IP : iodure de propidium
IRF : Interferon Regulatory Factor
ITIM : intrinsic immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

J

JNK : c-Jun N-terminal kinase

K

KIM-1 : kidney injury molecule 1

L

LAC : Late Apoptotic/Dead Cells
LAMP : lysosome-associated membrane protein
LAP : LC3-associated phagocytosis
LAPosome : LAP-engaged phagosome
LC3-II : LC3 lipidée
LCR : long control region

LOX-1 : lectin-like oxLDL receptor-1
LPC : lysophosphatidylcholine
LRP : low-density lipoprotein receptor-related protein
LTF : lactoferrine
LUBAC : linear ubiquitin chain assembly complex

M

MAGI : membrane-associated guanylate kinase homology protein with an inverted domain structure
MAP1LC3/LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MBL : mannose binding lectin
MCL-1 : myeloid cell leukaemia sequence 1
MCSF : macrophage colony-stimulating factor
MEC : matrice extracellulaire
MEF : mouse embryonic fibroblasts
MEM : membrane externe mitochondriale
MET : microscopie électronique à transmission
MFG-E8 : Milk Fat Globuline EGF factor 8
MGMT : O(6)-methylguanine-DNA methyl transferase
MIM : membrane interne mitochondriale
MLC : myosin light chain
MLKL : mixed lineage kinase domain-like
MMP : métalloprotéase matricielle
MOMP : mitochondrial outer membrane permeabilization
Mre : meiotic recombination element
MST1 : Mammalian Sterile-20-like-kinase 1
MSU : monosodium urate
MTM-1 : myotubularin
mTOR : mammalian target of rapamycin complex 1
MUPP-1 : multi PDZ protein 1
Mφ : macrophages dérivés de monocytes humains

N

N- : amino
NCCD : Nomenclature Committee on Cell Death
NF-κB : Nuclear Factor-κB
NFX : nuclear factor binding to a X1 box sequence
NHERF-1 : Na/H exchange regulatory factor-1
NOX2 : NADPH oxidase-2
NuMa : nuclear mitotic apparatus

O

Omi : Omi stress-regulated endoprotease

ORPL1 : oxysterol-binding protein-related protein 1
oxLDL : oxidized low-density lipoprotein-like moiety
OxPL : oxidized phospholipid

P

PABP4 : poly(A)-binding protein 4
PALJ : Pals1-associated tight junction
PAMP : Pathogen-associated molecular pattern
PBMC : peripheral blood mononuclear cells
PBS : phosphate buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
PDZ : PSD95/Dlg1/ZO-1
PE : phosphatidyléthanolamine
PERV : Porcine Endogenous RetroVirus
PH : pleckstrin homology
PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase
PIDD : p53-inducible protein with a DD
PIP3 : phosphatidylinositol 3-phosphate
Plk 4 : Polo-like kinase 4
pRb : protéine du rétinoblastome
PRR : Pattern Recognition Receptor
Prx : peroxirédoxines
PS : phosphatidylsérine
PSD95 : post synaptic density 95
PSR : PS receptor
PTPC : mitochondrial permeability transition pore complex
PTPN3 : protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3
PTX : pentraxines
PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis
PV : papillomavirus

R

Rac : Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RAGE : receptor for advanced glycation end products
RAIDD : RIP-associated ICH-1 ICE/CED-3 homologue 1 protein with a DD
Ras : Rat sarcoma
RE : réticulum endoplasmique
REF : rat embryonic fibroblasts
Rho : Ras homolog
RhoA : Rho family member A
RILP : Rab7-interacting lysosomal protein
RING : really interesting new gene
RIP1 : Receptor interacting protein 1
ROCK : Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase
RT : reverse transcriptase

Rubicon : RUN domain protein as Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing

S

S1P : sphingosine-1-phosphate
S1PR : récepteur de S1P
SAP : serum amyloid P
SCID : severe combined immunodeficiency
SHPS-1 : Src homology 2 domain-bearing protein tyrosine phosphatase substrate-1
SIRPα : signal-regulatory protein α
Smac : second mitochondria-derived activator of caspases
SNARE : soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
SP : surfactant protein
Sp1 : specificity protein 1
SR : scavenger receptor
SRB : sulforhodamine B
SV40 : simian vacuolating virus
SV40LT : antigène T de SV40
SVF : sérum de veau fœtal

T

t-BID : truncated-BID
TAM : Tyro-3-Axl-Mer
TBS : TSP-binding site
TEM : transition épithélio-mésenchymateuse
TGF : tumor growth factor
Th : T helper
THG : transfert horizontal de gènes
TIM : T-cell Ig and mucin-domain-containing molecule
TIP60 : Tat interacting protein 60 kDa
TLR : Toll-like receptor
TNF : tumor necrosis factor
TNFR : TNF-receptor
TRADD : TNFR-associated protein with DD
TRAF2 : TNFR-associated factor 2
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAILR : TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor
TSP : thrombospondine

U

ULK : unc-51 like autophagy activating kinase
uPA : urokinase-type plasminogen activator
UPR : unfolded protein response
USF-1/2 : upstream stimulating factors 1/2
USP : ubiquitine-specific peptidase
UTP : uridine 5'-triphosphate
UV : ultra-violet

UVRAG : UV radiation resistance-associated gene

V

V-ATPases : vacuolar ATPases
VAMP7 : vesicle-associated membrane protein 7
VDAC : Voltage Dependent Anion Channel
VEGF : vascular endothelial growth factor
VIH-1 : virus de l'immunodéficience humaine 1
Vps : vacuolar protein sorting-associated

W

WASP : Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE : WASP family verprolin homologous protein
WIF1 : Wnt inhibitory factor 1

X

XBP1U : unspliced form of X-box binding protein1
XIAP : X-linked IAP
XRCC1 : X-ray repair cross complementing 1

Z

ZO-1 : Zonula Occludens-1

Première partie : Revue de la littérature

1. La mort cellulaire

1.1. Généralités

L'histoire des sciences nous démontre que la définition de la vie et la mort de la cellule, unité de base du vivant, s'avère problématique car en perpétuelle évolution. En effet, les travaux scientifiques du XIX^{ème} siècle (1838) conduits par Matthias Jakob Schleiden, Theodor Schwann et Rudolf Carl Virchow proposent que (i) tous les organismes vivants sont composés de une ou plusieurs cellules ; (ii) la cellule est l'unité de base de la vie ; et (iii) que toutes les cellules surviennent à partir de cellules vivantes préexistantes. Cette théorie communément appelée "théorie cellulaire" ou "*cell-theory*" s'articule uniquement sur l'étude du "vivant", et a contribué au cours d'une longue période à la négligence du phénomène de mort cellulaire. Bien que les premières descriptions morphologiques de mort cellulaire surviennent dès 1885 par Walter Flemming, ce n'est qu'en 1964 que la notion de mort cellulaire programmée émerge notamment par les travaux de Lockhin pour décrire la mort cellulaire observée au cours du processus de métamorphose des insectes (1). Le terme d'apoptose, provenant du grec ancien "αποπτωση" et évoquant "la chute des feuilles en automne", a été utilisé pour la première fois par Kerr en 1972 pour décrire une mort cellulaire particulière sur le plan morphologique et aboutissant à la formation de corps qui conservent initialement leur intégrité membranaire et qui contiennent des fragments de noyau, des organites préservés et divers constituants du cytoplasme (corps apoptotiques) (2). L'observation histologique de ce phénomène lui a d'abord valu le nom de "*shrinkage necrosis*" en opposition avec le phénomène de mort cellulaire par nécrose déjà connu à cette époque.

Suite à ces travaux, la première classification de mort cellulaire a été établie en 1973 sur la base d'éléments morphologiques et propose 3 types de mort cellulaire : la mort cellulaire de type I (apoptose) se manifestant par les caractéristiques morphologiques décrites ci-après (cf. Revue de la littérature, paragraphe 2.2.1) ; de type II (autophagie), caractérisé par une importante vacuolisation du cytoplasme; et de type III (nécrose) ne présentant aucune des caractéristiques spécifiques à l'apoptose et à l'autophagie (3). Cette classification "visuelle" a dominé le domaine de la recherche relative à la mort cellulaire pendant des décennies. Depuis, notre connaissance des processus de mort cellulaire a évolué au cours du temps par étapes successives qui ont contribué à la reconnaissance de changements cellulaires caractéristiques. La microscopie optique et électronique puis l'avènement de marqueurs biochimiques spécifiques ont permis d'affiner la définition de ces différents modes de mort cellulaire et de révéler une complexité plus importante qu'initialement entrevue. Actuellement, la mort cellulaire se définit par une perte définitive des fonctions vitales dont les critères qui permettent d'affirmer cet état définitif sont à préciser. En pratique et selon les

recommandations récentes du comité de la nomenclature de la mort cellulaire (NCCD pour *Nomenclature Committee on Cell Death*), la mort cellulaire est avérée par l'observation de l'un ou l'autre de ces deux critères : la perméabilisation irréversible de la membrane plasmique ou la fragmentation complète de la cellule (4). Deux modalités de la mort cellulaire, mutuellement exclusives, s'inscrivent alors dans cette définition : la mort accidentelle et la mort régulée.

1.2. La mort cellulaire accidentelle

Survenant lorsque la cellule subit des agressions externes extrêmes d'ordre physique (variations de température ou de pression), chimique (puissant détergent ou variations de pH) ou mécanique (cisaillement, broyage), la mort cellulaire accidentelle est immédiate et ne peut être prévenue par intervention pharmacologique ou génétique. Elle ne peut donc faire l'objet d'une approche thérapeutique ciblée (4).

1.3. La mort cellulaire régulée

À l'inverse de la mort cellulaire accidentelle, la mort cellulaire régulée implique l'existence de mécanismes moléculaires qui la gouvernent et la possibilité d'interférer avec ceux-ci par des interventions génétiques ou pharmacologiques. La mort cellulaire régulée est appelée mort cellulaire programmée lorsque celle-ci est physiologique comme lors de sa mise en œuvre dans le développement embryonnaire et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire ou la réponse immune. Elle implique une élimination génétiquement déterminée des cellules. Elle s'oppose à la mort cellulaire régulée provoquée par la modification de l'environnement cellulaire et notamment l'infection par des pathogènes. Elle se définit dès lors comme la conséquence de l'incapacité de la cellule à rétablir son homéostasie suite à ces changements de conditions du milieu dans lequel évolue la cellule (4).

1.4. Les différents types de mort cellulaire

Aujourd'hui, trois types principaux de mort cellulaire sont reconnus : l'**apoptose**, la **mort cellulaire autophagique** et la **nécrose** (5, 6) (Figure 1).

L'**apoptose** est la mort cellulaire la mieux documentée à ce jour et, de fait, est considérée comme l'exemple principal de mort cellulaire régulée (Figure 1). Elle joue un rôle fondamental dans le maintien de l'équilibre homéostatique tissulaire (7). Les travaux de Horvitz menés sur l'étude du

développement du nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) ont largement contribué à notre compréhension des mécanismes impliqués dans le processus d'apoptose des cellules de mammifères (8). Dans la suite de ce manuscrit, seront développées les connaissances actuelles sur le processus d'apoptose, notamment son rôle dans les phénomènes physiologiques et pathologiques, ses différentes voies d'induction, ses caractéristiques morphologiques et biochimiques, ainsi que la prise en charge des corps apoptotiques résultant de ce phénomène par les phagocytes et leur devenir.

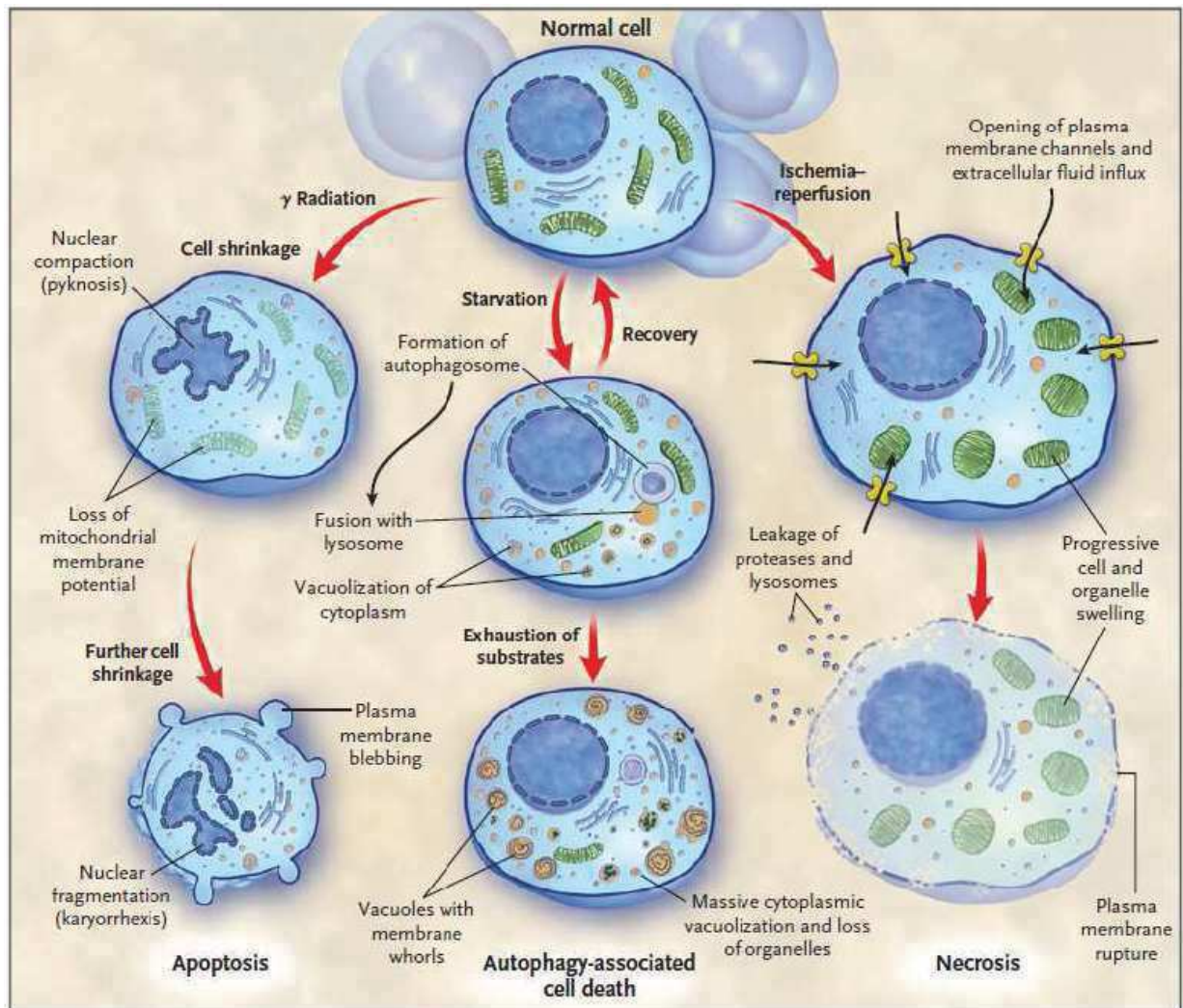


Figure 1 : Différents types de mort cellulaire : apoptose, mort cellulaire associée à l'autophagie, nécrose (d'après (9))

L'**autophagie**, qui signifie "se manger soi-même" (du grec "auto" soi-même et "phagie" manger), constitue de prime abord un mécanisme de survie de la cellule en réponse à un stress subléthal tel qu'une carence en nutriments ou en facteurs de croissance et par lequel les constituants du cytoplasme (organites ou macromolécules non essentiels, redondants ou altérés) sont séquestrés dans des vésicules à doubles membranes (autophagosomes) qui vont fusionner avec les lysosomes pour la dégradation de leur contenu (Figure 1). L'auto-digestion et le recyclage de ses propres composants permettent ainsi à la cellule de pallier ses besoins en substrats. Lorsque la carence

persiste, la cellule enclenche un processus de mort cellulaire associée à l'autophagie (*autophagy-associated cell death*) (9).

La définition de la **nécrose**, du grec "nekros", initialement caractérisé par l'absence de modifications cellulaires caractéristiques de l'apoptose ou de l'autophagie en 1973, a depuis été largement reconsidérée (3). En effet, la nécrose peut se manifester avec un panel de caractéristiques telles qu'une augmentation du volume cellulaire ("oncosé"), un gonflement ("*swelling*") des organelles, des altérations particulières de la chromatine (condensation modérée) et de l'enveloppe nucléaire (dilatation) ainsi qu'une rupture précoce de la membrane plasmique avec libération du contenu intracellulaire induisant une réaction inflammatoire chez l'individu (5, 10) (Figure 1). Outre les changements morphologiques, l'absence d'activation de la cascade des caspases et la déplétion en adénosine triphosphate (ATP) constituent des caractéristiques singulières de la nécrose. La mort par nécrose, faisant généralement suite à des traumatismes cellulaires importants tels que des stress physiques, chimiques ou mécaniques, a longtemps été considérée comme une **mort strictement accidentelle** non physiologique à l'inverse de l'apoptose et de la mort cellulaire associée à l'autophagie, toutes deux classées comme **morts cellulaires régulées**. Or, récemment, des voies régulées d'induction de la nécrose ont été décrites, remettant en cause cette stricte dualité. En effet des études révèlent l'existence d'une mort cellulaire régulée dénommée "**nécroptose**" qui nécessite la fixation des ligands *tumor necrosis factor* (TNF)- α , *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) et Fas ligand (FasL) sur les récepteurs de mort connus pour être impliqués dans l'apoptose extrinsèque et présente les caractéristiques morphologiques nécrotiques (10-13). L'évolution de la caractérisation morphologique de la nécrose reflète le fait que la mort cellulaire régulée peut aussi se manifester avec un aspect nécrotique.

D'autres types de morts cellulaires régulées ont été décrits ou pourraient encore être découverts. Par exemple, l'**anoïkis** a été définie comme une forme d'apoptose déclenchée suite à la perte de contact d'une cellule épithéliale avec la matrice extracellulaire (MEC) (14). L'anoïkis protège de ce fait contre la prolifération ectopique de cellules et préserve l'architecture tissulaire. Aussi, l'**entose** a été décrite comme une mort cellulaire non apoptotique suite à l'internalisation de cellules cibles vivantes par des cellules environnantes, aboutissant à une structure "*cell-in-cell*" et pouvant donner lieu à la mort cellulaire de la cellule internalisée après dégradation par les enzymes lysosomales de la cellule receveuse (15).

1.5. Apoptose : fonctions physiologiques et pathologiques

L'apoptose est une mort cellulaire extrêmement conservée durant l'évolution et impliquée dans de nombreux systèmes biologiques des organismes pluricellulaires. Elle joue un rôle essentiel dans le développement et l'homéostasie cellulaire et tissulaire (7). Ce processus participe par exemple à l'élimination des tissus interdigitaux au cours des phases de développement embryonnaire et fœtal (16) et, à l'âge adulte, au renouvellement des tissus cérébraux (17) et à l'élimination de cellules potentiellement dangereuses - tels que les lymphocytes T et B auto-réactifs (18), les cellules infectées par des pathogènes en particulier les virus (19) ou dont l'ADN est irréversiblement endommagé - pour maintenir l'intégrité génomique et l'homéostasie cellulaire. De plus, elle s'avère être une composante essentielle du phénomène de cicatrisation (élimination des cellules inflammatoires et évolution du tissu cicatriciel) et de vieillissement (17). L'apoptose est ainsi un moyen d'élimination des cellules mutées ou indésirables et constitue une défense contre les pathogènes. Ce processus génétiquement contrôlé est essentiel à la vie et au développement des organismes pluricellulaires. En effet, l'homéostasie tissulaire est garantie par l'élimination des cellules surnuméraires (20). Outre son rôle dans l'élimination de certains lymphocytes indésirables, l'apoptose peut avoir d'autres implications au sein du système immunitaire. Dans le cas où certaines cellules parviennent à contourner les contraintes liées à une prolifération illimitée (cellules transformées) ou suite à une infection par un virus, pour lesquelles aucune mort cellulaire n'est activée, la composante du système immunitaire va prendre le relais et induire l'apoptose de ces cellules indésirables. Les cellules effectrices principales de cette immunosurveillance sont les lymphocytes T cytotoxiques et les "*Natural Killer*", du système immunitaire adaptatif et inné respectivement, qui induisent l'apoptose de la cellule cible principalement par la voie des récepteurs de mort (21) et par une voie spécifique d'activation des caspases impliquant le transfert de granules cytotoxiques des cellules immunitaires à la cellule cible (22). Ces granules contiennent la molécule perforine qui va former un pore dans la cellule cible et permettre le passage d'autres de ces composants, notamment le granzyme B, qui est une protéase dont les substrats directs sont les caspases-3, -7, -8 et -10 (23, 24).

Par conséquent, les dérégulations de l'apoptose sont susceptibles d'entraîner des phénomènes physiopathologiques. Des anomalies congénitales du développement et certaines maladies neurodégénératives chroniques (amyotrophie spinale, sclérose latérale amyotrophique, chorée de Huntington, maladie d'Alzheimer et de Parkinson) sont associées à un excès d'apoptose (25). À l'inverse, un défaut d'apoptose a été identifié dans le développement de maladies auto-immunes résultant de l'échappement de certains lymphocytes auto-réactifs au processus de sélection clonale

lymphocytaire (26, 27). Aussi, de nombreux cas de cancer ont été caractérisés par un défaut ou un blocage de l'exécution du processus apoptotique (25).

La carcinogenèse est un phénomène multi-étapes par lequel des altérations génétiques successives sont capables d'induire la transformation de cellules normales en cellules malignes. Par ailleurs, l'altération de l'apoptose représente un facteur causal majeur dans le développement et la progression du cancer (28-30). En effet, l'analyse moléculaire des mutations somatiques survenant dans les tumeurs a révélé que de nombreux gènes agissant sur les voies de signalisation et d'exécution de l'apoptose sont affectés par des mutations (31). La capacité des cellules tumorales à se soustraire à l'engagement de l'apoptose afin de promouvoir leur survie contribue à leur accumulation, leur potentiel métastatique et favorise ainsi la progression tumorale, mais peut aussi jouer un rôle important dans leur résistance aux schémas thérapeutiques classiques (21, 32). Notre compréhension de la complexité de l'apoptose et des mécanismes développés par les cellules tumorales pour résister à la mort cellulaire a principalement concentré les efforts de recherche dans le développement de stratégies visant à induire sélectivement l'apoptose dans les cellules cancéreuses (33-36).

2. Apoptose : de l'induction à la prise en charge de la cellule apoptotique

Le processus d'apoptose comprend classiquement trois étapes successives : une phase d'induction ou initiation, une phase d'exécution et une phase de dégradation. La première d'entre elles, la phase d'initiation, est un phénomène réversible au cours duquel le signal apoptotique, qui peut être d'ordre intra- ou extra-cellulaire, est transmis aux caspases initiatrices par des molécules adaptatrices. L'activation de ces caspases initiatrices entraîne en cascade l'activation des caspases effectrices qui interviennent dans l'exécution de l'apoptose et conduisent au démantèlement ordonné et séquentiel de la cellule (37, 38).

2.1. Voies d'induction de l'apoptose

Il existe deux voies principales d'induction de l'apoptose : la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort et la voie intrinsèque ou voie mitochondriale, qui ont la spécificité de pouvoir interagir entre elles (21). Elles diffèrent dans l'implication de caspases initiatrices et de molécules adaptatrices distinctes, mais convergent généralement sur la même voie d'exécution.

2.1.1. Les caspases

Chez les mammifères, il existe 14 caspases qui peuvent être classées en trois sous-types : les caspases initiatrices (caspases-2, -8, -9 et -10) et les caspases exécutrices (caspases-3, -6 et -7) associées à la voie de signalisation apoptotique, ainsi que les caspases associées à la voie de signalisation inflammatoire (caspases-1, -4, -5 et -12) qui transduisent l'activation protéolytique des cytokines inflammatoires (39). Certaines études suggèrent un rôle des caspases associées à l'apoptose dans des processus de survie cellulaire, prolifération, différenciation ou de migration (39-41). À noter que la caspase-14 semble impliquée dans la différenciation des kératinocytes de l'épiderme (42), tandis que 2 formes de la caspase-12 co-existent, une forme courte inactive (S) et une forme longue active (L) (38).

Les caspases sont une famille de protéases hautement conservées au cours de l'évolution. Le nom caspase est un acronyme de "*cysteine-dependent aspartate-specific protease*" (38, 43) ; leur propriété enzymatique étant gouvernée par leur spécificité pour des substrats protéiques contenant un résidu acide aspartique (D-X) et par l'utilisation d'une chaîne latérale cystéine pour catalyser le clivage de liaison peptidique. Synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes, les pro-caspases sont composées d'une chaîne polypeptidique simple comportant un pro-domaine amino (N)-terminal de taille et de séquence variables suivi d'un domaine catalytique conservé composé d'une grande et d'une petite sous-unité (44) (Figure 2A). Les pro-caspases sont subdivisées en

caspases initiatrices et effectrices en fonction de la taille de leur prodomaine et de leur mécanisme d'activation propre. Les caspases initiatrices possèdent un long prodomaine permettant leur recrutement par des molécules adaptatrices au sein de complexes multi-protéiques d'activation des caspases. En réponse aux stimuli pro-apoptotiques, ces plateformes moléculaires offrent la proximité nécessaire pour l'homodimérisation des caspases et leur auto-activation subséquente (Figure 2B). Les pro-caspases effectrices possèdent initialement un prodomaine court et sont sous forme d'homodimères. Les pro-caspases effectrices sont trans-activées par clivage protéolytique par les caspases initiatrices actives. Cette observation introduit la notion de cascade d'activation protéolytique des caspases (45) ; ce processus permettant la régulation et l'amplification du signal. Durant l'activation et/ou la maturation d'une caspase, le domaine catalytique est clivé en une grande (α) et une petite (β) sous-unités qui interagissent intimement l'une avec l'autre. Sous sa forme active, une caspase est un dimère de domaines catalytiques, c'est-à-dire composé de deux grandes et de deux petites sous-unités sous une conformation symétrique ($\alpha\beta\beta'\alpha'$) et possédant deux sites actifs par molécule. La grande sous-unité contient les résidus cystéines et histidines de la dyade catalytique, alors que la petite sous-unité forme le site de fixation du substrat protéique. Après activation, les régions reliant les prodomaines et domaines catalytiques sont l'objet de (auto)-protéolyse permettant la maturation des caspases actives sous une forme plus stable (46) (Figure 2B).

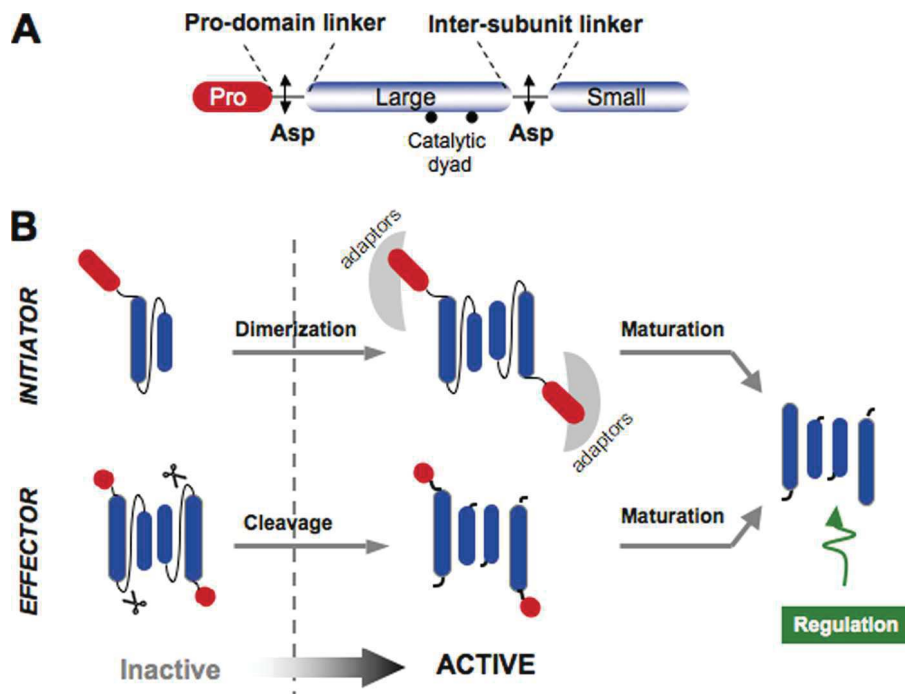


Figure 2 : Structure et mécanismes d'activation des caspases

(A) Structure des caspases. Un prodomaine précède le domaine catalytique, composé de deux sous-unités. Les sites de (auto)protéolyse au niveau des résidus acide aspartique sont indiqués par des doubles flèches. **(B)** Mécanismes d'activation. Les caspases initiatrices sont des monomères qui sont activés par dimérisation médiée par les prodomaines. Les caspases exécutrices sont des dimères qui sont activés par le clivage des domaines liant les deux sous-unités (d'après (46)).

Si les caspases initiatrices ont comme substrats les pro-caspases exécutrices (caspases-3, -6 et -7), plus de 400 substrats ont été identifiés pour les caspases effectrices mais la conséquence du clivage de chacun d'entre eux n'est pas connue dans la plupart des cas (47). Néanmoins, l'activation de certains d'entre eux a été associée aux modifications morphologiques observées pendant l'apoptose tels que la fragmentation de l'ADN, le bourgeonnement de la membrane ou la formation de corps apoptotiques. Ces modifications caractéristiques de l'apoptose, conduisent finalement à la mort de la cellule (48).

2.1.2. Voie intrinsèque ou voie mitochondriale

La voie intrinsèque, aussi appelée voie mitochondriale ou voie régulée par *B-cell lymphoma-2* (BCL-2), requiert l'implication de la mitochondrie qui constitue de fait le centre intégrateur de signaux pro- et anti-apoptotiques. Elle est activée en réponse à un large spectre de stimuli intracellulaires ou extracellulaires [augmentation du calcium (Ca^{2+}) ou des espèces réactives de l'oxygène (ERO), l'action d'oncoprotéines, de protéines virales ou d'agents chimio-thérapeutiques, dommages à l'ADN, rayonnements ultra-violet (UV) ou γ , déplétion en facteurs de survie] (49-51) qui déclenchent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MEM), perméabilisation (MOMP pour *mitochondrial outer membrane permeabilization*) dépendante des membres de la famille BCL-2 et responsable du relargage de protéines apoptogènes : (i) *second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis proteins (IAP)-binding protein with low pI* (Smac/DIABLO) et *Omi stress-regulated endoprotease/High temperature requirement protein A2* (Omi/HtrA2) qui sont des antagonistes des inhibiteurs endogènes de caspases nommés IAP, (ii) et le cytochrome c (Figure 3). Le cytochrome c est synthétisé sous forme de précurseur cytoplasmique inerte puis transloqué au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial où il exerce sa fonction physiologique de transporteur d'électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire (52). La chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) précède en général sa libération et constitue de fait un marqueur de la mort cellulaire (53). En effet, le $\Delta\psi_m$ est induit par un déséquilibre de charges dû à l'imperméabilité aux ions de la membrane interne mitochondriale (MIM) qui permet l'établissement d'un gradient de protons par la chaîne respiratoire, gradient utilisé par le complexe V de cette chaîne pour effectuer la synthèse d'ATP (54). Au cours de l'apoptose, le cytochrome c relargué dans le cytoplasme s'associe avec la molécule adaptatrice *apoptosis protease activating factor-1* (APAF-1) au niveau de motifs WD40. Cette fixation induit un changement de conformation de APAF-1 qui expose son domaine *Caspase Activation and Recruitment Domain* (CARD) (55). Cette nouvelle conformation est stabilisée par la fixation d'ATP qui permet l'oligomérisation de sept unités APAF-1/cytochrome c/ATP (56). Cet heptamère autorise le recrutement d'autant de molécules de pro-caspases-9 initiatrices par interaction homotypique entre

leur propre domaine CARD et celui des protéines APAF-1. Cette structure ultime forme l'apoptosome qui promeut l'activation de la caspase-9 par auto-protéolyse. À son tour, la caspase-9 initie la cascade des caspases effectrices qui déclenche l'exécution du programme apoptotique (55) (Figure 3). Enfin, Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 conduisent eux aussi à l'apoptose en se fixant aux IAP et en inhibant leurs activités anti-apoptotiques (cf. Revue de la littérature, paragraphe 2.1.5). Ces événements sont caractéristiques de la voie apoptotique nommée **voie mitochondriale dépendante des caspases** (Figure 3).

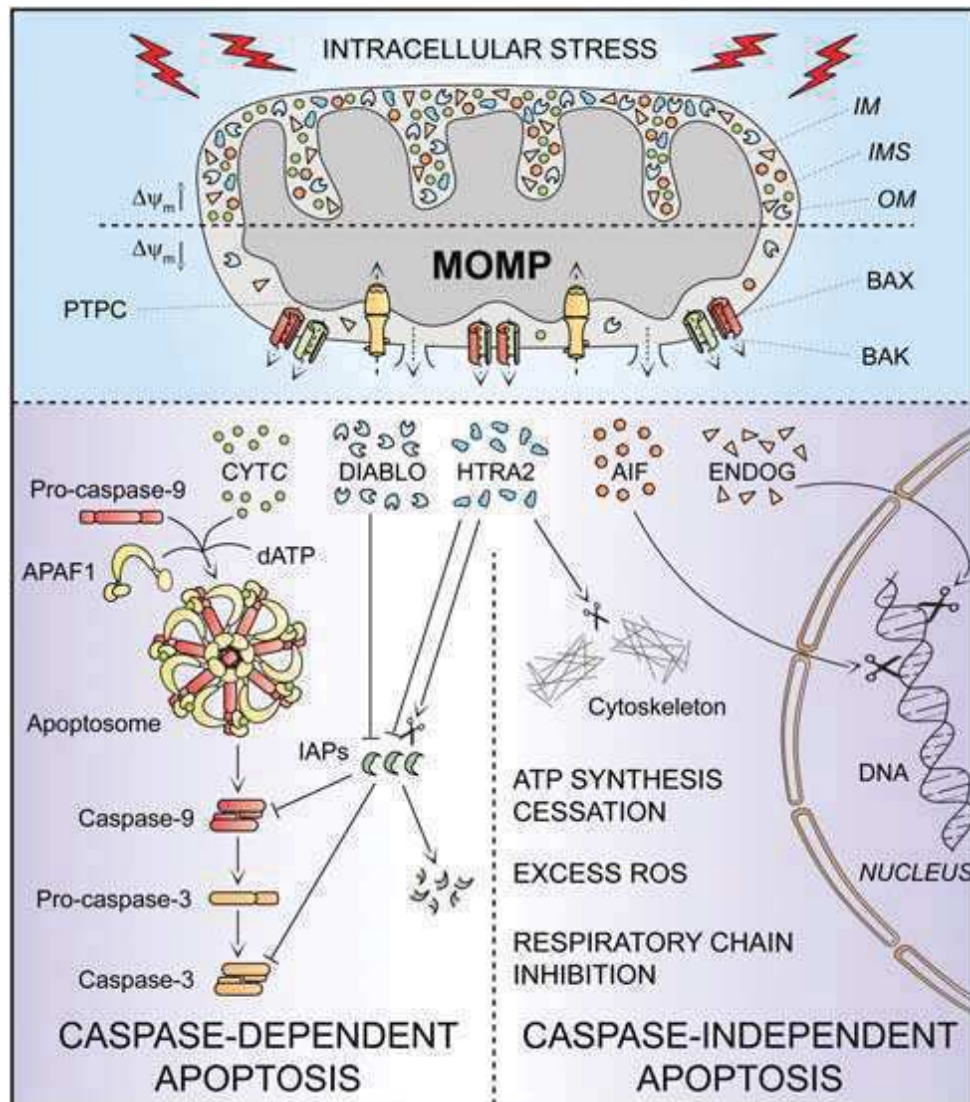


Figure 3 : Voie mitochondriale (intrinsèque) de l'apoptose (d'après (5))

La voie mitochondriale apoptotique peut être induite sous l'effet d'autres facteurs apoptogènes relargués par la mitochondrie : l'*apoptosis-inducing factor* (AIF) et l'endonucléase G (EndoG). Ces facteurs ne vont pas activer la cascade des caspases, mais une **voie mitochondriale indépendante des caspases** (Figure 3). Le facteur AIF est une flavoprotéine identifiée en 1996 qui joue un rôle indispensable dans le développement embryonnaire (57, 58). Le précurseur d'AIF est synthétisé dans

le cytoplasme puis importé dans la mitochondrie grâce à sa séquence d'adressage à la mitochondrie localisée dans sa partie N-terminale qui lui permet de s'enchâsser dans la MIM (57, 59) où elle exerce une activité NADH oxydase participant de ce fait au fonctionnement de la chaîne respiratoire dans une cellule saine (60). Après activation de la voie mitochondriale impliquant une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, l'AIF est clivé par la protéase dépendante du Ca^{2+} nommée calpaïne-I et transloqué de l'espace intermembranaire vers le cytosol puis le noyau (61) vraisemblablement grâce à une séquence de localisation nucléaire dans sa partie carboxy (C)-terminale (62). Dans le noyau, il s'associe avec la cyclophiline A pour induire une condensation périphérique de la chromatine ainsi que le clivage de l'ADN en larges fragments de 50 kb aboutissant à la mort cellulaire, ceci par interaction direct avec l'ADN sans spécificité de séquence (63, 64). Par ailleurs, l'AIF peut aussi affecter la perméabilité membranaire de la mitochondrie, ce qui suggère qu'il peut-être engagé dans une boucle d'auto-amplification par laquelle l'AIF relargué de certaines mitochondries pourrait agir sur d'autres pour compromettre l'intégrité de leurs membranes (57). L'EndoG est une nucléase mitochondriale de 30 kDa qui est capable de dégrader l'ADN et l'ARN *in vitro* et dont le rôle dans l'apoptose est très conservé chez les eucaryotes (65). L'EndoG est synthétisée dans le cytoplasme puis transloquée dans l'espace intermembranaire mitochondrial (66). L'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose conduit à la libération d'EndoG dans le cytosol puis à sa translocation dans le noyau, où elle participe à la dégradation inter-nucléosomale, à l'instar d'autres nucléases comme l'exonucléase ou la DNase I (65, 67). Son activité est responsable de la fragmentation de l'ADN en l'absence d'activité caspase et de nucléases caspase-dépendantes (68).

2.1.2.1. Le contrôle de l'apoptose par les protéines de la famille BCL-2

Les membres de la famille BCL-2 sont des régulateurs cruciaux de l'apoptose, déterminant le devenir cellulaire en réponse à divers stress cellulaires (69). La famille BCL-2 peut être subdivisée en trois sous-groupes fonctionnellement et structurellement distincts : les protéines BCL-2 *homology 3* (BH3)-*only* [BCL-2-*interacting mediator of cell death* (BIM), BH3-*interacting domain death agonist* (BID), p53 *upregulated modulator of apoptosis* (PUMA), BCL-2 *antagonist of cell death* (BAD), NOXA, BCL-2-*interacting killer* (BIK), *activator of apoptosis Harakiri* (HRK) et BCL-2-*modifying factor* (BMF)] qui agissent comme des senseurs des stress cellulaires pour initier l'apoptose ; les membres qui promeuvent la survie cellulaire (protéines anti-apoptotiques) [BCL-2, BCL-2 *eXtra large* (BCL-X_L), BCL-2 *like 2 protein* (BCL-W), *myeloid cell leukaemia sequence 1* (MCL-1), BCL-A1 et BCL-B] et les protéines effectrices pro-apoptotiques [BCL-2-*associated X* (BAX), BCL-2 *antagonist/killer* (BAK) et BCL-2-*related ovarian killer protein* (BOK)]. Ce sont les interactions entre les membres de ces trois sous-groupes, au sein de la MEM, qui gouvernent le déclenchement de l'apoptose par la voie intrinsèque. Ainsi, la famille BCL-2 peut être définie comme un commutateur apoptotique tripartite (69).

Les protéines BH3-*only* sont induites transcriptionnellement ou selon divers mécanismes post-traductionnels en réponse à divers stress cytotoxiques et, lorsqu'elles excèdent un seuil apoptotique, effectuent leur activité pro-apoptotique selon deux mécanismes : la neutralisation des protéines pro-survie et l'activation directe de BAX et BAK (70). L'activation conformationnelle des protéines pro-apoptotiques déclenche leur oligomérisation et leur insertion dans la MEM. Les interactions entre les membres de la famille de BCL-2 n'ont pas été systématiquement caractérisées et trois modèles moléculaires de contrôle de l'apoptose, proposés sur la base d'études structurales, sont l'objet d'intenses débats (69) (Figure 4).

Dans le modèle d'activation directe, certaines protéines BH3-*only* dites "activatrices", comme *truncated-BID* (t-BID), BIM et PUMA, s'enchâssent dans les effecteurs pro-apoptotiques BAX et BAK et les activent directement. Les protéines BH3-*only* n'ayant pas cette fonction, telles que BAD, sont identifiées comme sensibilisateurs pour indiquer qu'elles s'enchâssent uniquement au sein des protéines de la famille BCL-2 pro-survie, lesquelles libèrent les éventuelles protéines BH3-*only* "activatrices" au profit de l'activation de BAX et BAK. Alors que les protéines pro-survie comme BCL-2 séquestrent principalement les protéines BH3-*only* dans le modèle d'activation directe, dans le modèle d'activation indirecte les protéines pro-survie doivent également séquestrer les molécules BAX ou BAK qui semblent s'activer par une modification inconnue ou spontanément à un taux faible. Ce modèle souligne que BAX et BAK deviennent libres pour perméabiliser la MEM uniquement si toutes les protéines pro-survie sont neutralisées par les protéines BH3-*only*. Le consensus actuel suggère que le modèle mixte s'applique. Ce dernier modèle requiert que les protéines pro-survie séquestrent non seulement les protéines BH3-*only* mais aussi les protéines BAX et BAK activées (Figure 4).

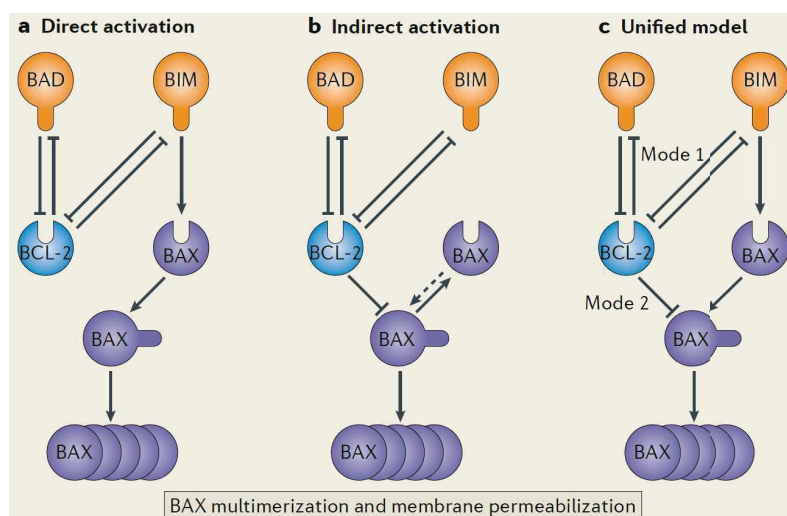


Figure 4 : Modèles d'interactions entre les membres de la famille BCL-2 participant au contrôle de l'apoptose
Trois modèles d'interactions probables entre les membres de la famille BCL-2 sont décrits. La congruence de ces modèles reste difficile à affirmer compte tenu de la détection problématique de tels complexes, probablement en raison du caractère transitoire des interactions mises en jeu (d'après (69)).

Les protéines de la famille BCL-2 contiennent toutes de 1 à 4 régions communes, appelées domaines BCL-2 *homology* (BH) (71). Les protéines BH3-*only* ne comptent qu'un seul domaine BH, tandis que les protéines pro-survie comme les protéines pro-apoptotiques partagent 4 domaines BH et adoptent une structure globulaire composée de 7 hélices α amphipathiques entourant une hélice α centrale hydrophobe ($\alpha 5$). Cette structure tridimensionnelle définit une poche hydrophobe formée par les domaines BH1, BH2 et BH3, constituant une interface cruciale pour des interactions avec le domaine BH3 des protéines BH3-*only* initiatrices (72). Ces interactions se produisent principalement au niveau des membranes intracellulaires, en particulier la MEM, dans laquelle de nombreux membres de la famille sont ancrés *via* un domaine C-terminal transmembranaire. En raison de subtiles différences dans le domaine BH3 des protéines BH3-*only* et dans la poche hydrophobe des protéines pro-survie, quelques protéines BH3-*only* comme BAD (qui se lie à BCL-2, BCL-X_L et BCL-W) et NOXA (qui se lie seulement à BCL-A1 et MCL-1) sont sélectives pour une partie des protéines pro-survie, tandis que les autres, plus particulièrement BIM, t-BID et PUMA, neutralisent probablement toutes les protéines pro-survie (73, 74). Des études basées sur des analyses structurales montrent que les protéines pro-survie peuvent aussi lier les domaines BH3 de BAX et BAK, et ainsi inhiber leur activité pro-apoptotique. Toutes les protéines pro-survie semblent se lier à BAX, mais BAK semble être séquestrée principalement par MCL1, BCL-A1 et BCL-X_L (75-78).

Dans les cellules saines, la protéine BAK est toujours localisée à la mitochondrie, avec un domaine transmembranaire enchâssé dans la MEM. En revanche, BAX est majoritairement cytoplasmique dans les cellules saines, avec son domaine transmembranaire niché au sein de sa poche hydrophobe. Néanmoins les signaux pro-apoptotiques promeuvent l'accumulation de BAX à la mitochondrie. Lors de l'induction de l'apoptose, la transition conformationnelle de BAK et de BAX inclut l'exposition du domaine cryptique N-terminal de BAX et l'exposition transitoire du domaine BH3 de BAK et BAX qui, par suite, s'insère dans la poche hydrophobe d'une protéine BAK ou BAX avoisinante (79). Cette transition de monomère inerte BAK ou BAX en homo-oligomère responsable de la MOMP est vraisemblablement induite par des protéines BH3-*only* aux fonctions activatrices comme BIM ou t-BID (80) (Figure 4). Les mécanismes qui expliqueraient comment ces homo-oligomères perforent et engagent la perméabilisation de la MEM restent non élucidés et sujets à controverse (pour revue (69)). Plusieurs hypothèses permettant d'expliquer l'origine des perturbations membranaires conduisant au relargage des protéines de l'espace intermembranaire ont été décrites. Elles impliquent (i) la rupture de la MEM suite à la déstabilisation de ses lipides ; (ii) la formation de canaux affectant la MEM suite à l'oligomérisation de BAX ou de BAK (pores BAX/BAK) ; (iii) la formation et/ou l'ouverture de canaux affectant la MEM suite à l'association de BAX avec les porines *Voltage Dependent Anion Channel* (VDAC) et *Adenine Nucleotide Translocator* (ANT) (pores

BAX/VDAC ou BAX/ANT) ; ou encore (iv) l'ouverture prolongée régulée par BAX d'un mégacanal nommé pore de transition de perméabilité (PTPC pour *mitochondrial permeability transition pore complex*) affectant la MIM et la MEM et conduisant au gonflement matriciel suivi de la rupture de la MEM (80, 81) (Figure 3). Ces mécanismes sont susceptibles de co-exister et aboutissent à la perméabilisation de la MEM et à la chute du $\Delta\psi_m$.

2.1.2.2. L'activation des caspases associée à un stress du réticulum endoplasmique

La mort cellulaire peut être induite par un stress du réticulum endoplasmique (RE). Ce stress est la conséquence de l'accumulation de protéines dont le repliement est imparfait ou d'une perturbation de l'homéostasie calcique. Après induction d'un stress du RE, plusieurs voies de signalisation, rassemblées sous le terme "*unfolded protein response*" (UPR) sont déclenchées pour remédier au stress initial (82, 83). En cas d'échec de la réponse UPR, la cellule entre en apoptose selon un mécanisme qui implique une communication entre le RE et la mitochondrie (84). En effet, les données de la littérature suggèrent qu'en condition de stress prolongé du RE, les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK déclenchent une altération conformationnelle de la membrane du RE pour permettre un flux de Ca^{2+} du RE vers le cytoplasme (85, 86). Le Ca^{2+} libéré en flux massif dans le cytoplasme peut déclencher l'activation de protéases telles que la calpaïne-I et peut entrer dans la mitochondrie menant à la dépolarisation de sa membrane interne et à l'activation de l'apoptose mitochondriale (87, 88). La signalisation calcique peut aussi s'effectuer *via* des microdomaines appelés *mitochondria-associated membranes* par lesquelles le RE et les mitochondries sont en contact étroit (89). La signalisation est aussi initiée par les protéines *CCAAT/enhancer binding protein homologous protein* (CHOP) et *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), exprimées et activées par la composante pro-apoptotique de la réponse UPR. CHOP peut induire une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (90). JNK va quant à lui phosphoryler BCL-2 et ainsi diminuer son interaction avec BAX et BAK et phosphoryler la protéine *BH3-only* BIM permettant une amplification de leur potentiel pro-apoptotique (82).

2.1.3. Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort

La voie apoptotique extrinsèque est activée en réponse à la fixation de ligands spécifiques de type cytokines, sur des récepteurs transmembranaires appelés récepteurs de mort (DR pour *death receptor*) (91), parmi lesquels le récepteur *apoptosis stimulating fragment* (Fas également appelé CD95 ou DR2), les récepteurs du TNF [TNFR1 (également appelé DR1) et TNFR2], les récepteurs de TRAIL (TRAILR1 et TRAILR2, également appelés respectivement DR4 et DR5) sont les mieux caractérisés (pour revue (92)) (Figure 5). Ces récepteurs, membres de la superfamille des récepteurs du TNF, possèdent des domaines extracellulaires riches en cystéine qui permettent l'interaction avec

les ligands et, pour la majorité d'entre eux, un domaine cytoplasmique d'environ 80 acides aminés appelé domaine de mort (DD pour *death domain*) jouant un rôle crucial dans la transduction du signal de mort de la surface de la cellule vers les voies de signalisation intracellulaire (93, 94). Les récepteurs Fas ou TRAILR1/2 sont exprimés à la surface des cellules sous forme d'homotrimères préassociés qui suite à la fixation de leur ligands (FasL et TRAIL respectivement) vont subir une modification conformationnelle révélant leur DD cytoplasmique en faveur d'interactions homotypiques avec d'autres protéines comprenant un DD comme la protéine adaptatrice *Fas-associated protein with DD* (FADD). A son tour, FADD recrute la pro-caspase-8 (ou -10 chez l'Homme) par des interactions entre leur domaine effecteur de mort (DED pour *death-effector domain*) permettant l'assemblage du *death-inducing signaling complex* (DISC). Cette plateforme moléculaire associée aux récepteurs de mort favorise la concentration locale des pro-caspases-8 ou -10 sous leurs formes zymogènes non-actives qui sont alors en mesure de s'activer par clivage auto-protéolytique (95) (Figure 5).

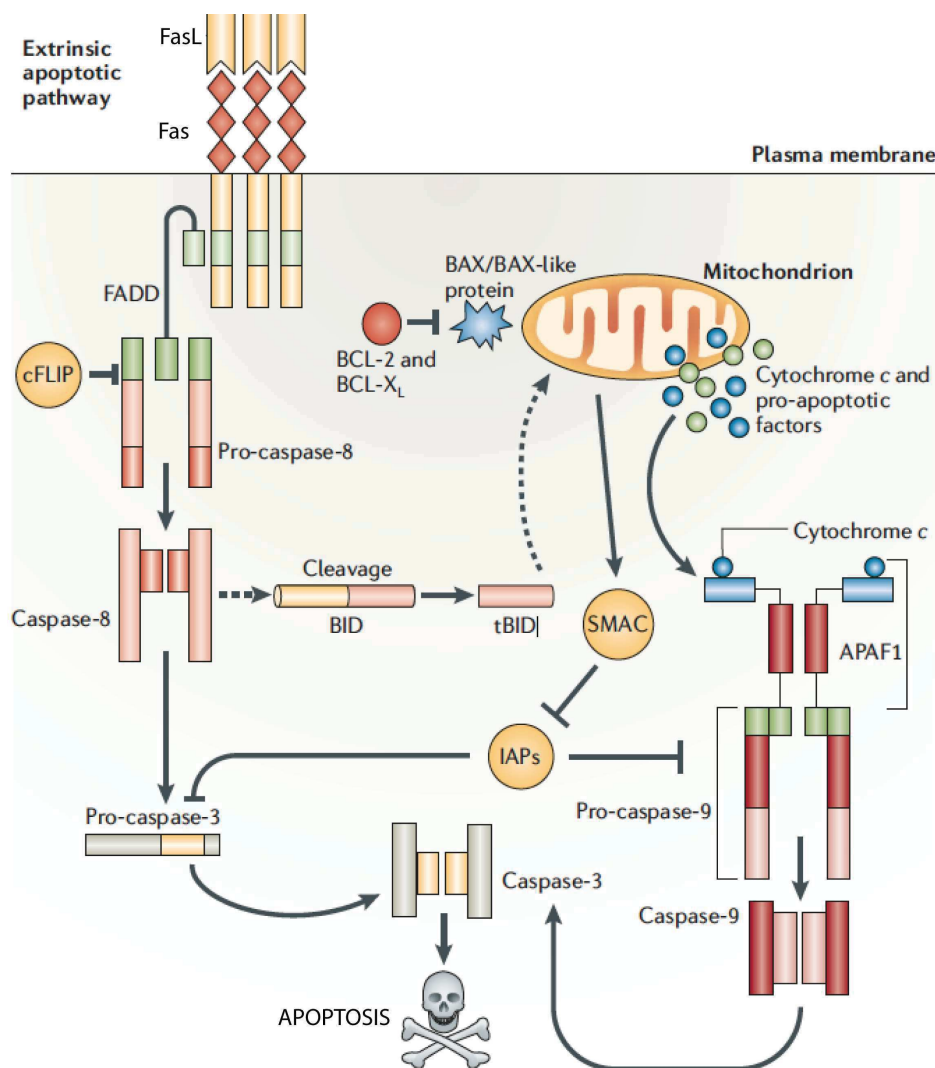


Figure 5 : Voie des récepteurs de mort (extrinsèque) de l'apoptose (adaptée d'après (96))

Dans le cas de l'activation de TNFR1, Micheau et Tschopp ont démontré que différentes protéines contenant des DD peuvent former des complexes oligomériques susceptibles d'évoluer au cours du temps (97) (Figure 6). Dans les minutes qui suivent la stimulation de TNFR1 par son ligand, un complexe comprenant la molécule adaptatrice *TNFR-associated protein with DD* (TRADD), la sérine/thréonine kinase *Receptor interacting protein 1* (RIP1), *TNFR-associated factor 2* (TRAF2) et *cellular IAP* (cIAP) 1/2, s'assemble à la membrane plasmique, recrute et active le complexe *I κ B kinase* (IKK) et induit de ce fait l'activation de la voie canonique du *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B) en faveur de la survie cellulaire (92). RIP1 est polyubiquitiné par le complexe *linear ubiquitin chain assembly complex* (LUBAC) et cIAP1/2 qui sont des E3 ubiquitine ligases, empêchant RIP1 de se lier à la pro-caspase-8 (98-100). La voie de signalisation NF- κ B contrôle l'expression de protéines anti-apoptotiques comme BCL-2, BCL-X_L et cIAP1/2 (101) et induit la surexpression de *cellular FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme* (FLICE) *inhibitory protein* (cFLIP) qui exerce une fonction d'inhibition de l'activation de la caspase-8 (51). cFLIP est ainsi un régulateur dans la formation du complexe pro-apoptotique II, et, par conséquent, l'inhibition de l'activation de NF- κ B ou l'inactivation fonctionnelle de ses cibles est nécessaire à l'activité pro-apoptotique de ce complexe. cFLIP peut former un hétérodimère avec la pro-caspase-8, prévenir son homodimérisation et inhiber l'activation de la caspase-8 (51). L'hétérodimère cFLIP-pro-caspase-8 présente une activité enzymatique différente de celle de la caspase-8 active sous forme d'homodimère et clive seulement un sous-ensemble de ses substrats (102). Lorsque le complexe I est déstabilisé par la déubiquitynilation de RIP1 par *cylindromatosis* (CYLD), l'inhibition des cIAP ou la diminution des quantités de cFLIP, un complexe secondaire cytoplasmique est formé autour de RIP1 (92). Dans ce cas, le complexe initial se désengage de la membrane plasmique après dissociation de TNFR1. Le Complexe IIa (ripososome) se forme par le recrutement de (i) FADD via les DD de TRADD et de RIP1 laissés vacants et de (ii) pro-caspases-8 ou -10 entraînant l'activation des caspases initiatrices comme décrit précédemment (97). La caspase-8 activée, en clivant RIP1, RIP3 ou CYLD inhibe le signal nécroptotique et la cellule s'engage dans l'apoptose. Lorsque la caspase-8 est inhibée ou absente, il y a alors formation du complexe IIb (nécrosome) comprenant RIP1, RIP3 et la protéine *mixed lineage kinase domain-like* (MLKL) qui engagera la cellule dans la voie nécroptotique (103) (Figure 6).

Toutes ces voies apoptotiques convergent vers l'activation des caspases effectrices -3, -6 et -7 par les caspases-8 et -10 activées. De plus, la forme tronquée t-BID, qui est générée par clivage protéolytique de BID par la caspase-8, peut engager la voie mitochondriale pour amplifier la réponse apoptotique. Dans ce cas, t-BID est rapidement transloquée du cytosol vers la membrane mitochondriale où elle se lie à des protéines pro-apoptotique telles que BAX et BAK aboutissant à la libération de cytochrome c (104, 105). Cette boucle d'amplification est requise pour le

déclenchement efficace de la phase d'exécution de l'apoptose pour les cellules de type II comme les hépatocytes, les cellules β du pancréas et plusieurs cellules néoplasiques, mais en revanche, elle ne l'est pas pour les cellules de type I comme les thymocytes pour lesquels l'activation directe par clivage protéolytique des caspases effectrices par les caspases initiatrices suffisent (106, 107) (Figure 5).

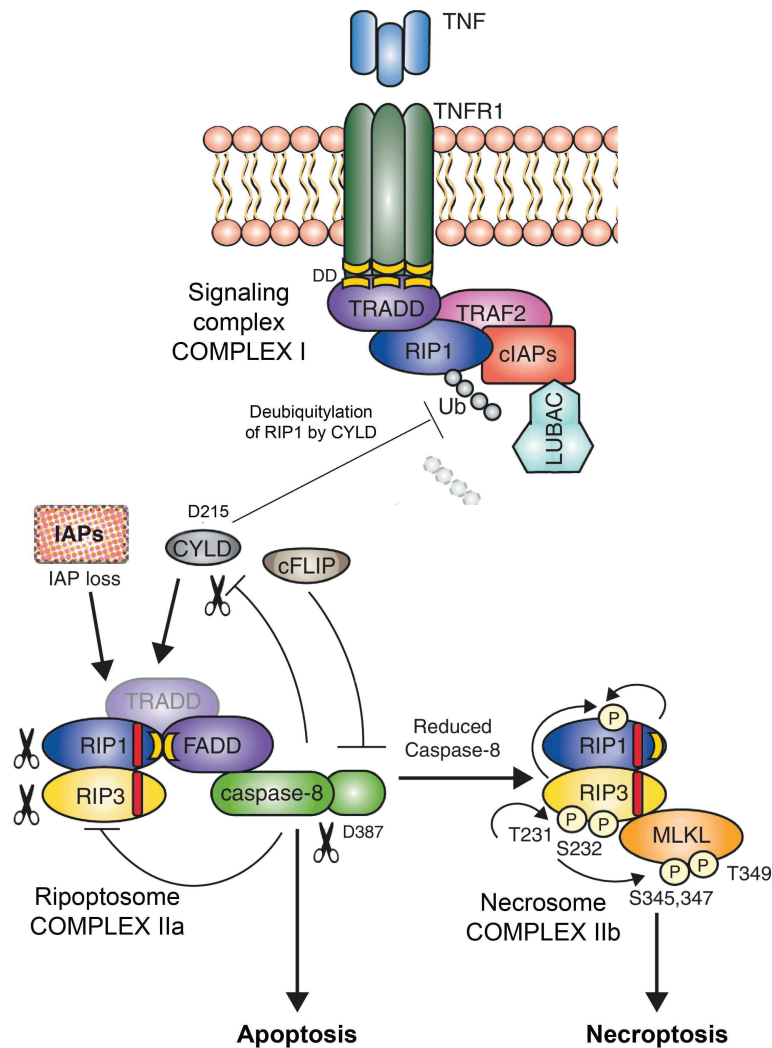


Figure 6 : Activation de l'apoptose/nécroptose par TNFR1
(adaptée de (103))

2.1.4. Voie du PIDDosome

Du fait de la présence du domaine CARD dans la structure de la pro-caspase-2, celle-ci était perçue initialement comme une caspase initiatrice. Cependant, aucune caspase n'est apparue comme étant un substrat de la caspase-2 active à la différence de BID dont le clivage en t-BID initie la voie intrinsèque (108). Un complexe d'activation de la pro-caspase-2, similaire à celui de la pro-caspase-9 (apoptosome) ou de la pro-caspase-8 ou -10 (DISC), a été décrit bien que les mécanismes d'activation et d'action de la caspase-2 restent à élucider (95). Ce complexe nommé PIDDosome est

formé en réponse à des dommages à l'ADN *via* la phosphorylation d'*ataxia telangiectasia mutated* (ATM) par l'association entre les pro-caspases-2, les molécules adaptatrices RIP-associated ICH-1 interleukine-1 β converting enzyme (ICE)/cell-death determining (CED)-3 homologue 1 protein with a DD (RAIDD) et *p53-inducible protein with a DD* (PIDD) qui contribuent à la stabilité de cette plateforme soluble (109, 110). La formation du PIDDosome met en jeu des interactions homotypiques entre les DD de RAIDD et PIDD et les domaines CARD de RAIDD et de la pro-caspase-2. Ce complexe observé en cristallographie comporte cinq PIDD et sept RAIDD permettant le recrutement et la probable activation de sept molécules de pro-caspases-2 (111).

2.1.5. Régulation de l'activation des caspases

La cascade de protéolyse des protéines effectrices étant irréversible, la régulation de l'activation des caspases est une stratégie majeure pour prévenir la perte de contrôle du processus apoptotique. Un mécanisme sélectif de contrôle implique les inhibiteurs endogènes de caspases nommés IAP. Ces inhibiteurs et leurs propriétés anti-apoptotiques ont été initialement découverts chez les virus comme les baculovirus, iridovirus ou entomopoxvirus qui se servent de ces molécules pour prévenir la mort des cellules infectées et promouvoir leur multiplication (112-114). Les IAP sont définis par la présence de une à trois copies d'un motif peptidique d'environ 70 acides aminés nommé *baculoviral IAP repeat* (BIR) localisé à l'extrémité N-terminale de la protéine (115) et nécessaire à la liaison et à l'inhibition des caspases *via* la fixation à un motif térapeptidique conservé appelé *IAP binding motif* (IBM) (116). Des homologues des IAP ont été identifiés chez les levures, le nématode et les mammifères, partageant des caractéristiques structurelles communes. Le génome humain code huit membres de la famille des IAP impliqués dans les réponses du système immunitaire inné, la prolifération et la migration cellulaire et les voies de mort cellulaire (117, 118). Parmi les cIAP humains, *X-linked IAP* (XIAP) et cIAP1/2 partagent plusieurs propriétés incluant la capacité de lier les caspases actives et les antagonistes des IAP *via* leurs domaines BIR, la capacité d'auto-ubiquitination, d'ubiquitination et de neddylation des caspases *via* leur domaine en doigt de zinc *really interesting new gene* (RING) qui présente une activité E3-ubiquitine ligase. De plus, le domaine RING permet l'homo- ou l'hétéro-dimérisation des IAP ce qui régule leur stabilité et éventuellement leur activité (pour revue (119)). L'activité principale de cIAP1/2 implique vraisemblablement leur capacité à réguler la voie de signalisation des réponses immunitaires innées activée par NF- κ B (pour revue (117)). Bien que XIAP présente aussi des activités de signalisation de tumor growth factor (TGF)- β / bone morphogenetic protein (BMP) et NF- κ B, elle est surtout considérée comme la plus puissante des régulatrices de l'apoptose de la famille des IAP, puisqu'elle est capable d'inhiber directement l'activité des caspases-3 et -7 en les ciblant par son activité E3-ubiquitine ligase pour une dégradation *via* le protéasome (119) (Figure 3 ; Figure 5).

L'inhibition d'activation des caspases peut mettre en jeu des protéines "leurres" qui présentent des homologues de séquences avec les prodomaines des pro-caspases leur permettant d'entrer en compétition pour les mêmes adaptateurs au sein des plates-formes d'activation. Ainsi, cFLIP, une pseudo-forme de la caspase-8 composée de deux DED et d'un domaine catalytique non-fonctionnel, empêche l'association de la pro-caspase-8 avec la molécule adaptatrice FADD engagée dans la plateforme d'activation DISC, et empêche de fait l'activation des voies d'exécution de l'apoptose (51) (Figure 5).

2.2. Formation de cellules apoptotiques

2.2.1. Aspects morphologiques de l'apoptose

L'apoptose se définit par une morphologie cellulaire présentant des altérations telles que la réduction du cytoplasme, une condensation de la chromatine en premier lieu au niveau de l'enveloppe nucléaire (marginalisation) puis s'étendant à la totalité du noyau (pyknosis) et aboutissant à sa fragmentation (karyorrhexis), peu ou pas d'altérations des autres organites et une convulsion des membranes nucléaires et cytoplasmiques (bourgeonnement ou "*blebbing*") aboutissant à la formation de corps apoptotiques qui conservent initialement leur intégrité membranaire et qui contiennent des fragments de noyau, des mitochondries et divers constituants du cytoplasme. En absence de prise en charge par des phagocytes, les corps apoptotiques perdent leur intégrité membranaire rendant compte d'une apoptose dite tardive ou nécrose secondaire (2, 120). Initialement décrits en 1972 par Kerr et collaborateurs, ces critères morphologiques pour définir l'apoptose sont toujours d'actualité (Figure 7), comme l'a réaffirmé le NCCD (5).

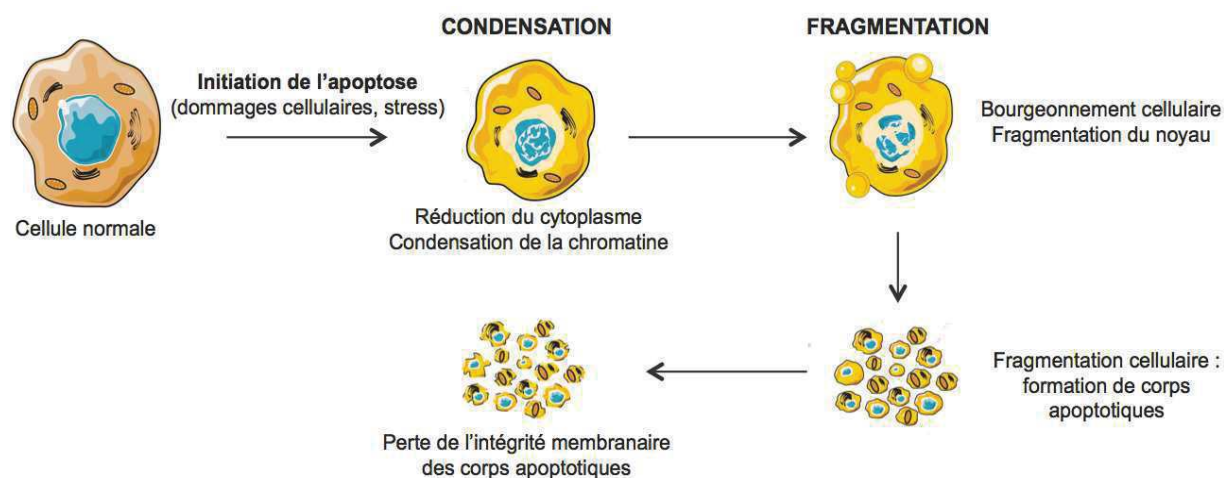


Figure 7 : Représentation schématique des modifications morphologiques induites au cours de l'apoptose

Compte tenu de l'amélioration des techniques, il est désormais recommandé par le NCCD de s'appuyer sur des caractéristiques biochimiques pour affiner cette définition purement morphologique de l'apoptose, mais aussi des autres types de mort cellulaire régulée (5). L'étude de ces différentes modifications morphologiques, élargie à celle des modifications biochimiques qu'elles impliquent, est donc essentielle pour une meilleure compréhension de l'apoptose qui conduit au démantèlement ordonné et séquentiel de la cellule.

2.2.2. Manifestations biochimiques de l'apoptose

La phase d'exécution de l'apoptose engendre la fragmentation de l'ADN, la dégradation de protéines nucléaires et du cytosquelette, la réticulation des protéines, la formation de corps apoptotiques qui expriment/présentent des ligands reconnus par les cellules phagocytaires (pour revue (48)).

La fragmentation de l'ADN est généralement assurée par l'endonucléase *DNA fragmentation factor/caspase activated-DNase* (DFF40/CAD) qui clive l'ADN génomique entre les nucléosomes (121, 122). L'activation de cette endonucléase se produit suite à la libération de son inhibiteur DFF45/*inhibitor of CAD* (DFF45/ICAD) clivé par la caspase-3 (123). Cette caspase est aussi responsable du clivage de *Mammalian Sterile-20-like-kinase 1* (MST1) dont la forme tronquée est transloquée dans le noyau où elle phosphoryle l'histone 2B, entraînant la condensation de la chromatine (124). La fragmentation nucléaire implique le clivage par les caspases de protéines de l'enveloppe nucléaire comme les lamines et des mailles d'actine entourant le noyau qui entraîne conjointement l'effondrement de la cage nucléaire et aboutit à la fragmentation du noyau (125). La protéolyse de la région C-terminale de la kinase sérine/thréonine *Rat sarcoma (Ras) homolog (Rho)-associated, coiled-coil containing protein kinase* (ROCK), un effecteur de la petite GTPase Rho, est associée à la fragmentation nucléaire ainsi qu'à l'apparition de bourgeonnements membranaires (126, 127). Cette forme tronquée de ROCK induit la phosphorylation de la myosine qui entraîne la contraction des faisceaux d'actine encore intacts afin de créer les bourgeonnements membranaires dans les régions où le cytosquelette est affaibli (128). Ainsi, le démantèlement de l'actine et des protéines associées comme les spectrines, l' α -actinine, la gelsoline et la filamine est synchronisé et contribue aux modifications de la morphologie cellulaire au cours de l'apoptose (129). De même, les microtubules sont démantelés après clivage des tubulines et des protéines associées telles que Tau, les dynéines et la protéine p150^{Glued}, les protéines structurales des filaments intermédiaires (la vimentine dans les cellules d'origine mésenchymateuse et les kératines dans les cellules d'origine épithéliale), *growth-arrest-specific* (Gas)2 et la plectine (130-134). Le clivage des protéines intervenant dans le phénomène d'adhérence comme p130 et la tensine et dans les interactions intercellulaires comme

les β et γ -caténines, les cadhérines et les protéines associées aux desmosomes entraîne la perte de liaison des cellules à la MEC et entre cellules (135, 136).

Par ailleurs, l'exposition de phosphatidylsérines (PS) sur le feuillet externe de la membrane plasmique constitue généralement un événement précoce de l'apoptose (137, 138) bien qu'elle ne soit pas observée dans tous les contextes (139). Dans les cellules vivantes, la PS est presque exclusivement localisée dans le feuillet interne de la membrane plasmique, localisation qui est due en partie à l'activité d'une translocase ATP-dépendante qui bascule les aminophospholipides PS et phosphatidyléthanolamine (PE) du feuillet externe au feuillet interne spécifiquement (139-141). Lors de l'apoptose, la translocation de PS au feuillet externe pourrait impliquer l'activation de scramblases, responsables du basculement au hasard et bidirectionnel des phospholipides de la bicouche lipidique membranaire appelé "*flip-flop*", et l'inactivation de l'activité des translocases ATP-dépendantes (142). De plus, l'*ATP-binding-cassette transporter* (ABC) A1 pourrait être aussi impliqué dans la translocation de PS du feuillet interne au feuillet externe (143, 144), bien que le contraire ait été évoqué plus récemment (145).

Les cellules apoptotiques sécrètent des cytokines immunosuppressives comme l'interleukine (IL)-10 et le TGF- β qui participent à la création d'un microenvironnement immunosuppresseur en inhibant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α ou IL-1 β) par les phagocytes professionnels et en neutralisant les facteurs pro-inflammatoires comme les chimiokines CCL3 et 5 par fixation à leurs récepteurs (146-149).

Des efforts considérables ont été accomplis ces dernières années pour élucider les mécanismes moléculaires qui régissent l'apoptose et identifier les protéines clés de ce processus. La reconnaissance et l'élimination des corps apoptotiques ont reçu moins d'attention mais sont actuellement très étudiées.

2.3. Devenir et élimination des cellules apoptotiques

2.3.1. Généralités

Avec plus de 10^9 cellules qui meurent par jour dans un organisme pluricellulaire comme le mammifère, la clairance des cellules apoptotiques, également appelée efferocytose (terme provenant du préfixe latin *effero-* qui signifie "emmener à la tombe ou pour enterrer" (150)), paraît extrêmement efficace compte tenu de la rareté de leur détection histologique dans un tissu sain (151). Après les phases d'initiation et d'exécution, la clairance des cellules apoptotiques par les phagocytes constitue l'ultime étape de l'apoptose *in vivo*. L'élimination par phagocytose des cellules

apoptotiques est une des raisons principales pour laquelle l'apoptose est considérée comme immunologiquement silencieuse (152, 153). En effet, la libération du contenu intracellulaire des cellules apoptotiques comme les protéases et autres médiateurs pro-inflammatoires est prévenue par la conservation de l'intégrité membranaire en premier lieu mais surtout par leur internalisation par des phagocytes résidants. Outre la sécrétion de leurs propres molécules anti-inflammatoires, les cellules apoptotiques exercent aussi leur action sur la régulation de la réponse inflammatoire *via* les macrophages. Ainsi, la fixation de cellules apoptotiques sur les macrophages entraîne la libération de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) au détriment de la production de cytokines pro-inflammatoires, et ce, indépendamment de leur internalisation ultérieure (154-156).

L'élimination des cellules apoptotiques est exécutée par des cellules professionnelles, dont le principal modèle est le macrophage (157, 158), mais aussi par des cellules non-professionnelles présentes à proximité de la cellule apoptotique comme les cellules épithéliales (159), endothéliales (160) et les fibroblastes (161, 162). Les données actuelles suggèrent que les étapes impliquées dans la clairance phagocytaire des cellules apoptotiques sont relativement similaires entre les phagocytes professionnels et non-professionnels, bien que les cinétiques d'internalisation observées diffèrent grandement et que les phagocytes professionnels présentent une capacité de phagocytose plus élevée (162). Au même titre que pour les cinétiques, les molécules et les voies de signalisation impliquées dans l'élimination des cellules apoptotiques peuvent certainement aussi être différentes (163). Toutefois, quel que soit le phagocyte mis en jeu, l'internalisation de cellules apoptotiques semble faire suite à une étape de détection, puis de reconnaissance *via* des liaisons spécifiques impliquant *a minima* des couples récepteurs-ligands (151, 157, 158). Suite à la transduction de signaux, le phagocyte engage alors l'activation du processus d'internalisation qui doit ainsi permettre la dégradation de la cible apoptotique *via* l'action du phagolysosome (151, 158) (Figure 8).

Dans la suite du manuscrit nous allons détailler les mécanismes de l'efferocytose, en décrivant tout particulièrement les processus régulés de la reconnaissance, de l'internalisation et de la dégradation de la cellule apoptotique par les macrophages, phagocytes professionnels qui constituent le principal modèle d'étude de la phagocytose (157, 158, 164). En effet, il est intéressant de noter que l'étude de la capture des cellules apoptotiques par les phagocytes non-professionnelles fait l'objet d'une recherche plus disparate (162, 163).

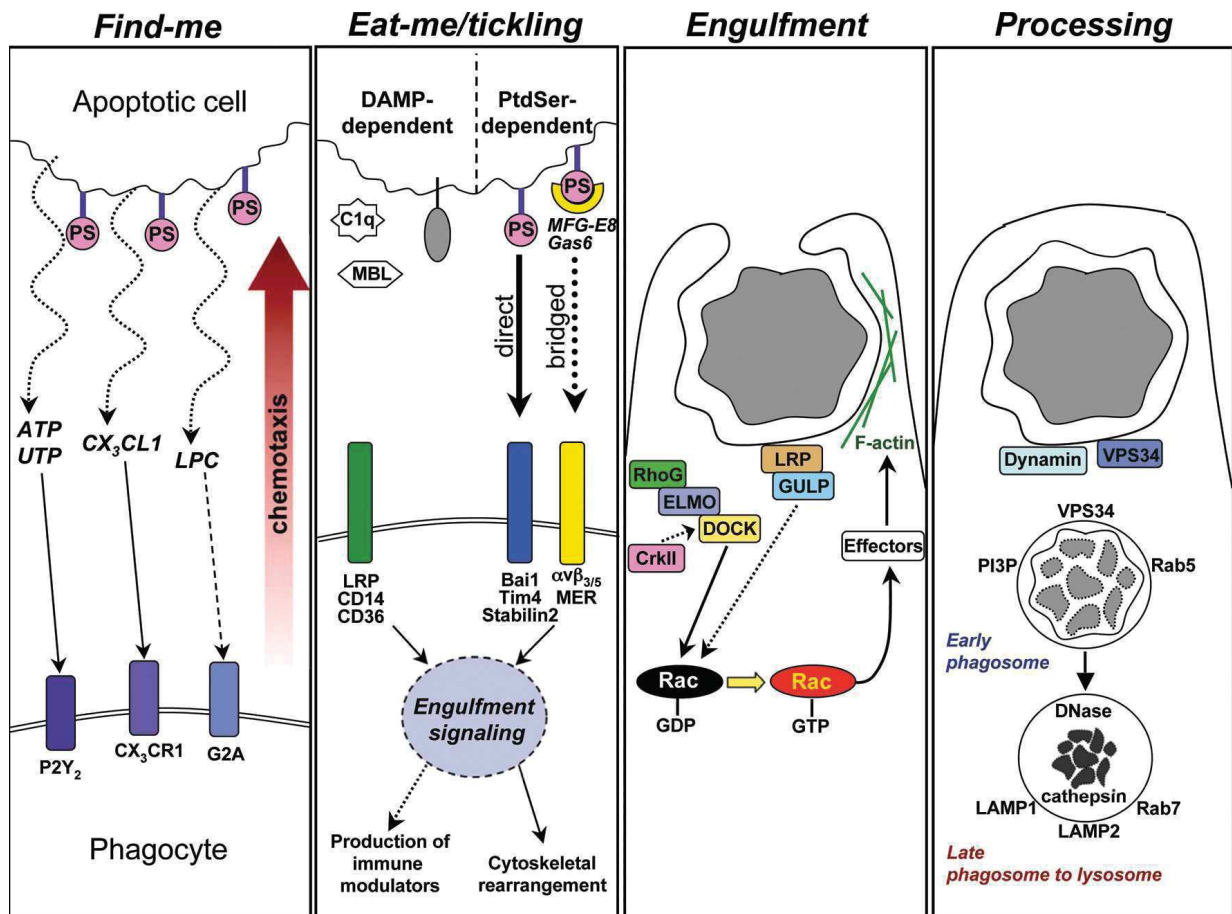


Figure 8 : Les principales étapes de la clairance des cellules apoptotiques par les phagocytes et les événements cellulaires de signalisation qui les régulent (d'après (151))

2.3.2. Modifications de surface

La détection et la reconnaissance d'une cellule apoptotique sont décrites généralement en plusieurs phases au cours desquelles la cellule apoptotique (i) signale sa présence en sécrétant des signaux "find-me" et "keep-out", (ii) réduit l'expression de signaux "don't eat-me" nécessaire à sa discrimination précise vis-à-vis des cellules viables par les phagocytes, puis (iii) expose à sa surface des signaux "eat-me" qui va lui permettre d'être reconnue par les phagocytes (165-167). L'ensemble de ces motifs moléculaires désignés comme des marqueurs répétés et exposés à la surface des cellules apoptotiques ou sécrétés sont regroupés sous la dénomination "Apoptotic cell-associated molecular pattern" (ACAMP) par homologie avec les motifs associés à la reconnaissance des pathogènes, "Pathogen-associated molecular pattern" (PAMP) (168, 169). Les ACAMP sont constitués de molécules qui peuvent être des sucres, des lipides, des protéines ou encore des acides nucléiques. Aussi, l'exposition simultanée de tous ces marqueurs n'est pas strictement nécessaire pour permettre l'élimination efficace des cellules apoptotiques. Le nombre de signaux de reconnaissance, de co-facteurs et de récepteurs impliqués dans le processus d'efferocytose est très important et semble variable d'un type de phagocyte à un autre (165, 170). Ces observations laissent à réfléchir

sur la redondance des systèmes de reconnaissance, et sur leur interaction potentiellement additive et/ou synergique pour engager l'efferocytose et soulignent la complexité du réseau moléculaire mis en place. Suite à la reconnaissance, les étapes d'ingestion et de dégradation de la cellule apoptotique font partie intégrante du processus d'efferocytose.

2.3.2.1. Les signaux "*find-me*" et "*keep-out*"

Les cellules apoptotiques sécrètent des molécules attractives qui contribuent à la migration des cellules phagocytaires professionnelles vers la cellule mourante par chimiotactisme. Ces signaux, appelés signaux "*find-me*", comprennent des entités moléculaires de différents types. Ainsi, des nucléotides, tels que l'ATP ou l'uridine 5'-triphosphate (UTP), ont été décrits pour déclencher le recrutement des monocytes et des macrophages par l'intermédiaire du récepteur purinergique P2Y2 (171). Des protéines libérées, incluant le dimère de la protéine ribosomique S19 (dRPS19) liée de façon covalente (172), la protéine *endothelial monocyte activating polypeptide II* (EMAP-II) (173), la CX3CL1/fractalkine (FKN) (174) et l'ectodomaine du récepteur de IL-6 (IL-6R) (175) contribuent aussi à l'attraction des phagocytes, et impliquent leurs récepteurs apparentés CD88, CXCR3, CX3CR1 et CD130 respectivement. Des phospholipides, comme la lysophosphatidylcholine (LPC) et la sphingosine-1-phosphate (S1P), complètent le spectre moléculaire des signaux "*find-me*" libérés par les cellules apoptotiques et ont été rapportés pour stimuler le chimiotactisme des monocytes et des macrophages par l'intermédiaire des récepteurs couplés à la protéine G G2A et de la famille des récepteurs de S1P (S1PR1-5) respectivement (176-178). Enfin, les microvésicules libérées par les cellules apoptotiques et exposant *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-3 à leur surface participent aussi au recrutement de phagocytes (179, 180). Le rôle attribué à ces signaux est d'établir un gradient chimiotactique permettant aux macrophages, aux neutrophiles et/ou aux lymphocytes de se diriger vers la cellule apoptotique (181, 182).

Parmi les médiateurs libérés au cours de l'apoptose, la lactoferrine (LTF) joue un rôle singulier. Son expression *de novo* et sa libération par les cellules apoptotiques ont été décrites, mais contrairement aux signaux "*find-me*", LTF exerce une fonction de répulsion des neutrophiles et des éosinophiles, ou de signal "*keep-out*", les empêchant spécifiquement d'envahir la zone où se situent les cellules apoptotiques (182, 183). L'ensemble de ces facteurs sont libérés et/ou sécrétés alors que la membrane plasmique demeure toujours intacte, caractéristique initiale de l'apoptose qui la discrimine fondamentalement de la nécrose.

2.3.2.2. Les signaux "*don't eat-me*"

Les cellules vivantes présentent à leur surface des signaux "*don't eat-me*" par lesquelles elles empêchent activement leur propre reconnaissance et leur capture par les phagocytes professionnels

comme les macrophages (184) (Figure 9). Ainsi, CD31 et CD47 qui sont des protéines transmembranaires de la superfamille des immunoglobulines (Ig) universellement exprimées dans les tissus et cellules des mammifères, sont les premières à avoir été classées parmi les signaux "*don't eat-me*". CD31 est un marqueur de cellule saine impliqué dans des interactions homotypiques avec les phagocytes professionnels induisant un signal de détachement qui contribue à leur répulsion. Au cours de l'apoptose, CD31 est désactivé selon un mécanisme non élucidé (185). CD47, un autre marqueur exprimé par les cellules viables, peut interagir avec le récepteur *Src homology 2 domain-bearing protein tyrosine phosphatase substrate-1* (SHPS-1), également nommé *signal-regulatory protein α* (SIRP α), exprimé à la surface des macrophages pour initier un signal inhibiteur prévenant leur phagocytose (186). Tandis que certaines études suggèrent que l'apoptose entraînerait la diminution du niveau de CD47 exprimé à la surface des cellules apoptotiques (187), d'autres prônent une altération de leur distribution (188, 189). En effet, tandis que les molécules de CD47 sont regroupées dans des radeaux ou "*raft*" lipidiques pour les cellules saines, leur localisation est diffuse à la surface des cellules apoptotiques suite au désassemblage des "*raft*" lipidiques (189). Dans tous les cas, les altérations qui concernent les molécules CD31 ou CD47 entraînent un dysfonctionnement du signal "*don't eat-me*" entraînant l'élimination des cellules apoptotiques. De plus, la sialylation des glycoprotéines de la membrane plasmique des cellules constitue un autre marqueur de viabilité qui protège les cellules d'une phagocytose inappropriée (190).

2.3.2.3. Les signaux "*eat-me*"

Les cellules apoptotiques présentent à leur surface des signaux "*eat-me*" permettant aux phagocytes de les identifier et de les éliminer spécifiquement (184) (Figure 9). Ces signaux peuvent avoir un rôle aussi bien dans la reconnaissance et la fixation des cellules apoptotiques par les phagocytes que dans la transduction de signaux intracellulaires nécessaires pour engager le remodelage du cytosquelette et l'internalisation des cellules apoptotiques. Ils se composent principalement de motifs qui sont exposés à la surface des cellules apoptotiques comme la PS, la calréticuline (CRT), l'annexine I, des nucléotides et incluent des changements dans l'oxydation ou la glycosylation de protéines de surface et dans la modification de charges électriques à la surface.

La PS est l'un des signaux "*eat-me*" le plus étudié et le mieux connu dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques. Son exposition à la surface externe des cellules se produit très tôt au cours de l'apoptose et est quasiment universellement nécessaire pour la reconnaissance des cellules apoptotiques et leur phagocytose ultérieure (170, 191-194). Un seuil d'expression de la PS à la surface de cellules apoptotiques a été évalué à environ 8 fois le taux d'expression des cellules viables témoins afin de fournir la spécificité de reconnaissance permettant aux phagocytes de les éliminer (195).

En 2005, Gardai et collaborateurs ont mis en évidence une redistribution et une augmentation majeure de la CRT à la surface des cellules apoptotiques, une protéine pouvant s'associer avec les molécules de PS (188). Toutefois, compte tenu de l'absence de domaine transmembranaire et d'ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) dans la composition de la CRT, les mécanismes d'export et de rétention à la membrane restent à élucider. L'étude de l'exposition de la CRT a aussi soulevé la question de son immunogénicité lors de la mort cellulaire (196). En marge de sa fonction "eat-me", la CRT était initialement connue pour être associée en trans avec le récepteur *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP)/CD91 exprimé par les phagocytes et exercer la fonction de co-récepteur, bien que la conséquence d'une telle interaction ne soit pas clairement identifiée (197, 198).

L'annexine 1 est une protéine cytosolique, qui peut être libérée au travers de la membrane plasmique lors de l'apoptose pour se fixer sur la PS externalisée à la surface des cellules apoptotiques et favoriser l'efferoctose (199). Aussi, les protéines ABCA1 et ICAM-3, les sites *oxidized low-density lipoprotein-like moiety* (oxLDL) ainsi que les sites liant les protéines du complément, les collectines et la thrombospondine (TSP) sont reconnus comme des signaux "eat-me" (166, 200-204). L'exposition de matériel nucléaire comme des nucléosomes, de l'ADN et des histones à la surface des cellules apoptotiques semble être impliquée dans leur reconnaissance par les phagocytes (205, 206). Toutefois les mécanismes d'exposition en surface de molécules d'ADN restent encore à élucider (207).

La modification du profil de glycosylation est un changement essentiel de la surface des cellules apoptotiques et constitue un signal "eat-me" (208, 209). La surface de toutes les cellules humaines est caractérisée par une couche dense de carbohydrates, chargés négativement, dénommée glycocalyx. Lors de l'apoptose, le clivage des acides sialiques des glycoprotéines de surface génère des motifs carbohydrates caractéristiques, comme des sucres acétylés ou neutres, et permet la diminution de la charge négative pouvant influencer les interactions avec les phagocytes et donc favoriser l'efferoctose (209-212).

2.3.1. Molécules de reconnaissance

Les cellules phagocytaires expriment un large panel de récepteurs à leur surface pour identifier les différents signaux "eat-me" exposés à la surface des cellules apoptotiques (Figure 9). Plusieurs récepteurs peuvent reconnaître les mêmes ligands et plusieurs ligands peuvent être reconnus par le même récepteur. Ces récepteurs sont dénommés *Pattern Recognition Receptor* (PRR). Si certains d'entre eux reconnaissent directement leurs ligands, d'autres récepteurs en revanche nécessitent l'implication de molécules solubles adaptatrices aussi appelées molécules pontantes (158).

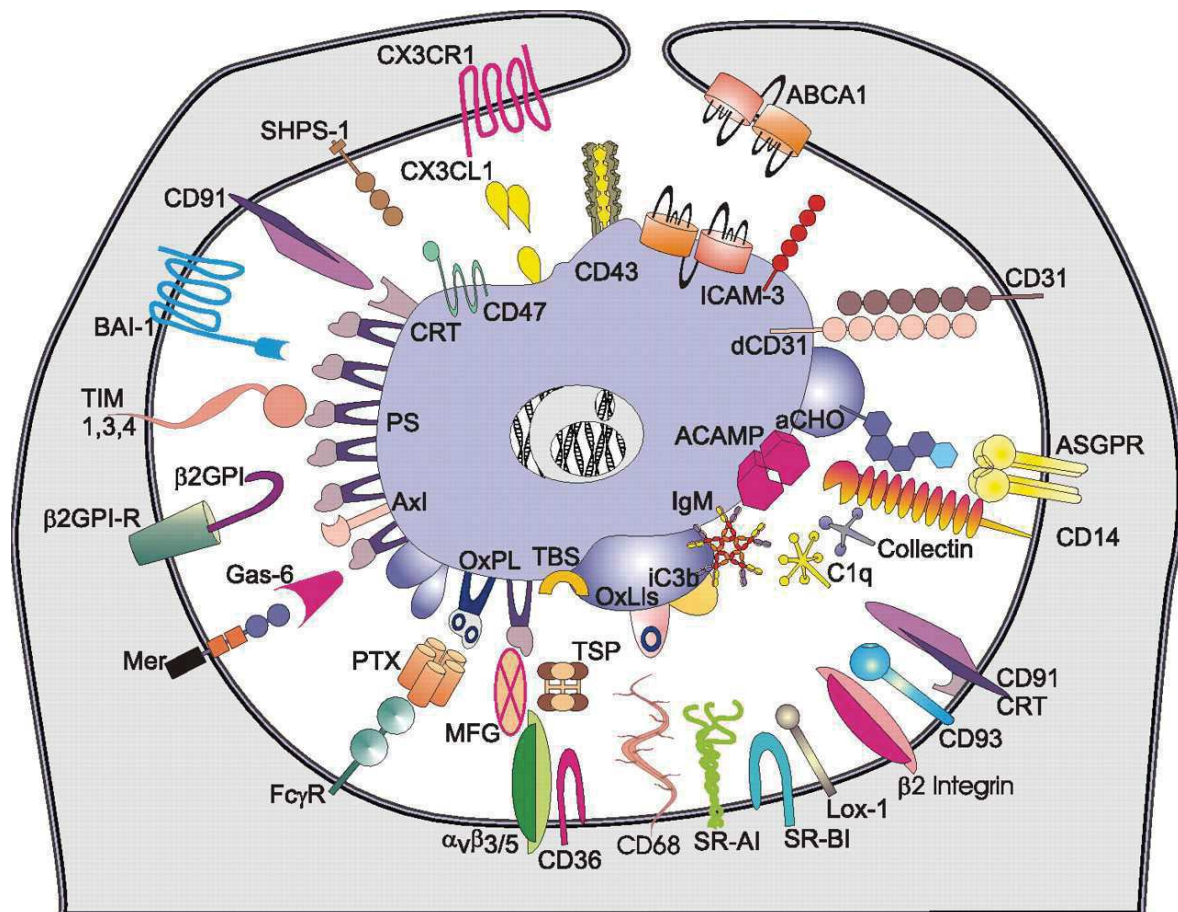


Figure 9 : Molécules impliquées dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques par un "superphagocyte"

Il est important de noter que l'ensemble des molécules illustrées ici ne sont pas présentes sur la même cellule. Il s'agit d'une représentation schématique permettant d'illustrer la complexité et la grande variété des molécules mises en jeu entre un "superphagocyte" et une cellule apoptotique. β 2GPI-R, β 2-Glycoprotein 1 receptor ; aCHO, altered carbohydrate ; ASGPR, asialoglycoprotein receptor ; BAI-1, brain-specific angiogenesis inhibitor 1 ; dCD31, disabled CD31; MFG, milk-fat globule EGF-8; OxLIs, oxidized low-density lipoprotein-like moiety ; OxPL, oxidized phospholipid ; TBS, TSP-binding site ; Tim : T cell Ig and mucin-domain-containing molecule (d'après (167)).

2.3.1.1. Les récepteurs membranaires à reconnaissance directe

Les sites oxLDL sont reconnus par des récepteurs de la famille des "scavenger" (charognard) tels que les *scavenger receptors* (SR) de classe A et B, type 1 (213, 214), le *lectin-like oxLDL receptor-1* (LOX-1) (215), le CD68 (SR-D) (216) et le CD36 (SR-B) (217, 218).

Ces récepteurs membranaires incluent aussi les lectines, comme *asialoglycoprotein receptor* (ASGPR), qui lie les sucres altérés sur les cellules apoptotiques (219, 220), et CD14 qui lie ICAM-3 (180, 200). Les protéines ABCA1 exposées aussi bien à la surface des cellules apoptotiques qu'à celle des phagocytes peuvent interagir entre elles (interaction trans) et participer à l'efferocytose, mais les mécanismes impliqués restent à élucider (143, 221).

La CRT semble directement lier et stimuler le récepteur LRP/CD91 exposé à la surface de cellules phagocytaires comme le macrophage. La fonction "eat-me" de la CRT pourrait être renforcée par son

association avec la protéine du complément C1q, exprimée majoritairement par les cellules dendritiques et les macrophages, C1q étant aussi un ligand du récepteur LRP/CD91 (188, 222). Compte tenu de l'association probable de la PS avec C1q mais aussi avec la CRT, il est vraisemblable que ces interactions tripartites puissent influencer l'efferocytose (222, 223).

2.3.1.2. Les molécules solubles adaptatrices et leurs récepteurs associés

Beaucoup de protéines solubles de l'immunité innée sont impliquées dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques. Le facteur H (206) et la properdine (224) ont récemment été considérés comme des ligands des cellules apoptotiques. Les protéines de la famille des pentraxines (PTX), incluant *C-reactive protein* (CRP) (225), *serum amyloid P* (SAP) (226) et PTX3 (227), jouent un rôle dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques principalement tardives en reconnaissant des antigènes nucléaires. La CRP est aussi impliquée dans la reconnaissance des motifs oxydés type oxLDL (228, 229). CRP, SAP et PTX3 sont toutes reconnues par des récepteurs de la famille des récepteurs Fc γ (Fc γ R pour *Fc γ receptors*) (225, 230-232).

Les collagènes de défense incluant les protéines du surfactant (SP pour *surfactant protein*)-A et -D (233-236), la *mannose binding lectin* (MBL) (234) et les ficolines (237, 238) sont aussi mis en jeu dans la reconnaissance de structures nucléaires à la surface des cellules apoptotiques par l'intermédiaire de leurs régions globulaires. La MBL reconnaît aussi des sucres modifiés présents à la surface des cellules apoptotiques (239). Les récepteurs du complément ou le récepteur LRP/CD91 en association avec la CRT à la surface des phagocytes sont connus pour reconnaître leur portion collagène (197, 240-242).

C1q est une protéine du système du complément composée d'une queue collagène et de six têtes globulaires. Elle intervient dans la reconnaissance des cellules apoptotiques (243). Plusieurs récepteurs liant les queues collagène ont ainsi été identifiés tels que CR1 (244), LRP/CD91 en association avec la CRT (197) et LRP/CD91 seul (245). Les cibles reconnues par C1q semblent extrêmement diverses puisque les têtes globulaires de C1q interagissent notamment avec la PS (223), l'ADN exposé à la surface des cellules apoptotiques (246), des motifs oxLDL (247, 248), mais également avec la CRT (249). La protéine du complément C3b, fixée sur les sites des cellules apoptotiques liant les facteurs du complément, implique une reconnaissance par les récepteurs *complement receptors* (CR)3 et 4, également nommés intégrines $\alpha_m\beta_2$ et $\alpha_x\beta_2$ respectivement, exprimés à la surface des phagocytes (250, 251).

La TSP-1 participe aussi à l'efferocytose en interagissant avec les sites des cellules apoptotiques liant la TSP (TBS pour *TSP-binding site*) et le récepteur CD36 exprimé à la surface des phagocytes et associé avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ (252).

2.3.1.3. Les molécules de reconnaissance de la phosphatidylsérine

La PS est reconnue par un ensemble de molécules solubles adaptatrices et par des récepteurs de reconnaissance directe, ajoutant de la complexité au processus de reconnaissance de la cellule apoptotique.

- Les molécules adaptatrices solubles de reconnaissance de la PS

Les protéines sécrétées *Milk Fat Globuline EGF factor 8* (MFG-E8), Gas6 et la protéine S lient la PS exposée à la surface des cellules apoptotiques et promeuvent l'internalisation *via* leurs récepteurs apparentés. La MFG-E8 (également appelée lactadhérine et initialement découverte comme une glycoprotéine sécrétée par les glandes mammaires) est exprimée et sécrétée par les phagocytes professionnels. Elle s'associe avec les intégrines $\alpha_v\beta_{3/5}$ des phagocytes *via* son domaine RGD (Arg-Gly-Asp) et lie la PS des cellules apoptotiques *via* leurs deux domaines *factor-VIII-homologous* (C1 et C2) dans leur région C-terminale (181, 253). Gas6 et la protéine S servent de molécules adaptatrices entre les PS des cellules apoptotiques et la famille de récepteurs Tyro-3-Axl-Mer (TAM) des phagocytes (181, 254).

Aussi, la β_2 -*Glycoprotein I* (β_2 GPI) (également nommée apolipoprotéine H), C1q et l'annexine I lient la PS et contribuent de ce fait à la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages (199, 223, 255, 256). Des récepteurs ont été identifiés pour C1q et β_2 GPI, tandis qu'aucun n'est encore connu pour l'annexine I. β_2 GPI interagit avec les membres de la famille LRP sur les phagocytes (257). TSP-1, reconnue par le complexe CD36- $\alpha_v\beta_3$, a été identifiée comme un ligand de la PS, même si pour l'heure son rôle est peu connu (191, 258-260).

- Les molécules membranaires de reconnaissance directe de la PS

Récemment, des récepteurs qui reconnaissent directement les molécules de PS à la surface des cellules apoptotiques et entraînent l'efférocytose ont été découverts, chacun avec un profil d'expression unique. *Brain-specific angiogenesis inhibitor 1* (BAI1) est une protéine à sept domaines transmembranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G de type II, qui lie la PS *via* ses domaines répétés TSP-1 (261). BAI1 est exprimé dans les macrophages et dans les tissus immunologiques comme la moelle osseuse et le foie, mais aussi à un plus fort taux dans les cellules gliales du cerveau et les neurones (262). *T-cell Ig and mucin-domain-containing molecule* (TIM)-4 et TIM-1 sont des petites protéines transmembranaires qui lient les PS avec une forte affinité *via* leur domaine IgV (263-265). Parmi les autres membres de la famille des TIM, TIM-3 lie aussi la PS et stimule l'internalisation de cellules apoptotiques, mais avec une moindre efficacité que TIM-1 et TIM-4 (266). TIM-4 est fortement exprimée par les phagocytes professionnels, incluant les macrophages et les cellules dendritiques hépatiques, des ganglions lymphatiques, du thymus et des amygdales

(267), tandis que TIM-3 est exprimée par les cellules dendritiques CD8+ du foie (266). Ces macrophages et cellules dendritiques sont responsables de l'élimination des cellules apoptotiques et de la présentation d'antigènes associés aux cellules mortes (268). TIM-1, aussi appelée *kidney injury molecule 1* (KIM-1), est principalement exprimée par les cellules épithéliales du rein (269) et par les cellules *T helper* (Th)2 (270). Dans le rein, TIM-1 est vraisemblablement responsable de l'élimination des débris cellulaires apoptotiques ou nécrotiques générés au cours de lésions ischémiques (271), tandis que son rôle dans les cellules Th2 n'est pas élucidé. A contrario des autres récepteurs des PS identifiés, TIM-4, -1 et -3 ne semblent pas assurer la transduction de signaux en faveur de l'internalisation et fonctionnent vraisemblablement comme des récepteurs de fixation (272). La stabiline-2, aussi nommée *hyaluronic acid receptor for endocytosis* (HARE), est une protéine membranaire de type I qui reconnaît spécifiquement la PS à la surface des cellules apoptotiques *via* son domaine *epidermal growth factor-like* (273, 274) et fonctionne aussi comme récepteur à l'héparine et aux acides hyaluroniques pour réguler la viscosité du sang (275). La stabiline-2 est principalement exprimée par les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques, des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse (276) ; ce récepteur est aussi exprimé par les macrophages humains dérivés de monocytes (273). Les plus récents des récepteurs des PS décrits à ce jour sont *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) et CD300f. RAGE peut se présenter sous une forme associée à la membrane ou une forme soluble, chacune de ces formes étant capable de lier la PS (277). La forme soluble de RAGE semble agir comme un récepteur leurre, en bloquant la reconnaissance et l'internalisation médiées par la forme associée à la membrane et les autres récepteurs de PS. RAGE est principalement exprimé dans le tissu pulmonaire, incluant les macrophages alvéolaires. Toutefois son expression est induite par l'inflammation, suggérant ainsi un rôle de RAGE dans la résolution du processus inflammatoire (278). CD300f est une glycoprotéine comportant neuf domaines transmembranaires qui reconnaît la PS exposée à la surface des cellules apoptotiques et engage la phagocytose *via* le recrutement de p85 α de la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (279, 280). CD300f est exprimé par une grande variété de cellules immunitaires incluant les éosinophiles, les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B (281). Outre son rôle dans l'efferocytose, CD300f semble capable d'inhiber l'activation des cellules immunitaires par le recrutement de phosphatases *via* son domaine intracellulaire *intrinsic immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM). Son activation induit une inhibition du facteur de transcription NF- κ B et donc une diminution de la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (282).

Concernant la découverte du "*phosphatidylserine receptor*" (PSR), initialement identifié comme un récepteur spécifique de la PS (283), elle a depuis été récusée (284, 285). En effet, PSR s'avère être

un facteur de remodelage de la chromatine appelé *Jumonji domain-containing 6* dont la localisation est nucléaire (286). Compte tenu de sa localisation, PSR n'est pas responsable de la phagocytose des cellules apoptotiques médiée par la reconnaissance directe de la PS. Les mécanismes de signalisation activés par ce "récepteur" injustement nommé ne sont pas encore totalement élucidés (pour revue (158)).

Au total, une grande variété de récepteurs et de molécules sont impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques (Figure 9). La raison de la multiplicité des récepteurs est due, d'une part aux différents types de tissus et de cellules spécifiques engagés dans l'internalisation, et d'autre part à leur fonction. Ainsi, Peter Henson a proposé un modèle de "*tethering and tickling*" (Figure 10) qui illustre un processus séquentiel avec des récepteurs impliqués à différents temps de la reconnaissance. Certains récepteurs servent uniquement à la reconnaissance des cellules apoptotiques et participent ainsi à l'établissement d'interactions cellule-cellule pouvant évoluer vers une forte adhérence intercellulaire (*e.g.* CD14, CD68 ou CD36) (170, 287), tandis que d'autres transduisent en plus la signalisation impliquée dans le réarrangement du cytosquelette nécessaire à l'internalisation (*e.g.* LRP/CD91 ou BAI1) (188, 197, 261, 288, 289). Le rôle de ces récepteurs dans la mise en œuvre des interactions cellule-cellule et/ou de la signalisation nécessaires à la capture des cibles apoptotiques reste à élucider pour bon nombre d'entre eux (158).

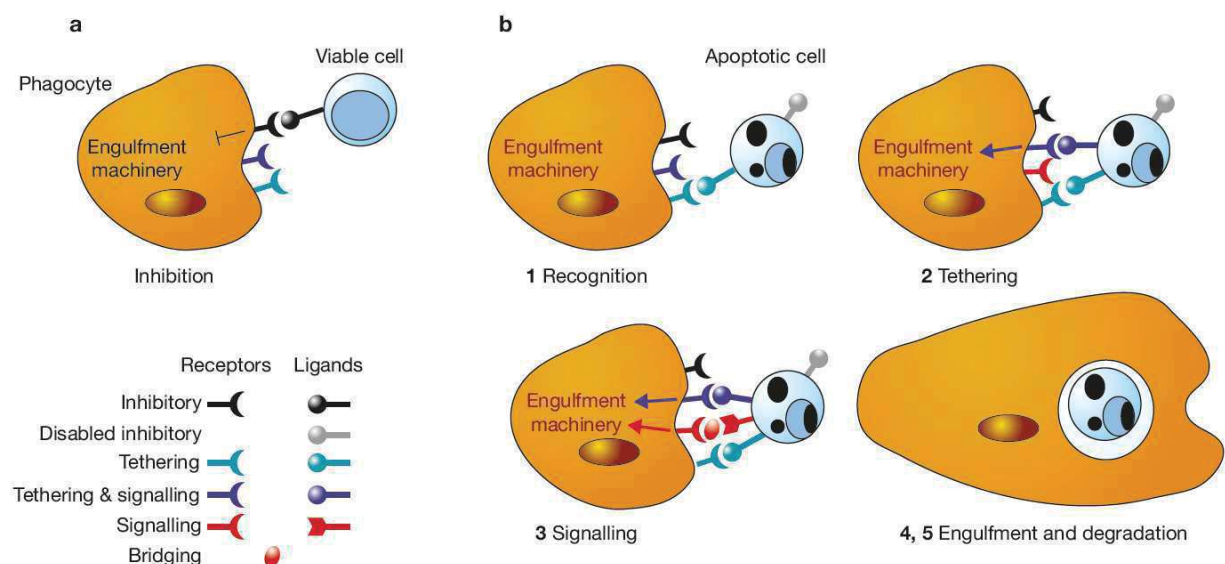


Figure 10 : Interactions moléculaires séquentielles activant la phagocytose des cellules apoptotiques : modèle de "*tethering and tickling*"

(a) Les cellules viables peuvent activer des signaux inhibiteurs ("*don't eat-me*") qui suppriment l'adhérence intercellulaire avec le phagocyte et les mécanismes d'internalisation. (b) Les cellules apoptotiques échouent à activer de tels mécanismes inhibiteurs et exposent en contre-partie des signaux "*eat-me*". Les interactions cellule-cellule (1) sont initiées et peuvent évoluer vers une forte adhérence intercellulaire (2) aboutissant à la formation d'une synapse phagocyttaire (3), une succession d'interactions moléculaires essentielles requises pour activer le phagocyte et qui, au delà d'un seuil, conduisent à l'internalisation de la cellule apoptotique et à sa dégradation ultérieure (4, 5) (d'après (290)).

2.3.2. Mécanismes de clairance des cellules en apoptose tardive et nécrotiques

Au cours de l'apoptose tardive - associée à l'échec ou à la prolongation du processus de clairance - ou de la nécrose des cellules, l'altération de leur membrane plasmique entraîne la libération de leur contenu, et les facteurs les plus abondants de cet efflux agissent comme des signaux de danger endogène ou *damage-associated molecular patterns* (DAMP) qui "informent" le système immunitaire de l'altération des tissus (291, 292). La majorité des signaux de danger exerce des effets pléiotropes sur le système immunitaire incluant le recrutement de phagocytes. En tant que tels, *high mobility group box 1 protein* (HMGB-1) et sa molécule apparentée *hepatoma-derived growth factor* (HDGF), les peroxirédoxines (Prx), les membres de la famille des protéines S100 et les *heat shock proteins* (HSPs) peuvent stimuler l'attraction des monocytes/macrophages en liant les récepteurs *Toll-like receptor* (TLR) 2 et 4, RAGE et de la famille des SR (293-296). De plus, l'ATP et l'acide urique, qui forment des cristaux d'urate de sodium (MSU pour *monosodium urate*) dans l'espace extracellulaire, exercent une fonction d'attraction des phagocytes. Cependant le récepteur de ces cristaux MSU n'a pas été identifié (297). Dans le cas des cellules en apoptose tardive, le processus de recrutement des phagocytes est peu caractérisé. Aussi, il est proposé que le répertoire de médiateurs solubles libérés par les cellules apoptotiques tardives puisse être la somme des facteurs libérés par les cellules apoptotiques précoces et nécrotiques (pour revue (158)). Cependant, il doit être pris en compte que les molécules attractives dRPS19, EMAP-II, FKN, IL-6R, LPC et S1P sont libérées relativement rapidement au cours de l'apoptose, et compte tenu de la présence ubiquitaire des enzymes de dégradation dans l'espace extracellulaire, la stabilité de ces composés est vraisemblablement assez limitée. Par conséquent, on peut se demander si ces médiateurs sont toujours présents et actifs après la transition dans cette étape tardive de l'apoptose. Les candidats les plus probables pour les signaux "*find-me*" libérés par les cellules en apoptose tardive sont les cristaux MSU, la quantité d'acide urique libéré - en raison de la dégradation de la chromatine - étant encore plus élevée que dans le cas de la nécrose primaire, et HMGB-1 associé aux nucléosomes (297, 298). De plus, il a récemment été montré qu'au cours de l'apoptose tardive l'annexine A1 est transloqué au feuillet externe de la membrane plasmique et subit un clivage protéolytique, permettant alors la libération d'un peptide qui stimule la chimiotaxie des monocytes/macrophages (299, 300).

Dans le cas d'une apoptose tardive ou d'une nécrose, les mécanismes de reconnaissance et d'internalisation des cellules mourantes ne sont pas aussi bien compris que dans le cas de l'apoptose précoce (pour revue (120)). Cependant il semble que l'opsonisation par des facteurs du complément représente plutôt une caractéristique de l'apoptose tardive comparée à l'apoptose précoce, à l'instar de l'externalisation de l'annexine A1 (299, 301). De plus, bien que différente sur le plan du mécanisme de la translocation des PS au cours de l'apoptose, des ruptures de la membrane

plasmique entraînent aussi une exposition des PS par les cellules nécrotiques primaires. Par conséquent un rôle dans la reconnaissance et l'internalisation de la cellule nécrotique a été attribué à la PS (302, 303). Les interactions entre les phagocytes et les cellules en apoptose tardive ou en nécrose impliquent un large panel de récepteurs, opsonines et ligands associés à la cellule, comme indiqué dans la Figure 11 (120).

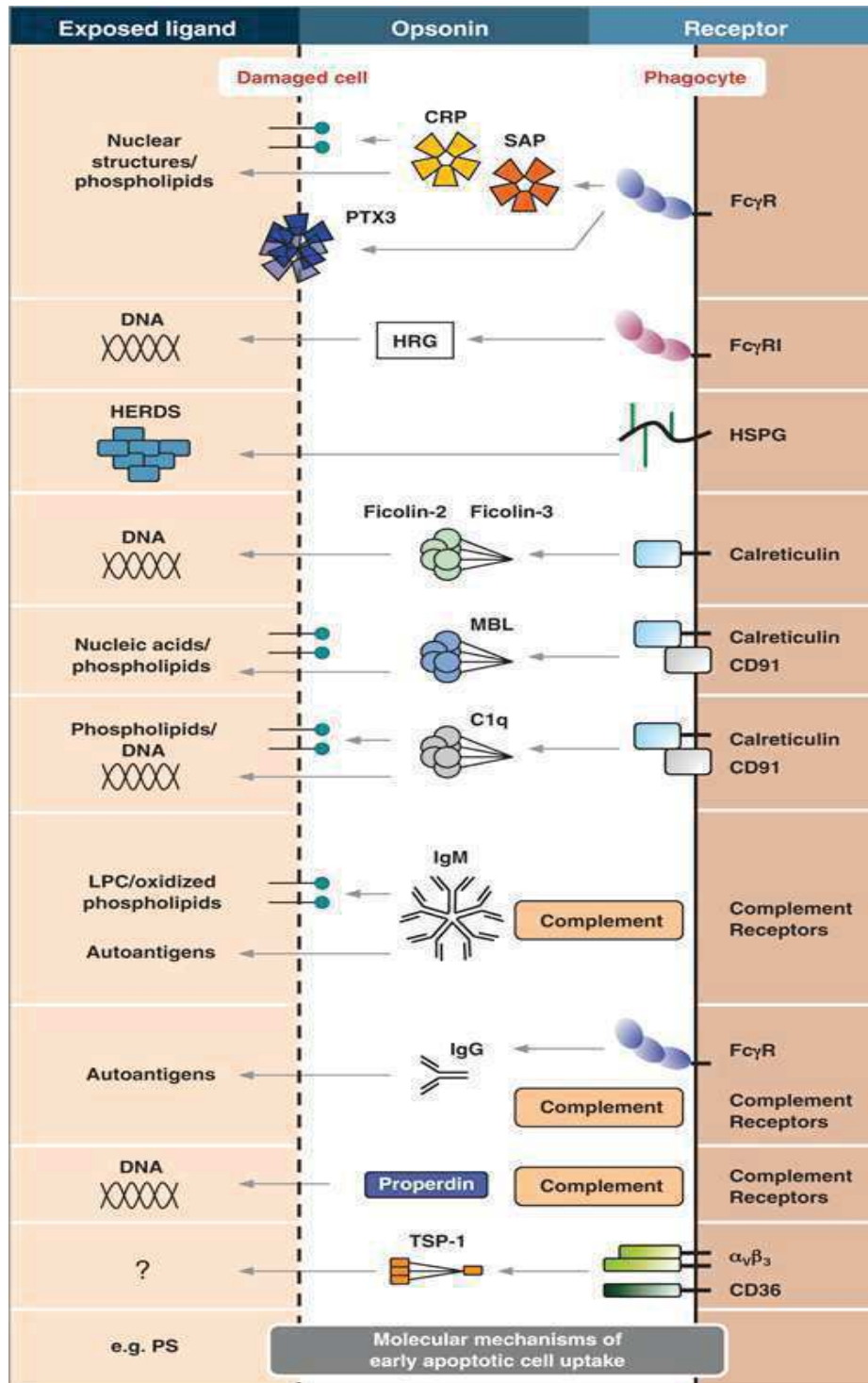


Figure 11 : Mécanismes moléculaires de la clairance des cellules apoptotiques tardives et nécrotiques
 DNA, deoxyribonucleic acid ; HERDS, heterogeneous ectopic ribonucleoprotein-derived structures ;
 HRG, histidine-rich glycoprotein ; HSPG, heparan sulphate proteoglycans (d'après (120)).

En parallèle de ces mécanismes spécifiques, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'internalisation des cellules apoptotiques précoces agissent vraisemblablement de concert pour favoriser l'élimination des cellules en apoptose tardive et nécrotique. Il est important de noter que CRP, SAP, PTX3, HRG, *Ficolin-2* et -3, MBL et C1q peuvent aussi potentiellement moduler l'activation du complément, en plus des IgM, IgG et la *properdin*, pour faciliter la clairance des cellules apoptotiques tardives et nécrotiques (120).

Récemment, le premier signal "*eat-me*" spécifique des cellules apoptotiques tardives et nécrotiques a été identifié. Il s'agit des filaments d'actine exposés à la surface de la membrane plasmique, qui sont reconnus par la lectine de type C Clec9A (304-306).

2.3.3. Signalisations intracellulaires inhérentes au remodelage du cytosquelette

Une fois que la cellule apoptotique est arrimée, le phagocyte est soumis à des réarrangements du cytosquelette nécessaires pour l'internalisation de la cible. Les connaissances actuelles relatives aux voies de signalisation, qui participent à l'internalisation des cellules apoptotiques arrimées aux phagocytes, émergent en grande partie d'études génétiques menées chez *C. elegans* (307, 308). Les mécanismes qui régissent le remodelage du cytosquelette nécessaire à l'internalisation impliquent différentes protéines, phylogénétiquement très conservées, dont les fonctions sont répertoriées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Protéines de signalisation impliquées dans l'internalisation des cellules apoptotiques
(d'après (158))

<i>C. elegans</i>	Mammifère	Fonctions
CED-1	LRP/CD91	Récepteurs à la surface des phagocytes qui reconnaissent des ligands à la surface des cellules apoptotiques
CED-2	CrkII	Protéines adaptatrices qui lient le complexe Dock180/ELMO (CED-5/CED-12) à la membrane ; leur rôle précis dans la signalisation de l'internalisation de la cellule apoptotique n'est pas totalement élucidé
CED-5	Dock180	Facteurs d'échange de nucléotide guanine (GEF) qui chargent Rac de GTP
CED-6	GULP	Protéines adaptatrices qui lient LRP/CD91 (CED-1) ; leur rôle précis dans la signalisation de l'internalisation de la cellule apoptotique n'est pas totalement élucidé
CED-7	ABCA1	Transporteurs ABC impliqués dans la signalisation de l'efflux du cholestérol initiée lors de l'internalisation de la cellule apoptotique ; leur rôle précis est inconnu mais leur expression est indispensable aussi bien sur le phagocyte que sur la cellule apoptotique
CED-10	Rac	GTPase de la famille Rho régulant l'activation de Arp2/3, la polymérisation de l'actine et le remodelage du cytosquelette via le complexe Scar/WAVE
CED-12	ELMO	Protéines adaptatrices contenant un domaine PH ; lient Dock180 (CED-5) et favorisent leur activité de facteur d'échange

2.3.3.1. Les GTPases de la famille Rho

Les GTPases de la famille Rho, sont des molécules cruciales dans le déclenchement des voies de signalisation. La forme active des GTPases (associée à GTP) résulte de l'action de facteurs d'échange de nucléotide guanine (GEF pour *guanine-nucleotide-exchange factors*) qui catalysent l'échange du GDP en GTP. À l'inverse, les protéines appelées *GTPase-activating proteins* (GAP) stimulent l'hydrolyse du GTP en GDP, transformant ainsi les Rho GTPase en forme inactive. Les Rho GTPases sont des petites protéines G de signalisation (environ 21 kDa) membres de la superfamille de Ras, dont les fonctions sont associées à la régulation des mouvements cellulaires (309). Les membres de cette famille incluent Rho *family member A* (RhoA), *Cell division cycle* (CDC)42 et *Ras-related C3 botulinum toxin substrate* (Rac). La perte ou la suppression de RhoA est associée à l'augmentation de l'internalisation des cellules apoptotiques, et à l'inverse, sa suractivation à son inhibition (310, 311). La régulation de la clairance par RhoA est exécutée *via* la kinase ROCK. La forme active (associée à GTP) de RhoA, augmente l'activité kinase de ROCK, qui par suite provoque la phosphorylation des chaînes légères de myosine (MLC pour *myosin light chain*) et promeut la contractilité cellulaire (312). La contractilité inhibe vraisemblablement les extensions des pseudopodes et la formation de la synapse phagocytaire, nécessaire dans les étapes précoces de l'internalisation. Par ailleurs, l'activation de RhoA dans les étapes ultérieures de l'internalisation, pourrait favoriser la dégradation des cellules apoptotiques en régulant l'acidification du phagosome (157). La fonction de CDC42 dans l'efferocytose est peu connue bien que quelques études suggèrent qu'il pourrait avoir un rôle dans la promotion de ce processus (313, 314). Rac associé à GTP présente une activité en faveur de l'internalisation qui est phylogénétiquement très conservée. En effet, l'activation de Rac au site de reconnaissance de la cellule apoptotique déclenche l'activation du complexe de nucléation de l'actine *actin-related proteins* (Arp)2/3, *via* le facteur de promotion de la nucléation Scar/*Wiskott-Aldrich syndrome protein* (WASP)-*family verprolin homologous protein* (WAVE), entraînant la nucléation et la polymérisation de l'actine. Ceci permet le remodelage du cytosquelette d'actine et aboutit à la formation d'expansions membranaires qui entourent la cible apoptotique et se referment en formant le phagosome (315). Actuellement, deux voies principales de signalisation gouvernant la clairance des cellules apoptotiques ont été décrites ; elles convergent toutes deux vers l'activation de Rac en aval (307) (Figure 12).

2.3.3.2. L'activation de Rac *via* la voie CrkII-Dock180-ELMO

Une combinaison d'études dans les modèles de *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* et de mammifères a contribué à l'identification d'une voie de signalisation pour l'activation de Rac qui met en jeu les protéines *Dedicator of cytokinesis 1* (Dock180), *Engulfment and cell motility* (ELMO) et *v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog* (CrkII) (316-319). L'ensemble de ces protéines est

impliqué dans plusieurs processus de remaniement du cytosquelette incluant la migration cellulaire, la croissance des neurites, la fusion des cellules musculaires et la phagocytose des cellules apoptotiques (181). Dock180 a été identifié comme un GEF de Rac caractérisé par une absence des domaines traditionnels *Dbl-homology* (DH) et *pleckstrin homology* (PH) nécessaires aux GEF pour réaliser l'échange de GTP (320). Bien que Dock180 contienne un domaine *Docker* (DHR2) qui fonctionne comme un domaine DH, Dock180 monomérique existe sous une conformation "fermée", empêchant ainsi l'interaction de son domaine DHR2 avec Rac (321). ELMO est une protéine adaptatrice qui lie directement Dock180, créant ainsi un GEF bipartite de Rac (320). Il existe au moins trois mécanismes possibles par lesquels ELMO augmente l'activité de Dock180 : (i) la liaison de ELMO sur la région C-terminale de Dock180 lève l'inhibition stérique qui bloque l'interaction du domaine DHR2 de Dock180 avec Rac (322), (ii) le domaine PH de ELMO stabilise alors le lien entre Rac et Dock180 (322), (iii) ELMO lie Dock180 à la membrane proche de la synapse phagocytaire *via* la liaison directe à la région C-terminale du récepteur transmembranaire BAI1 (261).

Notre compréhension de la régulation de Dock180-ELMO est en pleine évolution. Les études initiales suggèrent que CrkII, une protéine adaptatrice, recrute Dock180 et ELMO à la membrane cellulaire des phagocytes suite à l'engagement de ligands sur les récepteurs à leur surface membranaire (323). D'autres études montrent que CrkII peut être co-immunoprécipité avec le complexe Dock180-ELMO et semble de ce fait requis pour engager une efferocytose efficace ; cependant, une interaction directe entre CrkII et Dock180 n'est pas indispensable (324). Par ailleurs, il a été montré que ELMO possède aussi un signal de localisation membranaire et que l'activation de RhoG par le GEF TRIO déclenche le recrutement à la membrane du complexe Dock180-ELMO *via* la liaison au domaine *Armadillo repeats* d'ELMO à la forme active de RhoG (325). Enfin, Dock180 contient aussi un signal de localisation membranaire, ce qui soulève des interrogations quant à la nécessité de CrkII dans ce processus (326). Par conséquent, le rôle exact de CrkII dans cette voie est actuellement inconnu.

De nombreux récepteurs de phagocytes, présentés précédemment, ont été identifiés pour déclencher la voie CrkII-Dock180-ELMO impliquée dans la capture des cellules apoptotiques. Ceux-ci comprennent les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$, qui reconnaissent la PS *via* des molécules solubles adaptatrices (327-329) et le récepteur Mer de la famille des TAM qui reconnaît la PS *via* Gas6 (330). De même, le récepteur des PS BAI1 lie aussi ELMO *via* son domaine cytoplasmique et active cette voie de signalisation, contribuant ainsi à la capture des cellules apoptotiques (261) (Figure 12).

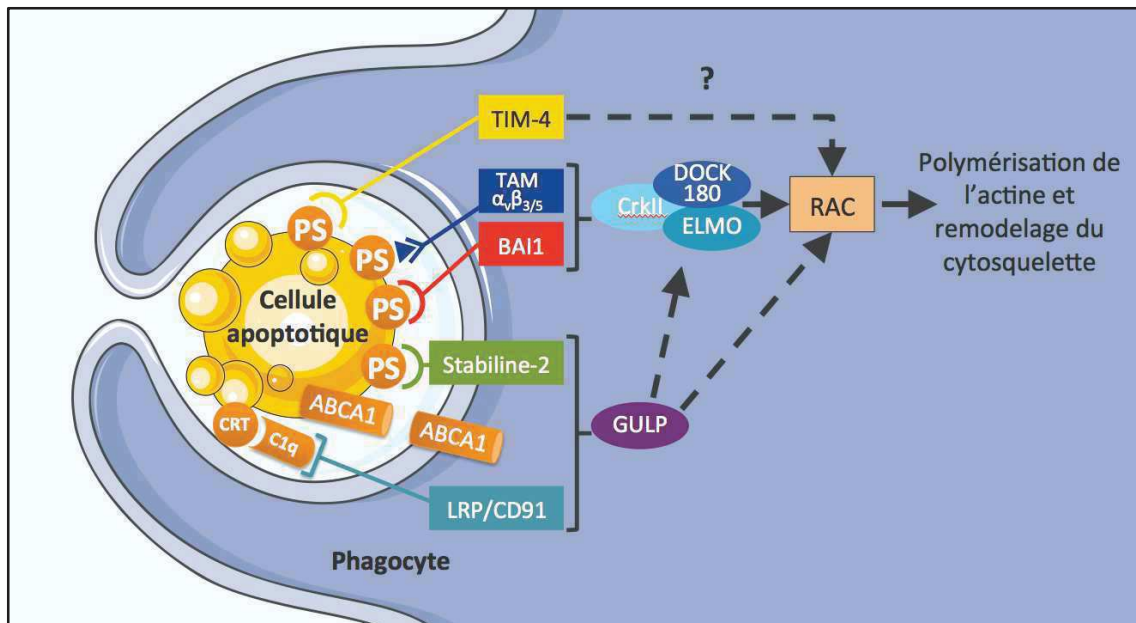


Figure 12 : Représentation schématique de la signalisation intracellulaire impliquée dans le réarrangement du cytosquelette nécessaire à l'internalisation de cellules apoptotiques (adaptée de (165, 331))

2.3.3.3. L'activation de Rac *via* la voie LRP/CD91-GULP-ABCA1

La seconde voie de signalisation pour l'élimination des cellules apoptotiques, phylogénétiquement très conservée, comprend LRP/CD91, *engulfment adaptor PTB domain containing* (GULP) et ABCA1 (332-336) (Figure 12). Bien que cette voie entraîne aussi l'activation de Rac en aval (337), les différentes étapes de transduction du signal ne sont pas clairement identifiées. LRP/CD91 est un récepteur de surface exprimé par de nombreuses cellules, incluant notamment les phagocytes qui reconnaissent les signaux "eat-me" à la surface des cellules apoptotiques. Les ligands de LRP, incluant la CRT et la TSP, sont connus ; cependant aucun ligand pour le récepteur homologue CED-1 de *C. elegans* n'a encore été identifié (338). Après la reconnaissance des cellules apoptotiques, LRP/CD91 interagit directement avec la protéine adaptatrice GULP et entraîne le remaniement du cytosquelette (335). Par ailleurs, le récepteur stabiline-2 peut aussi interagir avec GULP *via* un motif NPXY (Asn-Pro-X-Tyr). L'inhibition de GULP endogène induit une diminution significative de l'internalisation des cellules apoptotiques médiée par la stabiline-2, suggérant que ce récepteur des PS utilise cette voie pour l'efferocytose (339). Bien que la fonction de ABCA1 dans cette voie de signalisation ne soit pas clairement définie, son expression est requise à la fois sur les cellules apoptotiques et sur les phagocytes pour initier l'internalisation des cibles apoptotiques (333). Il est intéressant de noter que cette protéine a un rôle dans le transport du cholestérol et la maintenance de domaines lipidiques sur la membrane plasmique et, de fait, est impliquée dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans le phagocyte au cours de l'internalisation des cellules apoptotiques (340-342).

2.3.4. Mécanismes d'endocytose : cas de l'internalisation des cellules apoptotiques

L'endocytose est un terme générique pour décrire le phénomène actif d'internalisation d'éléments extracellulaires au sein de la cellule (343). Ces éléments pouvant être endocytés incluent des molécules, du milieu extracellulaire et des particules telles que des pathogènes et des corps apoptotiques.

De manière générale, deux sous-types majeurs d'internalisation sont connus. La pinocytose est impliquée dans l'absorption en phase fluide de petites molécules et la phagocytose est la plus efficace pour l'internalisation de larges particules ($>0,5 \mu\text{m}$). La pinocytose, qui permet l'internalisation de soluté issu du milieu extracellulaire accompagné des particules qu'il contient, est subdivisée en deux groupes : la macropinocytose et la micropinocytose. Cette dernière se compose de divers mécanismes : l'endocytose impliquant les molécules de clathrine, l'endocytose impliquant les molécules de cavéoline et plusieurs formes d'endocytose moins courantes n'impliquant ni la clathrine ni la cavéoline (343).

La macropinocytose est caractérisée par la formation d'évaginations de la membrane plasmique à la surface des cellules et implique les GTPases Rac et CDC42 et le cytosquelette d'actine (344, 345). Ces évaginations ("*ruffles*") se referment et fusionnent ensuite avec la membrane plasmique afin d'absorber du liquide extracellulaire environnant (Figure 13). Ces grandes vésicules endocytaires nouvellement formées (de diamètre généralement compris entre 0,2 et 5 μm), appelées macropinosomes, fusionnent ensuite avec les endosomes précoces, puis les tardifs et enfin avec les lysosomes afin que leur contenu soit dégradé (346). Ce processus ne dépend pas directement de la présence de particules et peut être induit lors de l'activation de voies de signalisation initiées par des facteurs de croissance tels que l'*epidermal growth factor* (EGF) ou *macrophage colony-stimulating factor* (MCSF) (344). Il existe aussi une macropinocytose constitutive, notamment chez les cellules dendritiques immatures. L'ingestion de grands volumes de milieu extracellulaire leur confère ainsi une grande efficacité dans le rôle de veille immunitaire (347). Une approche courante pour déterminer l'implication de la macropinocytose dans l'internalisation est l'utilisation d'inhibiteurs des pompes Na^+/H^+ tels que l'amiloride ou les dérivés de cette drogue, dont les effets impliquent une diminution du pH sous-membranaire et l'inhibition de l'activation de Rac et CDC42 (346, 348, 349).

L'endocytose dépendante des clathrines est caractérisée par l'ingestion de petites particules *via* la formation de vésicules recouvertes de molécules de clathrine (80-150 nm de diamètre) (343, 350). Les molécules de clathrine sont recrutées à la membrane plasmique grâce aux protéines *adaptor proteins* qui, sous forme déphosphorylée, permettent l'appariement de clathrines et de cage de structure polyédrale. La dynéine et la dynamine sont impliquées dans ce type d'endocytose tandis

que l'actine n'est pas essentielle à la mise en œuvre de ce processus dans les cellules de mammifères (351, 352). Les vésicules formées fusionnent avec les endosomes précoces. Au terme de cette fusion, une partie des vésicules peut être recyclée, l'autre partie étant adressée à l'endosome tardif afin d'être dégradée (353).

L'endocytose impliquant les cavéoles se caractérise par la formation d'invaginations membranaires, appelées cavéoles (60 à 100 nm de diamètre) (343). Les cavéoles sont constituées de molécules de cavéoline au sein de "*raft*" ou radeau lipidique enrichie en cholestérol et glycolipides. La protéine kinase C et les protéines du cytosquelette telles que l'actine et la dynamine participent à la formation de ces vacuoles (354). Contrairement aux autres formes d'endocytose, ces vacuoles fusionnent avec un compartiment nommé cavéosome à pH neutre et non avec des endosomes à pH acide. Les vésicules nouvellement formées sont ensuite adressées à l'appareil de Golgi ou au RE (355).

La phagocytose est définie comme une voie d'absorption cellulaire de particules de taille supérieure à 0,5 μm de diamètre pour laquelle divers mécanismes d'internalisation ont été décrits, tous dépendant du remodelage du cytosquelette d'actine (356). Aussi, le mode de phagocytose dépend intimement du type de récepteurs impliqués. Par exemple, la phagocytose médiée par Fc γ R implique l'interaction séquentielle des IgG recouvrant la particule avec leur récepteur, qui stimulent ensuite l'extension autour de la cible de pseudopodes à partir de la surface du phagocyte (357-359). L'expansion de ces pseudopodes membranaires est contrainte, au cours de leur progression sur la surface de la particule, par la disponibilité des ligands. Elle aboutit à l'englobement de la cible dans un phagosome ne contenant pas de soluté extracellulaire. Ces observations ont permis de définir un mécanisme de phagocytose appelé "*zipper-like*" (fermeture éclair) ou "*reaching phagocytosis*" (Figure 13) (358). Les conséquences d'une telle interaction entre les récepteurs et les ligands sont que la phagocytose est contrôlée de manière spatio-temporelle, qu'elle est limitée à la particule arrimée, que le pseudopode contribuant à l'internalisation suit le contour de la particule et que les deux surfaces membranaires sont étroitement apposées. En revanche, lors de la phagocytose initiée par les récepteurs du complément comme CR3, quelques protrusions se forment mais la particule semble plutôt pénétrer au sein des macrophages (360, 361) selon un mécanisme appelé "*sinking phagocytosis*".

L'élimination de cellules mortes est un processus complexe et aucun modèle unique ne peut rendre compte de la diversité des structures et des mécanismes qui sous-tendent la capture de ces particules. Néanmoins, indépendamment de la nature de la cellule ingérée (apoptotique ou nécrotique) et de la nature du phagocyte, de son environnement et des récepteurs engagés, un certain nombre de points de convergence ont été établis, dont le plus évident est la réorganisation

du cytosquelette d'actine qui constitue un événement indispensable à ce processus de phagocytose. En effet, suite à la reconnaissance de la cible par les récepteurs au niveau de la synapse phagocytaire, une polymérisation de l'actine est observée localement dans le phagocyte, permettant l'englobement de la cible, puis son internalisation toujours dépendante de l'actine.

Il est maintenant de plus en plus évident que l'internalisation de cellules apoptotiques implique la formation initiale d'évaginations membranaires permettant la biogenèse de phagosomes spacieux dans lesquels sont contenues les cellules apoptotiques ainsi qu'une certaine quantité de soluté issu du milieu extracellulaire environnant (150, 157, 170, 197, 362-364). Ce processus de phagocytose appelé "*triggered phagocytosis*" ou "*macropinocytotic mechanism*" est plus proche morphologiquement de la macropinocytose que de la phagocytose médiée par les IgG ou les opsonines C3b et est inhibé, comme la macropinocytose, par l'amiloride ou ses dérivés (Figure 13).

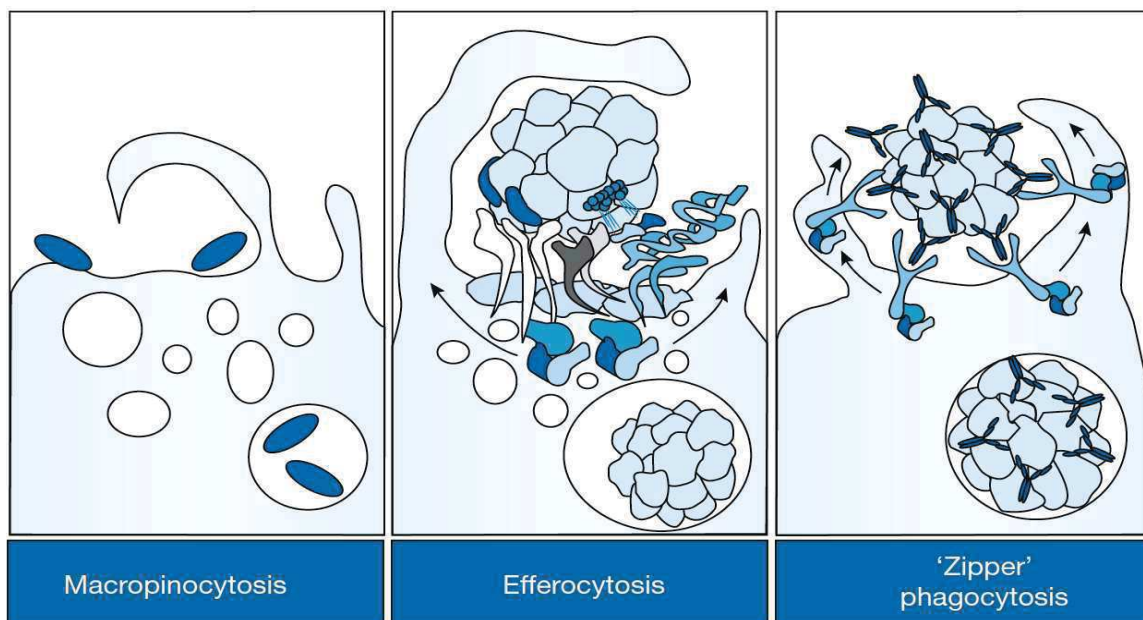


Figure 13 : L'efferocytose est décrite comme un mécanisme de phagocytose particulière selon un modèle proposé par deCathelineau et Henson

Selon certains auteurs, le mécanisme "*zipper-like*", mais aussi la macropinocytose, pourraient aussi être mis en jeu lors de l'internalisation de cellules apoptotiques par les phagocytes (pour revue (157, 365)) (d'après (150)).

Il convient de noter que certains chercheurs ont observé, grâce à la microscopie électronique à transmission (MET), ce qui semble être une apposition plus étroite de la membrane du phagosome avec la surface de la cellule apoptotique au cours de l'internalisation (366, 367). Ainsi, Krysko et collaborateurs proposent un schéma qui implique deux types de mécanismes d'internalisation mis en jeu par le macrophage selon le type de mort de la cellule cible à internaliser : un mécanisme "*zipper-like*" pour l'internalisation des cellules apoptotiques et un mécanisme "*macropinocytotic-like*" pour l'internalisation des cellules nécrotiques (365). Enfin, il a été proposé que la macropinocytose puisse aussi contribuer à la capture de cellules apoptotiques (362), et ce, de manière dépendante de

l'activation de récepteurs (197), en particulier par des mécanismes de capture dépendant des PS (170). Ainsi, la clairance des cellules apoptotiques semble impliquer différents modes physiques d'absorption qui pourraient dépendre de la nature des phagocytes, des cibles apoptotiques et/ou des différentes combinaisons d'interactions ligands/récepteurs (157, 365).

2.3.5. Maturation du phagosome et dégradation de la cellule apoptotique

Il est important de noter que bien qu'il puisse y avoir de nombreuses formes de phagocytose qui opèrent par le biais de signalisations moléculaires distinctes, les mécanismes de formation et de trafic vésiculaire en aval sont largement conservés. En effet, indépendamment des interactions entre les couples récepteurs/ligands mises en jeu, la phagocytose entraîne l'internalisation des cellules apoptotiques au sein de vacuoles délimitées par une membrane. Ces vacuoles, appelées phagosomes ou encore efferosomes, subissent rapidement une séquence de réactions de fusion et de fission qui remodelent progressivement leur membrane et modifient leur composition luminale (158, 368). Ce processus de transformation progressive est connu sous le nom de maturation du phagosome. Initialement, les phagosomes naissants fusionnent avec les endosomes précoces, donnant lieu à une structure appelée phagosome précoce. Par la suite, les phagosomes précoces fusionnent avec les endosomes tardifs puis avec les lysosomes, formant ainsi respectivement les phagosomes tardifs et les phagolysosomes. Les phagosomes en cours de maturation acquièrent rapidement les propriétés des compartiments endo-lysosomaux avec lesquels ils fusionnent. Tout en subissant cette transformation progressive, les phagosomes deviennent de plus en plus acides, acquièrent des propriétés oxydatives et sont enrichis avec des hydrolases ; l'ensemble facilitant la dégradation, le traitement et l'élimination de leur contenu (369). Les changements à la fois dans la membrane et le contenu des phagosomes sont provoqués par le trafic vésiculaire vers et depuis le phagosome, ce trafic étant coordonné par des molécules cruciales, les protéines de la famille des Rab GTPases. Comme d'autres GTPases de la famille des Rho, l'activation des Rab exige un échange nucléotidique pour passer de leur forme inactive (associée à GDP) à leur forme active (associée à GTP) et implique pour cela des GEF. Une fois activées, les protéines Rab s'associent avec différentes molécules effectrices qui contribuent à diverses fonctions, incluant le trafic, la fusion et la fission vésiculaires (pour revue (370)).

De manière intéressante, le devenir des phagosomes varie en fonction de la nature de leur contenu. Par exemple, les antigènes dérivés de cellules apoptotiques endogènes sont rapidement dégradés de manière immunologiquement silencieuse afin de prévenir le développement de l'auto-immunité (371). La phagocytose médiée par les récepteurs Fcγ est accompagnée par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, tels que le TNF-α, tandis que l'internalisation de cellules apoptotiques entraîne généralement la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires (356).

2.3.5.1. Les phagosomes précoces et tardifs

Le processus de maturation est initié par le recrutement de grosses GTPases appelées dynamines (DYN-1 chez *C. elegans*) à l'interface entre la cellule apoptotique et le phagocyte (372) (Figure 14). Les interactions des dynamines avec la protéine *vacuolar protein sorting-associated* (Vps)34, une PI3K de classe III, entraînent le recrutement à la membrane du phagosome naissant de Rab5, une petite GTPase associée à GDP (369). Rab5 peut être activé par GAPex-5 (RME6 chez *C. elegans*), un GEF composé d'un domaine C-terminal Vps9 et d'un domaine N-terminal Ras GAP, qui est délivré au site de la phagocytose de corps apoptotiques par l'intermédiaire du réseau microtubulaire (373). Sous sa forme active, la protéine Rab5 coordonne alors le trafic endocyttaire en promouvant l'activation de Vps34 qui catalyse alors la formation à la membrane de phosphatidylinositol 3-phosphate (PIP3) à partir de phosphatidylinositol (374). L'accumulation de ce phosphoinositide de signalisation favorise les étapes ultérieures de la maturation du phagosome. PIP3 à la surface du phagosome est ensuite éliminé par *myotubularin* (MTM-1) via son activité lipide phosphatase (369, 375). La coalescence des phagosomes naissants et des endosomes précoces donne un organe hybride à faible activité hydrolytique et une lumière légèrement acidifiée (pH 6.1-6.5) : le phagosome précoce (356).

La composition membranaire et luminale des phagosomes continue d'évoluer jusqu'à ce qu'ils progressent à une étape caractéristique : les phagosomes tardifs (158). Cette étape est caractérisée par l'acquisition de Rab7 associé à GTP à la membrane du phagosome et la dissociation concomitante de Rab5. Des études récentes ont démontré que la protéine Mon1a (SAND-1 chez *C. elegans*) et son partenaire de liaison Ccz1 font le lien entre l'activation de Rab5 et le recrutement de Rab7 sur le phagosome (307) ainsi que son activation consécutive (376). En effet, Mon1a/b a été identifié comme un effecteur de Rab5 qui interagit uniquement avec Rab5 activé (associé à GTP) à la membrane des phagosomes précoces. Mon1, lié à Rab5, recrute son partenaire Ccz-1 et le complexe Mon1/Ccz-1 formé induit alors le recrutement de Rab7 à la membrane du phagosome (307). Alors que le complexe Mon1/Ccz-1 ne contribue pas directement à l'échange nucléotidique de Rab7 nécessaire à son activation, Ccz-1 semble promouvoir la dissociation de la *guanine nucleotide dissociation inhibitor* (GDI) de Rab7, une étape initiatrice cruciale nécessaire à son activation (307). Le complexe *homotypic fusion and protein sorting* (HOPS) est recruté à son tour à la membrane du phagosome Rab7 positif et entraîne l'activation de Rab7 via son activité de GEF (307, 377). Par ailleurs, il a été démontré que Mon1 interagit directement avec les protéines *core* du complexe HOPS (378). À cet égard, Mon1 semble fonctionner comme un effecteur de Rab5 qui à la fois permet le recrutement de Rab7 au phagosome précoce via Ccz-1 et, par sa capacité à s'associer directement

avec le complexe HOPS doté d'une activité de facteur d'échange de nucléotide guanine, participe à l'activation de Rab7 (307, 378) (Figure 14).

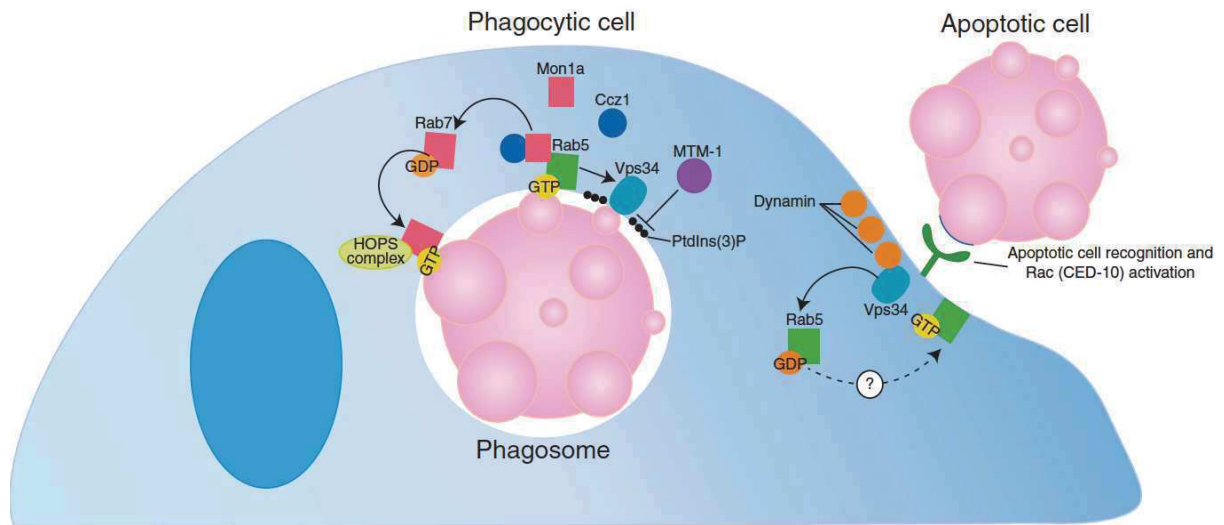


Figure 14 : Maturation du phagosome : le traitement post-intériorisation de la cellule apoptotique
(d'après (158))

Comparés aux phagosomes précoces, les phagosomes tardifs sont plus acides (pH 5,5-6,0), compte tenu de l'acquisition de pompes à protons supplémentaires (158). Le pompage des protons, participant à la génération et au maintien du pH acide de la lumière des phagosomes, est catalysé par les *vacuolar ATPases* (V-ATPases), des complexes protéiques multimériques qui transloquent les protons (H^+) (vers l'intérieur des vésicules) au travers des membranes des endosomes et phagosomes au détriment de l'ATP. Les phagosomes tardifs ont une perméabilité passive aux H^+ réduite, ce qui permet aux H^+ pompés par les V-ATPases de s'accumuler considérablement dans la lumière de ces vacuoles (379).

Les protéines Rab7 et ses effecteurs, *Oxysterol-binding protein-related protein 1* (ORPL1) et *Rab7-interacting lysosomal protein* (RILP), sont indispensables à la poursuite de la maturation du phagosome (380, 381). Ensemble, ORPL1 et RILP coordonnent les trafics vésiculaires dépendants des microtubules des compartiments Rab7 positifs par leur interaction directe avec le complexe dynéine-dynactine (381). Le mouvement centripète et la localisation périnucléaire des phagosomes sont nécessaires pour la fusion efficace avec les lysosomes et requièrent RILP, la dynéine et des microtubules intacts (382).

Bien que l'importance de Rab7 pour la maturation des phagosomes soit incontestable, son recrutement et son activation sur les phagosomes ne sont pas suffisant pour permettre la fusion phagosome/lysosome (382). Des antagonistes de PI3K qui bloquent la maturation des phagosomes ne suppriment pas le recrutement de Rab7 et son activation, ce qui indique qu'il existe des événements supplémentaires dépendants des phosphoinositides qui doivent fonctionner de concert

pour médier la maturation du phagosome. Ces événements restent à élucider (383). D'autres facteurs, initialement identifiés comme des composants structuraux des phagosomes tardifs, se sont révélés nécessaires pour la maturation. Les *lysosome-associated membrane proteins* (LAMP)-1 et -2 sont des protéines membranaires fortement glycosylées qui sont abondantes dans les endosomes tardifs, les lysosomes et les phagosomes matures. Bien qu'il ait été tacitement admis que les protéines LAMP servent principalement à préserver l'intégrité de la membrane lysosomale, des expérimentations récentes démontrent qu'elles sont essentielles au recrutement de Rab7 (384). Le phagosome tardif continue ainsi à se développer par la fusion avec les lysosomes, donnant lieu à la phase terminale du processus de maturation : le phagolysosome.

2.3.5.2. Le phagolysosome

Le phagosome mature est l'organite qui joue un rôle ultime dans la dégradation des molécules phagocytées ; il peut digérer les protéines, les lipides et les carbohydrates. L'acquisition d'un arsenal d'effecteurs hydrolytiques par le phagosome requiert la fusion avec des compartiments lysosomaux pré-formés. La fusion dépendante de Rab7 entre les phagosomes et les lysosomes engendre la genèse de vésicules aux propriétés spécifiques nécessaires à la dégradation de corps apoptotiques. La fusion des lysosomes avec les endosomes, et vraisemblablement les phagosomes, est coordonnée en partie par la formation d'un complexe nommé *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor* (SNARE), composé de *syntaxin 7* et de *vesicle-associated membrane protein 7* (VAMP7) et requiert du Ca^{2+} (356). Biochimiquement, les phagolysosomes peuvent facilement se distinguer des autres compartiments endocytiques par une absence de PIP3 à leur membrane interne, l'absence du récepteur mannose-6 phosphate, un enrichissement en hydrolases acides de la famille des cathépsines et une acidité prononcée de sa lumière atteignant un pH de 4,5-5,0 (385-387).

Le pompage intense des protons par les V-ATPases et l'acidification de la lumière du phagolysosome qui en résulte servent à des fins multiples dans le contexte de la physiologie des phagosomes. Tout d'abord, l'acidification du phagosome n'est pas seulement une conséquence de la fusion phagosome/lysosome, mais semble être nécessaire au processus de maturation. En effet, l'exposition des cellules à des bases faibles ou à des inhibiteurs de V-ATPases ne bloque pas seulement l'acidification mais perturbe le trafic endocyttaire et la biogenèse du phagolysosome (388). De plus, Les protons de la lumière phagosomale participent aussi à la genèse d'ERO par la NADPH oxydase contribuant à la dégradation du contenu du phagosome (389, 390). Enfin, l'environnement acide augmente indirectement les capacités de dégradation des phagosomes en activant les enzymes aux fonctions lytiques qu'ils contiennent (391, 392). Ces enzymes ainsi activées peuvent dégrader les protéines, les acides nucléiques et les lipides contenus dans le phagolysosome sous la forme de

motifs constitutifs de base incluant des nucléotides/nucléosides, des acides gras, des stérols, des peptides/acides aminés (393).

Étonnamment, le devenir des phagolysosomes est un processus mal apprécié, en partie parce que ce sont principalement des particules artéfactuelles indigestes, comme des billes de latex, qui ont été utilisées comme cibles dans les modèles de phagocytose. Cependant, il est évident que, lorsque les corps apoptotiques sont dégradés, les phagosomes diminuent en taille et subissent une fragmentation avant de finalement disparaître, peut-être par fusion avec d'autres compartiments endomembranaires. Cet aspect du cycle de vie du phagosome reste pratiquement inexploré (394).

2.3.6. LC3-associated phagocytosis : une étape cruciale de la maturation du phagosome

Récemment, une activité non-conventionnelle de certaines protéines apparentées à la macroautophagie (ci-après dénommée autophagie) au cours de processus macro-endocytiques tels que la phagocytose, la macropinocytose et l'entose a été mise en évidence (395-397). Cette "autophagie non-canonique" a initialement été observée au cours de la phagocytose de particules suite à l'engagement de récepteurs tels que TLR1/2, TLR2/6, TLR4, TIM-4 et FcγR (395, 398). Elle implique l'association de la protéine *microtubule-associated protein 1 light chain 3* (MAP1LC3/LC3) sous sa forme lipidée (LC3-II) à des vacuoles à membrane simple, entre autres des phagosomes contenant des cellules apoptotiques ou des pathogènes (396, 397). Dans ce contexte, la lipodation directe de LC3 sur des phagosomes a été appelée *LC3-associated phagocytosis* (LAP) (Figure 15).

La LAP et l'autophagie sont des processus distincts tant sur le plan fonctionnel que moléculaire. Si l'autophagie implique la dégradation d'éléments intracellulaires séquestrés dans une vésicule à double membrane nouvellement formée, l'autophagosome, après sa fusion avec le lysosome, la LAP conduit à la dégradation d'éléments extracellulaires internalisés dans une vésicule à membrane unique (Figure 15). Contrairement à l'autophagie, la LAP est indépendante de l'activation du complexe de pré-initiation *unc-51 like autophagy activating kinase* (ULK)1/2-200 kDa *focal adhesion kinase* (FAK)-*family interacting protein* (FIP200)-*autophagy-related protein* (Atg)13-Atg101 (396, 397, 399).

En revanche, la LAP requiert l'activité de certains composants de l'autophagie, notamment le complexe PI3K de classe 3 (C3PI3K pour *class III* PI3K) qui assure la formation de PIP3 et les systèmes de conjugaison protéine-lipide "*ubiquitin-like*" qui assurent la conjugaison de LC3 à un PE au niveau du phagosome (397, 400, 401).

Les mécanismes moléculaires qui régulent la LAP sont actuellement en cours d'investigation comme l'attestent deux études publiées en 2015. Florey et collaborateurs ont récemment démontré que la LAP, et plus généralement la lipodation endolysosomale de LC3, sont dépendantes de l'activité

des *V-ATPases*, des complexes protéiques formés de multiples sous-unités transmembranaires et cytosoliques qui assurent l'acidification de vésicules intracellulaires grâce à un transfert de protons couplé à l'hydrolyse d'ATP (402).

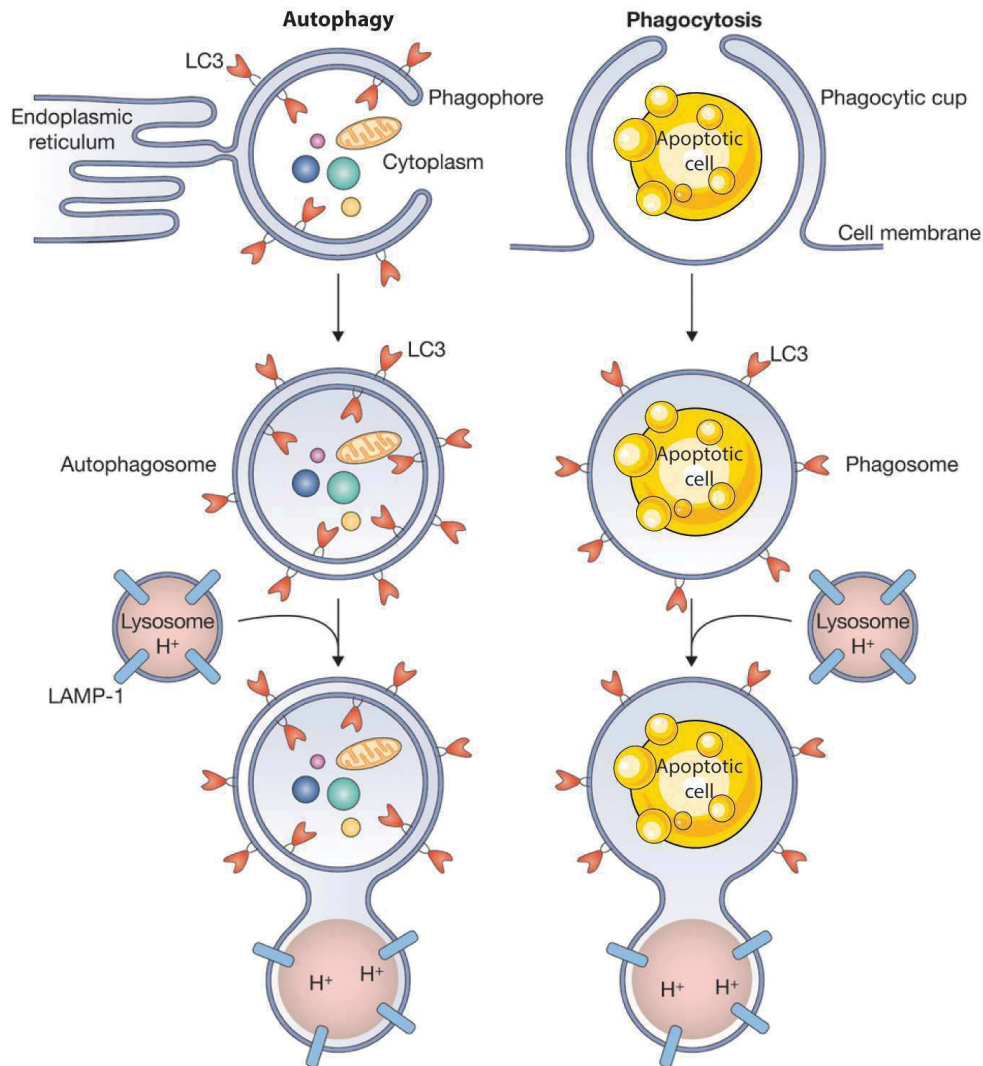


Figure 15 : Les processus d'autophagie et de *LC3-associated phagocytosis* (LAP)

Les cellules eucaryotes, quand elles subissent une privation en nutriments, encapsulent des portions de leur cytoplasme dans un autophagosome à double-membrane (gauche), alors que les phagocytes absorbent des corps extracellulaires dans un phagosome à simple membrane (droite). La PE dans ces deux types de structures peut être conjuguée à la protéine LC3, qui favorise alors le trafic des vésicules et la fusion avec le lysosome aux propriétés de dégradation. La LAP est la dégradation de corps cellulaires (apoptotiques, nécrotiques) ou de pathogènes phagocytés dans un phagosome qui utilise des composants de la machinerie autophagique (adaptée de (403)).

Basés sur une étude protéomique et des modèles murins d'extinction des gènes de l'autophagie, les plus récents travaux de l'équipe de Douglas Green ont identifiés les protéines *UV radiation resistance-associated gene* (UVRAG) et *RUN domain protein as Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing* (Rubicon) comme des protéines majeures de la LAP impliquant les récepteurs TLR2 et FcγR. En effet, si la formation d'autophagosome met en jeu le complexe C3PI3K composé des protéines Vps34, Beclin-1, Vps15 associées à Atg14 ou UVRAG, la LAP requiert spécifiquement et uniquement le complexe C3PI3K contenant UVRAG. L'activité de ce complexe au niveau du

phagosome est stimulée par la protéine Rubicon. Cette dernière favorise la production d'ERO et la maturation du phagosome d'une part en stimulant la production de PIP3 et ainsi le recrutement du complexe *NADPH oxidase-2* (NOX2), et d'autre part en stabilisant directement le complexe NOX2 (401). Ainsi, les protéines UVRAG et Rubicon sont nécessaires à la lipidation de LC3 au niveau de phagosomes dénommés dans ce contexte LAPosomes pour *LAP-engaged phagosomes*.

Ces mêmes auteurs proposent que la LAP puisse être définie comme un processus distinct de la phagocytose classique compte tenu de l'absence de recrutement des protéines associées à la LAP telles que Beclin1, Vps34, UVRAG, Rubicon, Atg7 et LC3-II aux phagosomes contenant des billes inertes. À l'inverse les phagosomes contenant des billes comportant des ligands de TLR2 présentent les caractéristiques des LAPosomes de par le recrutement de ces mêmes protéines (401).

Bien que les mécanismes sous-jacents régulant l'activation de cette voie non-canonique ne soient que partiellement élucidés, diverses fonctions de LC3-II sur les membranes non autophagosomales ont été suggérées. Il a été proposé que la présence de LC3-II sur les vésicules à simple membrane est cruciale pour la fusion avec les lysosomes et la dégradation de leur contenu luminal (395-397, 401, 404), ou que LC3 régule la réponse immunitaire médiée par les cytokines inflammatoires et la capacité de présentation d'antigènes des phagocytes (397, 404, 405). Cependant, la lipidation de LC3 peut aussi retarder la maturation du phagosome dans certains contextes pour permettre un apprêtement plus efficace de l'antigène (406). Ainsi, si la LAP semble jouer un rôle important dans certains mécanismes de l'immunité innée, une clarification du rôle de la LAP et une caractérisation plus complète de ses mécanismes moléculaires de régulation sont nécessaires.

3. De l'induction de l'apoptose au transfert horizontal de gènes

Au final, les cellules apoptotiques sont éliminées par les cellules compétentes pour la phagocytose qui vont ensuite inactiver et dégrader leurs composants cellulaires comme cela est classiquement décrit dans les modèles de phagocytes professionnels. L'apoptose est un moyen d'éliminer spécifiquement les cellules indésirables et de manière immunologiquement silencieuse (158, 164).

Ces éléments définissent le point de vue actuel, mais les travaux de quelques chercheurs ont contesté en partie ce dogme (407-410). Par le recoupement de résultats de divers travaux, Holmgren propose que l'ADN de cellules mourantes puisse être récupéré et recyclé par la cellule l'ayant internalisée, mais suggère aussi que le transfert horizontal de gènes (THG), médié par l'apoptose, puisse être un moyen rapide pour la cellule tumorale d'acquérir de nouvelles caractéristiques, contribuant de fait à la progression tumorale et à la résistance à la chimiothérapie (410).

3.1. La toile de fond du transfert horizontal de gènes chez les mammifères

La survenue du THG est largement documentée parmi les procaryotes et dans le règne végétal, dans lesquels la délivrance d'ADN intercellulaire, par l'intermédiaire de plasmides et d'éléments transposables, est responsable de la transmission de propriétés aussi diverses que la résistance aux antibiotiques ou l'adaptation à un nouvel environnement (411, 412). De nombreuses preuves, dont la majorité résulte du transfert *in vitro* d'ADN entre des cellules apoptotiques et des cellules phagocytaires receveuses, ont aussi étayé le paradigme de THG aux humains et autres mammifères (407-410, 413-421).

En 1999, de la Taille et collaborateurs sont les premiers à révéler que les cellules tumorales issues d'un adénocarcinome de prostate ont la capacité, comme les bactéries, de transférer un gène de résistance à une drogue afin de s'adapter à un environnement sélectif (414). En effet, après induction de l'apoptose, des cellules LNCaP possédant un gène de résistance à l'hygromycine transfèrent ce gène à des cellules LNCaP ne le possédant pas mais possédant un gène de résistance à la néomycine. Grâce au transfert de ce gène, les cellules receveuses sont en mesure de proliférer en milieu doublement sélectif contenant les deux antibiotiques. Les auteurs suggèrent que le traitement d'un cancer par un inducteur d'apoptose, qui supprimerait préférentiellement un variant génétique dans une tumeur hétérogène, pourrait provoquer le développement d'un sous-type de cellules cancéreuses plus agressives, en accumulant des mutations génétiques.

3.2. Le transfert horizontal de gènes viraux et cellulaires

Holmgren et collaborateurs ont expérimenté le THG de gènes viraux du virus Epstein Barr (EBV pour *Epstein Barr virus*) à l'aide de lymphocytes issus de lymphome de Burkitt et contenant des copies du génome d'EBV intégrées à leur propre génome (407). La co-culture de ces cellules induites en apoptose avec des macrophages humains, des cellules endothéliales ou des fibroblastes, a permis un transfert et l'expression par les cellules receveuses de gènes codés par EBV tels que *Epstein Barr Nuclear Antigen 1* (EBNA1) et *EBV-encoded RNA* (EBER)1 et EBER2. Cette expression a pu être détectée jusqu'à 5 semaines après le début de la co-culture et la fréquence d'expression a été corrélée distinctement avec les capacités phagocytaires des cellules receveuses. Ainsi, plus de 50% des macrophages humains, 20% des cellules endothéliales aortiques bovines, 4% des fibroblastes fœtaux humains et moins de 0,01% des cellules musculaires lisses présentaient une expression de séquences virales d'EBV, sachant que de manière générale, les macrophages et les cellules endothéliales ont un pouvoir phagocytaire plus important que les fibroblastes (407). Cependant ces observations n'excluaient pas le probable transfert d'ARN messager (ARNm) et de protéines. De manière intéressante, le statut physique du génome d'EBV semble impacter l'efficacité du transfert de gènes viraux ; seules les co-cultures de cellules receveuses avec des lignées cellulaires lymphoïdes présentant des copies d'EBV intégrées à leur génome ont aboutit au transfert d'ADN d'EBV, un tel transfert n'ayant pu être observé à partir de co-cultures avec des lignées cellulaires lymphoïdes présentant des copies d'EBV sous forme épisomale. Une explication probable serait que les formes épisomales puissent être plus facilement sujettes à la dégradation par les nucléases activées lors de l'apoptose que les copies intégrées.

L'utilisation en simultané de sondes marquées spécifiques de l'ADN de chaque espèce a permis non seulement de détecter le transfert aussi bien de séquences humaines que virales dans les noyaux des cellules bovines endothéliales receveuses, mais aussi de quantifier la fréquence du THG. Quinze et 17% des cellules contenaient de l'ADN humain et d'EBV respectivement, suggérant qu'il s'agit d'un mode de transfert d'ADN particulièrement efficace. La lignée cellulaire Namalwa, utilisée comme cellule donneuse pour la quantification du phénomène de THG, contient 2 copies intégrées (172 kb) d'EBV sur le chromosome 1 humain. Or, bien que les séquences d'ADN d'EBV constituent une fraction infime du génome total de la cellule donneuse, la fréquence de transfert dans les cellules receveuses de l'ADN d'EBV se situe à un niveau comparable à celui de l'ADN total humain. Cela suggère que certains fragments, en particulier les fragments d'ADN viraux, sont préférentiellement transférés.

Avec une stratégie comparable, Spetz et collaborateurs ont montré que des copies intégrées de gènes du virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1) de cellules infectées [HuT78_{SF2} et des

cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC pour *peripheral blood mononuclear cells*) issues de patients infectés] pouvaient être transférées à des fibroblastes humains et des cellules dendritiques immatures (413). En effet, suite à la co-culture *in-vitro* de fibroblastes humains, qui n'expriment pas le récepteur *cluster of differentiation* (CD)4 à VIH-1 et les co-récepteurs *chemokine (C-C motif) receptor 5* (CCR5) ou *chemokine (C-X-C motif) receptor 4* (CXCR4), avec des cellules apoptotiques infectées par VIH-1, la présence d'ADN et de protéines de VIH-1 peut être détectée dans les fibroblastes receveurs. Pour dissiper les doutes sur le fait que cet échange d'ADN puisse être le résultat d'une infection conventionnelle, le transfert horizontal de l'ADN viral ainsi que l'expression de protéines codées par VIH-1 ont aussi été démontrés en présence de cellules apoptotiques 8E5/LAV RT⁻, une lignée cellulaire infectée par VIH-1 mais caractérisée par une absence totale d'activité *reverse-transcriptase* et incapable de produire des virions.

En 2007, Bisset et collaborateurs ont mis en évidence, par un modèle de co-culture entre des cellules humaines et des cellules lymphoblastoïdes porcines donneuses, que le virus porcin *Porcine Endogenous RetroVirus* (PERV) pouvait être transmis par ce mécanisme de THG à des fibroblastes humains (419). Bien que le taux de transfert d'ADN de virus porcin dans les cellules humaines puisse sembler relativement faible (0,22%), celui-ci reste relatif à une cellule receveuse de faible capacité phagocytaire, les cellules telles que les macrophages et les cellules endothéliales ayant une efficacité d'internalisation plus de dix fois supérieure. Dans la continuité de cette étude relative à la transplantation cellulaire, Burghoff et collaborateurs ont démontré que suite à la mort de cellules endothéliales de veine ombilicale (HUVEC) exprimant la *green fluorescent protein* (GFP) après leur transplantation cardiaque chez le rat, les cardiomyocytes néonataux environnant les cellules transplantées présentent le marquage GFP suggérant que l'ADN a été transféré des cellules endothéliales mourantes aux cardiomyocytes (420). Un tel transfert de gène a été confirmé par l'observation chez certaines cellules GFP positives d'un phénotype distinct de cardiomyocyte, identifié sur des critères morphologiques 7 jours après la transplantation. De plus, ces cellules ne sont pas d'origine humaine, mais proviennent du rat hôte et sont mononuclées réfutant la possibilité d'une fusion nucléaire.

3.3. Le transfert horizontal de gènes et le suivi des gènes transférés jusqu'au noyau des cellules receveuses

Les études de THG précédemment citées, suggèrent que les corps apoptotiques peuvent charrier l'ADN d'une cellule eucaryote mammifère à une autre, se définissant alors comme un véritable vecteur. Basées sur des analyses génétiques à l'aide de sondes d'hybridation *in situ* marquées par

fluorescence (FISH pour *fluorescence in situ hybridization*), les expérimentations d'Holmgren et Spetz ont démontré que l'ADN génomique ainsi que celui d'EBV ou de VIH-1 provenant des corps apoptotiques pouvaient être détectés dans le compartiment nucléaire des cellules phagocytaires receveuses (407, 413). Le devenir de cellules apoptotiques, dont l'ADN a été préalablement marqué au 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), a été suivi après leur internalisation par Holmgren et collaborateurs. Les analyses de microscopie confocale révèlent que les cellules apoptotiques sont dirigées du cytoplasme vers le noyau de la cellule hôte, s'y juxtaposent, allant même jusqu'à le déformer et empiéter sur la membrane nucléaire. À la suite de cela, des fragments d'ADN BrdU-positifs sont détectés à l'intérieur de la cage nucléaire de la cellule receveuse. S'approchant morphologiquement d'une "phagocytose nucléaire", ce processus dont les mécanismes moléculaires sous-jacents restent indéterminés a été nommé "*pirinosis*", un acronyme des mots grecs "*pirinas*" signifiant noyau et "*enosis*" signifiant union. De plus, le transfert d'ADN dans le noyau de la cellule receveuse induit l'activation de *meiotic recombination element* (Mre)¹¹, une protéine liant l'ADN double brin fragmenté, et de γ -Histone(H)2AX (H2AX activé), une cible de ATM impliquée dans la voie de réparation de l'ADN (410). Enfin, Bergsmedh et collaborateurs ont observé que la co-culture de corps apoptotiques de fibroblastes de rat avec des fibroblastes murins déclenche une accumulation de p53 dans les fibroblastes receveurs, accumulation qui semble caractéristique du déclenchement de la voie des dommages à l'ADN (416).

Toutefois, aucune de ces expériences ne met clairement en évidence l'intégration des gènes transférés horizontalement dans le génome des cellules receveuses, ainsi que leur réplication au cours des divisions cellulaires ultérieures. En effet, compte tenu de la disparition de l'ADN d'EBV transféré après 2 mois de culture et de celui de PERV après 22 jours, le transfert et l'expression des gènes transférés sont transitoires dans les modèles de THG proposés respectivement par Holmgren et Bisset (407, 419).

3.4. De la compréhension de la régulation du transfert horizontal de gènes à l'implication du THG dans la transformation tumorale

Par la suite, des études ont permis l'identification, en partie, de mécanismes cellulaires s'opposant à la propagation de l'ADN exogène acquis *via* le THG par la cellule receveuse et sa transmission aux cellules filles, mécanismes pour lesquels le gène fonctionnel p53 joue un rôle majeur.

En effet, Bergsmedh et collaborateurs démontrent le transfert du gène de résistance à l'hygromycine et des oncogènes humains *cellular-myelocytomatosis* (*c-myc*) et *Harvey-rat sarcoma*

viral oncogene homolog (H-ras^{V12}) à partir de cellules apoptotiques de fibroblastes de rat (REF pour *rat embryonic fibroblasts*) transformés à des fibroblastes embryonnaires murins (MEF pour *mouse embryonic fibroblasts*) déficients en p53, aboutissant à la formation de clones/colonies *in vitro* (croissance en agar mou) ou à l'induction de résistance à l'hygromycine. Les oncogènes surexprimés ainsi que le gène de résistance à l'hygromycine sont détectés dans ces clones/colonies mais ne le sont plus dans les lignées cellulaires résultantes de 3 à 4 semaines d'expansion clonale en l'absence de pression de sélection (milieu contenant de l'hygromycine), suggérant que l'ADN dans son nouvel hôte cellulaire a été perdu au fil du temps de culture. Toutefois, le gène de résistance à l'hygromycine peut être maintenu indéfiniment en présence d'une pression de sélection perpétuelle (408). Avec une stratégie et des modèles cellulaires équivalents, Bergsmedt et collaborateurs ont identifié ces mêmes effets favorables à la propagation des gènes transférés suite à l'invalidation de la *cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor (CKI) p21*, une cible en aval de p53, globalement similaires à ceux observés suite à l'invalidation de p53. Ces expériences démontrent que la propagation de l'ADN transféré persiste seulement si les séquences acquises peuvent fournir un avantage sélectif et qu'elle est assujettie à l'inhibition de la voie p53/p21 dans les cellules receveuses (408, 415). Ainsi, ce mécanisme de défense contrôlé par p53 protège les cellules receveuses saines de la propagation d'ADN, potentiellement nocif, acquis à partir de cellules mourantes. Cette voie caractéristique de la réponse aux dommages à l'ADN est déclenchée par l'ADN exogène partiellement fragmenté qui est transféré de la cellule donneuse à la cellule receveuse (415, 416). La fragmentation de l'ADN de la cellule donneuse est induite par l'action combinée des *caspases activated DNases (CAD)* présentes et activées dans la cellule donneuse lors de l'apoptose et les DNases II présentes dans les lysosomes des cellules receveuses. Le blocage simultané de l'activité de CAD et DNase II inhibe complètement l'activation de p53 qui permet la propagation de l'ADN transféré avec une fréquence similaire à celle relative aux cellules déficientes en p53 (416). Ces observations suggèrent que ces deux enzymes fonctionnent de concert avec p53 pour former une barrière génétique bloquant la réplication d'ADN potentiellement nocif introduit par les corps apoptotiques.

3.5. Transformation par transfert horizontal d'oncogènes

Par ailleurs, le transfert des oncogènes *c-myc* et *H-ras^{V12}* dans les fibroblastes murins déficients en p53 ou p21 provoque l'acquisition d'un phénotype tumorigène *in vivo* chez la souris SCID (pour *severe combined immunodeficiency*) dépourvues de lymphocytes B et T, démontrant ainsi pour la première fois le rôle du THG dans la transmission d'oncogènes et la croissance tumorale (408, 415). Les oncogènes transférés sont décelés dans ces tumeurs plus de 3 mois après leur formation, confirmant le besoin de pression de sélection (croissance *in vivo*) pour persister. L'analyse en

métaphase des chromosomes des cellules tumorales de souris a montré la présence de chromosomes entiers de rat, de chromosomes hybrides rat/souris, ainsi que la présence de *c-myc* humain, confirmant que tout ou une partie des chromosomes peut être transféré.

Afin de contourner la voie de régulation de la transformation par THG impliquant p53, Ehnfors et collaborateurs ont transfecté conjointement aux oncogènes *c-myc* et *H-ras*^{V12}, le gène codant l'antigène T de *simian vacuolating virus 40* (SV40LT) (409). Cette protéine est capable de se lier à p53 et à la protéine du rétinoblastome (pRb) et d'induire leur dégradation par le protéasome, inhibant d'une part la transactivation de p21 et d'autre part la libération du facteur de transcription E2F, aboutissant ainsi à une progression du cycle cellulaire. Les fibroblastes murins sauvages cultivés avec des corps apoptotiques *c-myc/H-ras*^{V12}/SV40LT prolifèrent sous forme de colonies en agar mou et expriment SV40LT. L'injection de ces fibroblastes dans des souris induit la formation de tumeurs positives pour SV40LT confirmant ainsi que l'inactivation de la voie p53 favorise la transformation après THG. L'injection des fibroblastes transformés par transfert de *c-myc/H-ras*^{V12}/SV40LT dans des souris SCID provoque non seulement la formation d'une tumeur positive pour SV40LT mais aussi le transfert de SV40LT *in vivo* aux cellules endothéliales environnant les cellules transplantées. Après analyse des gènes transférés, les auteurs retrouvent tout ou une partie des chromosomes de fibroblastes transférés qui fusionnent ou non avec les chromosomes des cellules environnantes. Les cellules endothéliales abritant SV40LT n'induisent pas de tumeurs après réimplantation contrairement aux fibroblastes transformés. Cependant, ces cellules endothéliales forment des petits kystes faiblement irrigués lorsqu'elles sont cultivées en matrigel à l'inverse des cellules endothéliales normales. L'ensemble de ces données soutient la possibilité que le transfert de gènes puisse favoriser l'instabilité génétique dans les tumeurs ou dans le stroma tumoral adjacent.

Un travail du laboratoire a mis en évidence l'internalisation de cellules apoptotiques dérivées de cancer du col de l'utérus abritant des séquences d'ADN de papillomavirus humains (HPV pour *human papillomavirus*) de type 18 (HeLa, 10 à 50 copies d'ADN d'HPV intégrées au génome des cellules) ou de type 16 (Ca Ski, 100 à 600 copies d'ADN d'HPV intégrées au génome des cellules en concatémères) par des fibroblastes primaires humains, un type de cellules composant majoritairement le microenvironnement tumoral. À partir de ce modèle de co-culture *in vitro* et basés sur des analyses d'hybridation *in situ* et de PCR, Gaiffe et collaborateurs ont détecté l'oncogène E6 d'HPV dans les fibroblastes, mais aussi ses transcrits, suggérant que les cellules apoptotiques HPV positives pouvaient assurer le transfert des oncogènes d'HPV dans des cellules humaines saines et sauvages. Après le THG, les fibroblastes développent des propriétés propres aux cellules transformées telles qu'une prolifération accrue, une aneuploïdie et une capacité de croissance indépendante de l'ancrage illustrée par la formation de clones en culture en agar-mou *in vitro*. La perte d'expression

de p53, une protéine ciblée par E6 d'HPV qui facilite alors sa dégradation par le protéasome, et de p21 suggère que les oncogènes d'HPV pourraient être à l'origine de la transformation des fibroblastes (421). Ces résultats suggèrent un mécanisme alternatif de transformation cellulaire associée à HPV qui pourrait être impliqué dans la progression des tumeurs, les récurrences après traitements et le développement de tumeurs à partir de cellules mésenchymateuses qui ne sont pas des cibles naturelles des HPV (421-423).

3.6. Autres mécanismes potentiellement impliqués dans le transfert horizontal de gènes

L'internalisation de cellules apoptotiques comme source d'ADN exogène n'est pas le seul mécanisme décrit dans la littérature comme pouvant contribuer au THG.

3.6.1. L'internalisation d'ADN circulant

Des auteurs affirment que l'internalisation d'ADN circulant sous forme d'ADN fragmenté libre, vraisemblablement issu du relargage de matériel génétique par les cellules ou les tissus, peut être impliqué dans le THG (424).

La capacité du matériel génétique à circuler dans les organismes eucaryotes est connue depuis 1948 (425). Les travaux de Anker et Stroun ont démontré que l'ADN circulant peut être libéré par les bactéries et les organismes supérieurs et peut pénétrer dans des cellules receveuses (426-428). Ces découvertes corroborent le concept selon lequel l'ADN pourrait agir comme un messageur (429, 430). Ce concept est renforcé par la facilité avec laquelle l'ADN bactérien et eucaryote peut circuler librement dans les organismes animaux et végétaux et sa capacité à pénétrer dans des cellules hôtes au sein desquelles il peut être détecté dans le noyau (431, 432). Une telle absorption d'ADN dans les cellules ne nécessite pas de véhicule comme les liposomes ou encore l'utilisation de l'électroporation pour en faciliter l'entrée.

Des fragments d'ADN, compris entre 0,5 et 21 kpb, peuvent être détectés dans le sang humain ainsi que dans l'urine et la salive. La concentration moyenne d'ADN circulant détecté dans le sang est de 13 ng/ml pour les individus sains et de 180 ng/ml pour les patients souffrant de cancer (433). Chez ces patients, il a été démontré qu'une partie de cet ADN circulant provient des cellules tumorales. En effet, des caractéristiques singulières de l'ADN tumoral ont pu être retrouvées dans le matériel génétique extrait du plasma des patients, telles que la présence de mutations sur des gènes impliqués dans la carcinogenèse ou des altérations de microsatellites. À ce titre, l'ADN plasmatique constitue une source de biomarqueurs des cancers ouvrant la voie à de nouvelles stratégies de prévention, de diagnostics précoces ou encore de suivi des patients. L'origine des acides nucléiques

trouvés dans le sérum et le plasma est encore inconnue même si diverses sources ont été proposées telles que la décomposition des cellules sanguines, les bactéries et les virus, la nécrose cellulaire et tissulaire, la libération des nucléosomes associés au processus d'apoptose, la libération des transposons et rétro-transposons cellulaires ou encore le relargage actif de complexes ADN/ARN/lipoprotéine par les cellules vivantes (424, 434).

Les études sur l'absorption de l'ADN circulant par des cellules eucaryotes ont montré que la biologie des cellules receveuses pouvait être altérée, et ce, dans certains cas, indépendamment de son intégration dans le génome de la cellule hôte (435-437).

À titre d'exemple, Mitra et collaborateurs ont récemment démontré que de l'ADN fragmenté, isolé de sang de donneurs sains et de patients atteints de cancer, pouvait être activement internalisé par des cellules en culture (*e.g.* NIH3T3), à la suite de quoi de tels acides nucléiques s'accumulent dans le noyau et s'associent aux chromosomes des cellules receveuses (432). L'ADN fragmenté intracellulaire déclenche une réponse aux dommages de l'ADN qui pourrait faciliter leur intégration dans le génome de la cellule hôte. Stroun et collaborateurs ont notamment proposé que l'ADN circulant puisse participer au développement de métastases *via* l'absorption par des cellules de tels acides nucléiques par l'intermédiaire d'un mécanisme apparenté à la transfection passive (438). En effet, ces auteurs ont démontré en 1994 que la transformation de fibroblastes murins NIH3T3 était possible suite à leur culture avec du surnageant de culture de cellules SW480 dérivées de cancer du colon, et que cette transformation était associée à l'acquisition de l'oncogène *K-Ras* muté (439).

3.6.2. La capture de petites vésicules

Les petites vésicules extracellulaires, d'un diamètre compris entre 40 et 1000 nm, représentent un mode important de communication intercellulaire de par leur fonction de vecteur de protéines cytosoliques, de lipides ou d'ARN (440). Ces petites vésicules sont généralement appelées exosomes ou microvésicules selon leur origine membranaire, endosomale et plasmique respectivement.

Le terme exosome a été initialement utilisé pour définir l'ensemble de ces vésicules (440). À l'heure actuelle, cette nomenclature a été adoptée pour décrire spécifiquement la libération de petites vésicules de 40 à 100 nm suite à la fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique (441). Depuis plusieurs décennies, il a été suggéré que de nombreux types cellulaires sécrètent des exosomes tels que les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques, les plaquettes, les neurones, les cellules épithéliales intestinales ou encore les cellules tumorales (442-444).

Les microvésicules sont généralement plus larges (jusqu'à 1000 nm de diamètre), bien que de plus petites vésicules (100 nm) peuvent aussi être libérées par bourgeonnement de la membrane plasmique (445). Une avancée majeure dans la compréhension du rôle de ces structures vésiculaires

a été faite lorsqu'il a été démontré que leur lumière contient à la fois des ARNm et des microARN, et que ces ARNm pouvaient être traduits en protéine au sein de la cellule receveuse (446, 447).

Au cours des dernières années, diverses fonctions biologiques ont été attribuées aux petites vésicules extracellulaires. Dans les années 1980, la sécrétion d'exosomes par les réticulocytes a été présentée comme un mécanisme d'élimination de molécules indésirables (448). La capacité des exosomes à agir comme des vésicules présentatrices d'antigènes, pour stimuler les réponses immunitaires antitumorales, ou à induire des effets tolérogènes a suscité l'intérêt des immunobiologistes pour leur potentielle utilisation en clinique (449, 450). Les cellules tumorales comme d'autres cellules du microenvironnement tumoral sécrètent aussi des petites vésicules (exosomes et microvésicules). Il a été notamment démontré que ces vésicules contribuaient à la progression tumorale en promouvant l'angiogenèse et la migration des cellules tumorales en faveur de métastases (451, 452). De plus, les vésicules dérivées de tumeur transportent aussi des molécules immunosuppressives qui peuvent inactiver les lymphocytes T ou *Natural killer* ou encore promouvoir la différenciation de lymphocytes T régulateurs ou des cellules myéloïdes pour supprimer les réponses immunitaires (453). Enfin, ces vésicules extracellulaires peuvent être isolées à partir de différents fluides corporels comme le sérum, la salive et l'urine et pourraient servir de source potentielle de nouveaux biomarqueurs tumoraux (454, 455).

Récemment, de nouvelles données ont étendu le contenu des microvésicules tumorales à l'ADN simple brin, à la fois génomique et complémentaire, ainsi qu'à des niveaux élevés de transposons. L'ensemble de ces molécules pourrait avoir un rôle dans la communication génétique entre cellules (456).

4. Papillomavirus humains et cancer

4.1. Papillomavirus humains : les agents étiologiques du cancer du col de l'utérus

Les papillomavirus (PV) sont des virus non enveloppés qui appartiennent à la famille des *Papillomaviridae* dont environ 170 types infectent l'Homme (457). Les HPV appartiennent au genre alpha, qui regroupe essentiellement des HPV à tropisme muqueux, et aux genres bêta, gamma, mu et nu qui regroupent préférentiellement des HPV à tropisme cutané. L'infection persistante aux HPV de genre alpha, dits à haut risque (HPV-HR), au niveau du col utérin est définie comme la cause nécessaire du développement du cancer du col de l'utérus, avec plus de 99% de lésions cervicales contenant des séquences virales (458). Parmi ces HPV-HR, les HPV de type 16 et 18 sont responsables de plus de 80% des cancers invasifs du col de l'utérus en France (459) et 70% dans le monde (460).

À l'échelle mondiale, le cancer du col de l'utérus est le quatrième cancer de la femme avec 528 000 nouveaux cas estimés en 2012. Il a été estimé que le cancer du col de l'utérus était responsable de 266 000 décès dans le monde en 2012, ce qui représente 7,5% de la totalité des décès par cancer chez la femme (461).

Le génome des HPV est constitué d'une molécule d'ADN double brin circulaire d'environ 8 kb comprenant huit gènes sous la dépendance de deux promoteurs. Les gènes précoces (E1 à E7, E pour *early*) codent des protéines non structurales responsables de la persistance et de la réplication du génome viral dans les cellules hôtes et de la transformation néoplasique de celles-ci, tandis que les gènes tardifs (L1 et L2, L pour *late*) codent les protéines de structure servant à la formation de la capsid virale. La région appelée *long control region* (LCR) contrôle l'expression et la réplication du génome viral. Les protéines virales E7 et E6 des HPV-HR, exprimées de façon continue lors d'une infection persistante, dérégulent de nombreux processus cellulaires et conduisent progressivement à l'immortalisation et à la transformation des cellules infectées. En ce sens, ces oncoprotéines virales sont les acteurs de l'infection transformante par HPV. Les mécanismes à l'origine de la perte de contrôle de l'expression des gènes viraux E7 et E6 font intervenir principalement l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire, décrit comme un processus clé de la carcinogenèse (462). Il a été démontré que la majorité des cancers invasifs du col de l'utérus associés aux HPV-HR comportent des séquences d'ADN d'HPV intégrées au génome des cellules cancéreuses. L'intégration se produit fréquemment dans des sites dits "fragiles" du génome humain et, dans certains cas, peut conduire à une augmentation de l'expression de protooncogènes cellulaires tels que *c-myc* (463). Faisant suite au clivage de l'ADN viral dans les régions E2 et/ou E1, cette intégration conserve l'intégrité de la région LCR contenant le promoteur dit précoce dont dépend l'expression des gènes précoces (*early*) ainsi que la région codant E7 et E6. Au contraire, d'autres protéines virales, y compris le répresseur

transcriptionnel E2 qui régule négativement l'expression de E7 et E6, ne sont plus exprimées, ce qui provoque en conséquence l'expression dérégulée de E7 et E6 (462). Si l'intégration est un événement essentiel dans la carcinogenèse, des phénomènes épigénétiques semblent impliqués dans ce processus comme la méthylation du promoteur viral qui peut favoriser l'expression accrue de E7 et E6, et ce, en l'absence du clivage de l'ADN viral dans la région E2 (464).

4.2. Le cadran des "*Hallmarks of Cancer*" : un modèle applicable à la carcinogenèse associée aux HPV

La carcinogenèse est un phénomène multi-étapes, incluant l'initiation, la promotion et la progression (465), au cours desquelles des altérations génétiques successives sont capables d'induire la transformation de cellules normales en cellules malignes. Développé par Hanahan et Weinberg, le cadran des "marques distinctives du cancer" ou "*Hallmarks of Cancer*" permet la compartimentation du phénotype malin en capacités cellulaires spécifiques qui sont acquises au cours du processus de carcinogenèse (Figure 16, au centre). Ainsi, six marques distinctives majeures caractérisent la transformation tumorale : l'indépendance vis-à-vis de signaux mitogènes exogènes (facteurs de croissance), l'insensibilité envers les signaux inhibiteurs de croissance, le potentiel répliatif illimité (immortalité), l'angiogenèse, la capacité à envahir les tissus environnants et le potentiel métastatique (invasion), ainsi que l'échappement à la mort cellulaire (28). Plus récemment, l'approfondissement des connaissances a permis de définir (i) deux caractéristiques dites "émergentes" des cellules cancéreuses que sont la modification du métabolisme énergétique et l'échappement à la destruction par les cellules immunitaires, et (ii) deux caractéristiques dites "promotrices" de la cellule cancéreuse que sont l'instabilité génétique favorisant l'acquisition de mutations ainsi que la mise en œuvre d'un microenvironnement à caractère inflammatoire (29). Chacune de ces marques distinctives du cancer représente une conséquence d'altérations oncogéniques qui sous-tendent les caractéristiques phénotypiques de la tumeur.

Le processus de carcinogenèse s'inscrit dans le temps avec l'acquisition progressive de toutes les caractéristiques cellulaires nécessaires qui, prises dans leur ensemble, constituent un phénotype malin. Ceci résulte ainsi de l'accumulation d'altérations somatiques oncogéniques, causées par des mutations spontanées ou des mutations à la suite d'exposition à des facteurs environnementaux dans le contexte du fond génétique de l'hôte et les pressions sélectives imposées par le microenvironnement tissulaire (29).

Concernant la carcinogénèse associée aux HPV, les nombreuses activités biologiques des oncoprotéines E7 et E6 leur permettent d'agir sur la quasi-totalité des "marques distinctives du cancer" (29) (Figure 16).

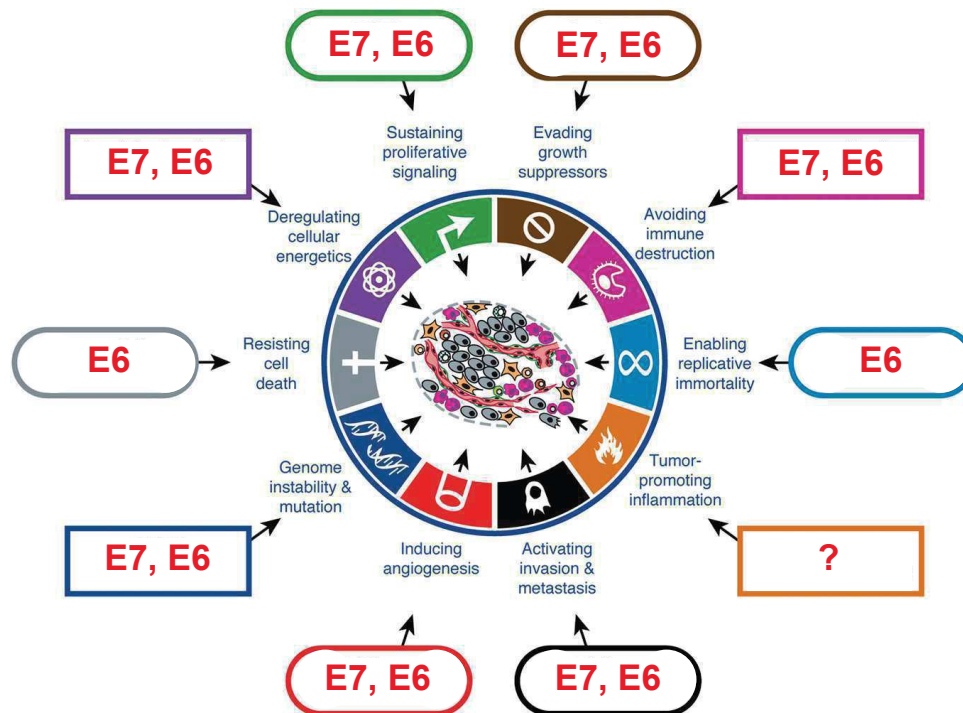


Figure 16 : "Marques distinctives du Cancer" : un modèle applicable à la carcinogénèse associée aux HPV

Les oncoprotéines E7 et E6 d'HPV-HR ciblent la quasi-totalité du spectre des marques distinctives du cancer. L'inflammation a été associée aux cancers induits par HPV, mais on ignore si/comment les HPV peuvent déclencher une inflammation et si l'inflammation peut être un facteur de promotion tumorale ou antitumorale dans le contexte d'une infection par HPV. Les oncoprotéines d'HPV-HR qui affectent chaque "marque" sont indiquées respectivement dans les cadres autour du cadran (adaptée de (29, 466)).

4.2.1. Rôles de la protéine E7 des HPV-HR dans la carcinogénèse

L'oncoprotéine E7 des HPV-HR est une protéine d'environ 100 acides aminés localisée dans le noyau et le cytoplasme des cellules infectées. Son extrémité C-terminale présente deux domaines de liaison au zinc (CXXC). Son extrémité N-terminale renferme des régions très similaires aux régions conservées (Cr pour *conserved region*) Cr1 et Cr2 de la protéine E1A des adénovirus aussi retrouvées dans l'antigène T de SV40. Ces domaines Cr1 et Cr2 confèrent à la protéine E7 des HPV-HR la plupart de ses propriétés transformantes.

- Le motif LXCXE présent dans le domaine Cr2 de l'oncoprotéine E7 lui confère une forte affinité pour le suppresseur de tumeur p105Rb et les protéines à poche apparentées p107 et p130 (467, 468). La spécificité de l'oncoprotéine E7 des HPV-HR réside dans le fait qu'en plus de séquestrer pRb, elle induit sa dégradation par le protéasome (469, 470) *via* le complexe culline 2/ ubiquitine ligase (471). La levée de répression de la transcription dépendante des facteurs E2F s'en trouve renforcée. De plus, la protéine E7 des HPV-HR active la transcription dépendante de E2F1 par interaction directe

avec ce dernier (472) et la transcription dépendante de E2F2 en liant et inactivant les co-répresseurs transcriptionnels que sont les *histone deacetylase* (HDAC) de classe I (473, 474). L'expression accrue de gènes tels que ceux codant les cyclines E et A, la phosphatase CDC25A qui active CDK2 ou encore l'ADN polymérase *alpha* permet l'entrée et la progression en phase S. L'oncoprotéine E7 favorise aussi la transition G1/S par inhibition de l'activité des CKI p21 et p27 (469, 475, 476).

Le rôle clé de l'oncoprotéine E7 dans la dérégulation de la prolifération cellulaire est renforcé par son interaction avec de nombreuses autres protéines cellulaires dont les fonctions se trouvent altérées (Figure 17) : (i) l'interaction de l'oncoprotéine E7 avec la protéine c-myc augmente l'activité de ce facteur de transcription connu pour promouvoir la prolifération et inhiber la différenciation cellulaire (477) ; (ii) l'inhibition des voies de signalisation du TNF- α et du TGF- β par E7 s'oppose à la différenciation et favorise la prolifération cellulaire (478) ; (iii) l'interaction directe de E7 avec la protéine p300 à activité *histone acetyltransferase* (HAT) inhibe sa fonction d'activateur transcriptionnel (479) ce qui suggère qu'à l'instar des oncoprotéines E1A des adénovirus et de l'antigène T de SV40, l'oncoprotéine E7 dérégule la prolifération cellulaire *via* son action sur p300.

Les cellules en cours de transformation exprimant les oncoprotéines virales sont soumises à un stress métabolique. La dégradation de pRb atténuée aussi la réponse de la sénescence induite par le stress oncogénique qui est déclenchée par l'expression de E7 et est signalée par l'inhibiteur de CDK4/CDK6 nommé p16^{INK4} (480). Par conséquent, la dégradation de pRb sert aussi à échapper aux suppresseurs de croissance.

- La protéine E7 induit l'apparition de centrosomes surnuméraires et de mitoses anormales dites multipolaires caractéristiques des lésions induites par les HPV-HR (481). Cette fonction de E7 dépend de son action sur pRb et CDK2 ainsi que sur d'autres partenaires cellulaires comme la tubuline- γ , la protéine *nuclear mitotic apparatus* (NuMa) ou encore la dynéine. En se liant à la tubuline- γ , la protéine E7 empêche son recrutement au niveau des centrosomes pendant la mitose (482). L'interaction de E7 avec la protéine NuMa et la dynéine entraîne un défaut d'alignement des chromosomes lors de la prométaphase (483). L'oncoprotéine E7 induit aussi une augmentation de l'expression des kinases *Polo-like kinase 4* (Plk 4) et Aurora, associées à l'absence de réponse apoptotique suite aux dommages à l'ADN des cellules cancéreuses, favorisant ainsi des duplications aberrantes des centrioles (484). Par ce biais, E7 favorise les gains et pertes de chromosomes pendant la mitose et l'aneuploïdie caractéristique des infections à HPV-HR.

L'oncoprotéine E7 entraîne l'apparition de cassures double brin de l'ADN (485) associées à une activation des voies de réparation ATM/ *ataxia telangiectasia RAD3-related* (ATR) (486) et un phénomène de re-réplication de l'ADN cellulaire (487). De plus, en entraînant la dégradation

prématurée de la claspine, un acteur de la voie ATR dont la protéolyse est essentielle au passage du point de contrôle G2/M, E7 stimule l'entrée en phase M malgré la présence de dommages à l'ADN (488). Ainsi, E7 favorise l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire, la réplication des génomes viraux intégrés et l'accumulation d'anomalies génétiques promouvant de ce fait la transformation des cellules infectées (486) (Figure 17).

- La protéine E7 maintient l'activité télomérase induite par E6 et participe ainsi à la stabilisation de la longueur des télomères (489). En agissant en coopération avec la protéine B *Lymphoma Mo-MLV Insertion region 1* (BMI1) impliquée dans la réorganisation de la chromatine, E7 favorise l'immortalisation de kératinocytes (490). Ainsi, l'oncoprotéine E7 contribue à l'échappement des cellules à la sénescence répllicative et au maintien de leurs capacités prolifératives.

- Les HPV-HR peuvent établir une infection persistante à long terme des cellules épithéliales, échappant, par conséquent, avec succès à la destruction immunitaire. L'oncoprotéine E7 peut entraver l'immunité innée par inhibition de la signalisation de l'interféron α *via* son interaction avec la protéine p48 (491). De plus, le domaine en doigt de zinc de la partie C-terminale de la protéine E7 permet de réprimer l'*Interferon Regulatory Factor* (IRF)-1 en recrutant des HDAC à son promoteur et d'inhiber son activité transcriptionnelle (Figure 17) (492). Enfin, la protéine E7 d'HPV16 inhibe la transcription des gènes du CMH de classe I en utilisant deux mécanismes : (i) la protéine E7 peut se lier au motif de liaison RXXR β (GGTA) du promoteur proximal des gènes du CMH de classe I ; (ii) cette oncoprotéine inhibe aussi la transcription de CMH de classe I induite par le TNF- α en empêchant la translocation nucléaire de NF- κ B (493).

- L'hypoxie intra-tumorale induit la néo-angiogenèse par l'intermédiaire du facteur de transcription *hypoxia-induced factor 1 alpha* (HIF-1 α). L'oncoprotéine E7 stimule l'expression de HIF-1 α et stabilise ce facteur clé de l'angiogenèse (494, 495). De plus, l'inactivation des HDAC par E7 active la transcription dépendante de HIF-1 α des gènes codant le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et l'IL-8 (496-498) qui régulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales nécessaires à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

- La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est communément impliquée dans les cancers les plus agressifs et joue un rôle crucial dans le processus d'invasion tumorale (499). La protéine E7 contribue à la TEM (500). Cette protéine peut former un complexe avec l'actine et agir sur la structure du cytosquelette. En effet, une diminution de la quantité d'actine polymérisée est observée dans les cellules exprimant E7. De plus, E7 réprime, *via* ses motifs CXXC, la transcription de la fibronectine, une glycoprotéine du cytosquelette impliquée dans l'adhérence cellule-matrice (501). E7 contribuerait aussi à l'invasion tumorale en stimulant l'expression de la métalloprotéase

matricielle (MMP) MT1-MMP (502). En séquestrant p600, l'oncoprotéine E7 protège les cellules de l'anoïkis, favorisant ainsi le processus d'invasion (503, 504).

- L'oncoprotéine E7 participe à l'adaptation du métabolisme énergétique des cellules infectées. D'une part, l'activation allostérique de l' α -glucosidase par E7 conduit à l'activation de la glycolyse et à l'augmentation de la disponibilité en glucose intracellulaire (505). D'autre part, E7 interagit avec la pyruvate kinase et la maintient sous sa forme dimérique peu active (506, 507). Comme conséquence de cette association, E7 provoque l'effet Warburg qui se définit comme une transition du métabolisme cellulaire basé sur la phosphorylation oxydative classique à la fermentation aérobie (507).

In vitro, l'expression de l'oncoprotéine E7 dans des kératinocytes active l'autophagie (508). En condition de stress, ce processus conduit à la dégradation lysosomale de protéines anormales et d'organites endommagés et permet le recyclage des produits de dégradation (acides aminés, nucléotides, acides gras). En fournissant une source alternative d'énergie, l'autophagie favorise la survie cellulaire et participe au maintien de l'homéostasie (509).

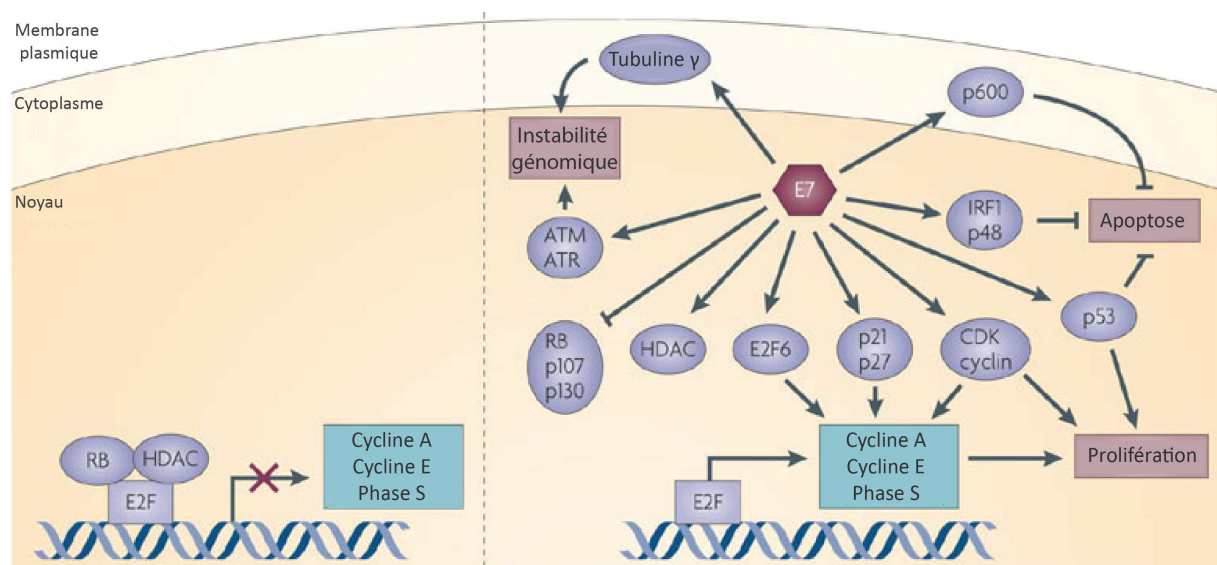


Figure 17 : Principales fonctions de l'oncoprotéine E7 dans la carcinogénèse (d'après (486))

4.2.2. Rôles de la protéine E6 des HPV-HR dans la carcinogénèse

L'oncoprotéine E6, une protéine d'environ 150 acides aminés, contient deux domaines en doigts de zinc (CX₂CX₂₉CX₂C) séparés par un inter-domaine de 36 acides aminés. Cette protéine est stabilisée par l'ubiquitine ligase *E6-associated protein* (E6AP) (510) et la protéine *ubiquitine-specific peptidase* (USP) 15 (511). Toutefois, l'action de ces deux protéines ne suffit pas à maintenir des niveaux élevés de protéine E6 qui est rapidement dégradée par le protéasome et dont la demi-vie n'excède pas une heure (510, 512). La localisation de la protéine E6 est essentiellement nucléaire. Des expériences de

surexpression ont montré qu'une localisation cytoplasmique, au niveau des ribosomes, pouvait aussi être observée (513).

L'oncoprotéine E6 ne présente pas d'activité enzymatique. L'essentiel de ses propriétés transformantes implique des interactions entre E6 et de nombreux partenaires cellulaires dont : (i) des protéines contenant un domaine acide LXXLL telles que E6AP (514), cette interaction nécessitant la structure en doigts de zinc de E6 (515) ; (ii) des protéines à domaine PSD95/Dlg1/ZO-1 (PDZ) au niveau d'un motif S/TXVIL en C-terminal de l'oncoprotéine E6 (516) ; (iii) d'autres protéines par des interactions indirectes ou avec des domaines non définis.

- Si le gène codant p53 est muté dans 50% des tumeurs, il est généralement sauvage dans les tumeurs associées aux HPV-HR et l'oncoprotéine virale E6 met en œuvre différents mécanismes de contournement de ce suppresseur de tumeurs. La protéine E6 des HPV-HR et à bas risque (BR) lie l'extrémité C-terminale de p53 dans un complexe E6/E6AP/p53. L'interaction de l'oncoprotéine E6 des HPV-HR avec le domaine central de p53 induit son ubiquitinylation par E6AP et sa dégradation *via* le protéasome (517-519). Cette propriété est spécifique aux HPV-HR (520, 521). L'oncoprotéine E6 empêche la stabilisation de p53 normalement induite lors d'un stress oncogénique en inhibant la voie p14/*alternative open reading frame* (ARF) (522).

De plus, E6 inactive les molécules de p53 qui échappent à la dégradation en les séquestrant dans le cytoplasme (523) ou en provoquant un changement de conformation qui inhibe leur liaison à l'ADN (524, 525). L'interaction de E6 avec les HAT p300, *CREB-binding protein* (CBP) (526, 527), *transcriptional adapter 3 homolog* (Ada3) (528) et *Tat interacting protein 60 kDa* (TIP60) (529) prévient l'acétylation de p53 et affecte sa capacité à activer la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt de cycle comme p21 (Figure 18).

L'action de la protéine E6 sur la transcription ne se limite pas aux gènes dépendants de p53. Elle concerne aussi des gènes régulés par les voies de transduction du signal, principalement la voie des *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) et la voie *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTOR), qui sont ciblées par E6 à plusieurs niveaux : (i) E6 favorise et prolonge l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase tels que l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR), l'*insulin receptor* (INSR) et l'*insulin-like growth factor receptor* (IGFR) avec pour conséquence l'activation des voies MAPK et mTOR (530). (ii) E6 conduit à l'activation de certaines protéines G. Elle induit la dégradation de protéines homologues des GAP telles que *E6-targeted protein 1* (E6TP1) ou la tubérine favorisant respectivement la liaison de GTP aux protéines *Grb-2 related adaptor protein* (GRap), activatrice de la voie des MAPK (531) et Rheb, activatrice de mTOR (532). (iii) E6 entraîne la dégradation de la protéine *G protein pathway suppressor* (Gps) 2, un inhibiteur de la voie des MAPK

(533) et celle de la protéine à domaine PDZ *Na/H exchange regulatory factor-1* (NHERF-1) conduisant à l'activation de la voie mTOR (534).

L'activation de ces voies de signalisation par l'oncoprotéine virale permet une transduction efficace du signal mitogène et conduit à l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie ou encore la migration cellulaire. La traduction des protéines codées par ces gènes est elle aussi favorisée par l'oncoprotéine E6. En effet, E6 augmente l'expression du facteur *eucaryotic initiation factor* (eIF) 4E (535) et sa libération suite à la phosphorylation des facteurs *eIF4E Binding Protein* (4E-BP) par la kinase mTOR activée (530, 536). Il en résulte une augmentation de la traduction des ARNm d'oncogènes hautement régulée par la disponibilité en eIF4E (537).

- La dégradation de p53 induite par E6 des HPV-HR inactive progressivement les points de contrôle du cycle cellulaire G1 et G2, promouvant ainsi l'aneuploïdie (538). De plus, E6 favorise l'instabilité génomique en interagissant avec *human minichromosome maintenance 7* (hMCM7) (539) et des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN telles que *O(6)-methylguanine-DNA methyl transferase* (MGMT) (540) et *X-ray repair cross complementing 1* (XRCC1) (541) et contribue ainsi à l'accumulation d'anomalies génétiques impliquées dans la promotion tumorale.

- La réactivation de l'activité de la télomérase, enzyme dont la sous-unité catalytique *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT) permet l'allongement des télomères, est un processus clé de la carcinogenèse. La protéine E6 des HPV-HR active hTERT : (i) au niveau transcriptionnel : en diminuant la disponibilité de ses répresseurs transcriptionnels *upstream stimulating factors 1/2* (USF-1/2) (542) et *nuclear factor binding to a X1 box sequence* (NFX)-91 (543) ainsi qu'en favorisant l'acétylation des histones (544) et le recrutement des activateurs transcriptionnels c-Myc (545) et *specificity protein 1* (Sp1) (546) au niveau du promoteur du gène *hTERT* ; (ii) au niveau post-transcriptionnel par la stabilisation des ARNm hTERT impliquant les protéines NFX-123 et *poly(A)-binding protein 4* (PABP4) (547) ; (iii) au niveau post-traductionnel par liaison directe de E6 avec la protéine hTERT et les télomères, associée à une augmentation de l'activité catalytique de l'enzyme (548). Par ces mécanismes, E6 contribue à l'immortalisation cellulaire et à l'accumulation d'anomalies génétiques impliquée dans la promotion tumorale (Figure 18).

- L'oncoprotéine E6 peut entraver l'immunité innée par l'inhibition des réponses interféron, en régulant négativement l'expression de multiples gènes impliqués dans cette voie de signalisation (549). De plus, E6 inhibe la *trans*-activation de l'IRF-3 et, de ce fait, sa capacité à activer les gènes des réponses interféron (550). La capacité de la protéine E6 à interagir avec p53 et p300/CBP semble aussi jouer un rôle dans la régulation des réponses interféron (551).

- Une des principales conséquences de la dégradation de p53 ou de la perte de sa fonction induite par E6 est l'inhibition des voies de signalisation de l'apoptose. L'oncoprotéine E6 limite l'induction de l'apoptose dans les cellules infectées, d'une part *via* son action sur p53 qui inhibe la synthèse de protéines telles que la protéine pro-apoptotique BAX ou le récepteur de mort Fas, et d'autre part *via* son interaction avec différents acteurs de l'apoptose (552). *Via* son action sur p53, E6 entraîne la dégradation de la protéine pro-apoptotique BAK impliquée dans la voie intrinsèque de l'apoptose (553) et une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (552). Il en résulte une moindre libération (dépendante de BAK) de facteurs apoptotiques comme le cytochrome c, Omi/HtrA2 et le facteur AIF (554). Si l'implication de la protéine E6-AP dans la dégradation de BAK est certaine pour HPV18, elle n'est pas démontrée pour tous les types d'HPV (553). L'intervention d'une autre ubiquitine ligase dans ce processus reste envisageable. Le changement de conformation de BAK et/ou sa dissociation avec son partenaire anti-apoptotique MCL-1 pourraient être nécessaires pour son interaction avec E6 et E6-AP.

Par ailleurs, E6 peut inhiber la mort cellulaire par une voie indépendante de p53. En effet, il a été rapporté que E6 entraîne aussi une augmentation de l'expression de BCL-2 indépendamment de p53 (555) et bloque l'apoptose dans les cellules ou les modèles murins dépourvus de p53 (556).

De plus, E6 inhibe la voie extrinsèque de l'apoptose en interagissant avec le récepteur de mort TNFR-1 (557), les protéines adaptatrices TRADD et FADD (557, 558) et la pro-caspase-8 (559) empêchant ainsi la formation du DISC.

Enfin, E6 favorise l'expression de deux protéines inhibitrices des caspases effectrices de l'apoptose comme les caspases-3 et -7, cIAP2 (544, 560) et la survivine (561), et inhibe de ce fait les étapes tardives de l'apoptose (Figure 18). L'augmentation d'expression de cIAP2 serait attribuée à l'activation du NF- κ B *via* E6 (562). Les effets cytoprotecteurs de NF- κ B sont bien connus, il est ainsi envisageable que des protéines impliquées dans la voie de NF- κ B jouent un rôle dans la cytoprotection médiée par E6.

- E6 favorise l'angiogenèse tumorale en activant l'expression du VEGF (563, 564).

- L'oncoprotéine E6 induit la dégradation de TAp63 β , une isoforme du facteur de transcription p63 qui régule l'expression de gènes impliqués dans l'adhérence cellule/cellule ou cellule/MEC dont les gènes codant les intégrines. Ainsi, E6 inhibe l'établissement de points de contacts focaux et perturbe les interactions cellule/MEC (565). Par ailleurs, E6 induit une désorganisation de la structure cellulaire en se liant à la paxilline et la zyxine, qui assurent respectivement la structuration du cytosquelette d'actine au niveau des points de contacts focaux et la transmission des signaux de la MEC au noyau (566, 567). L'interaction de E6 avec la fibuline-1 pourrait limiter l'adressage de cette

protéine à la membrane plasmique et sa sécrétion dans la MEC et ainsi favoriser la croissance indépendante de l'ancrage (568). L'activation des voies de signalisation en aval de la FAK par l'oncoprotéine E6 active la prolifération cellulaire (569) et cela même en l'absence d'ancrage à la MEC.

Une des spécificités de la protéine E6 des HPV-HR réside dans sa capacité d'interaction avec des protéines présentant un domaine PDZ. Ainsi, l'oncoprotéine E6 lie les protéines *homolog of Drosophila scribble* (hScrib), *homolog of Drosophila disc large* (hDlg), *membrane-associated guanylate kinase homology protein with an inverted domain structure* (MAGI), *multi PDZ protein 1* (MUPP-1), *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3* (PTPN3) et *Pals1-associated tight junction* (PALJ). En conséquence, elle inhibe leur fonction ou induit leur dégradation par le protéasome après ubiquitinylation par E6AP (478, 570). L'inhibition des protéines à domaine PDZ est essentielle aux propriétés transformantes de E6 des HPV-HR (571) (Figure 18).

La protéine E6 contribue à la TEM, une étape clé dans l'activation de l'invasion et des métastases (572). Suite à l'expression continue de l'oncoprotéine E6, les cellules perdent leurs capacités d'adhérence et acquièrent progressivement des propriétés invasives. En diminuant l'expression de la cadhérine-E (573) la protéine E6 des HPV-HR pourrait promouvoir la TEM (574, 575).

Aussi, l'oncoprotéine E6 d'HPV16 induit la migration des cellules du cancer du col de l'utérus qui implique la voie p53-miR-23b et *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) (576). E6 active la dégradation de la MEC en modulant l'expression et/ou l'activité des MMP-2 et -9 et de leurs inhibiteurs (577).

- La protéine E6 active la voie de signalisation de mTOR en prolongeant l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase, ce qui maintient les cellules dans un état d'ignorance concernant leur état énergétique (530). Les auteurs suggèrent que, lors de l'infection virale permissive, ce mécanisme puisse faire en sorte que les enzymes et métabolites cellulaires nécessaires à la synthèse du génome viral soient maintenus dans les cellules épithéliales différenciées même en absence de signaux de croissance.

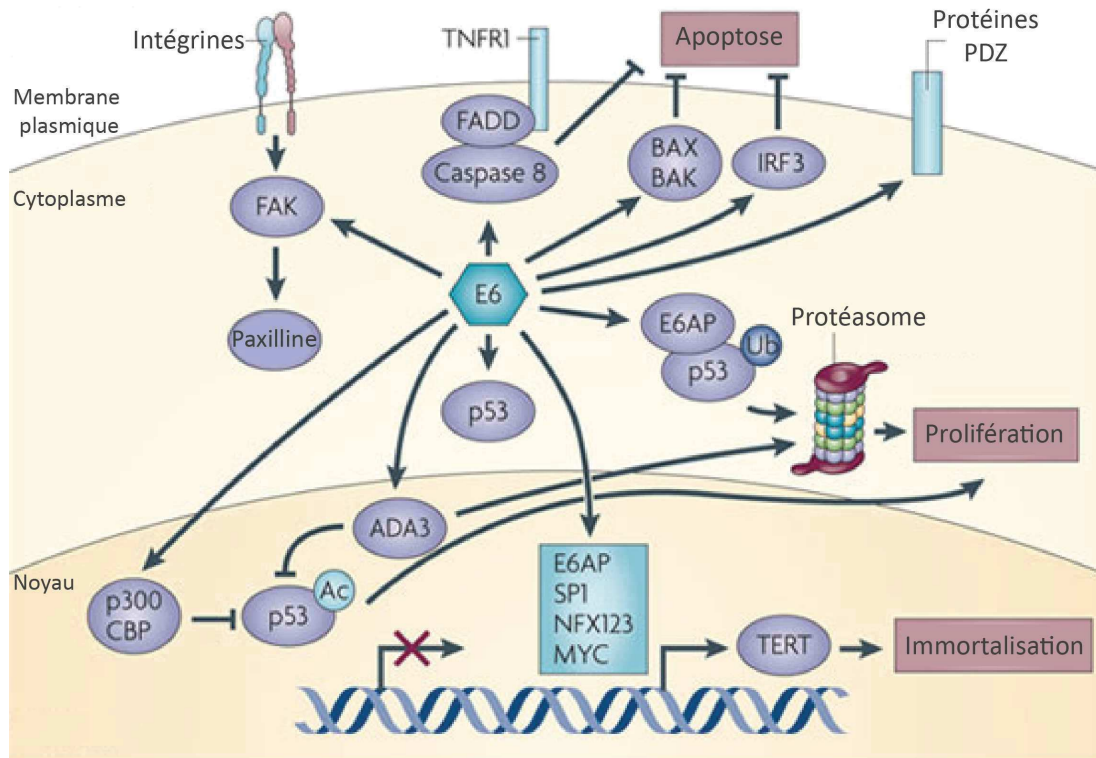


Figure 18 : Principales fonctions de l'oncoprotéine E6 dans la carcinogénèse (d'après (486))

5. Contexte et objectifs du travail de thèse

À l'heure actuelle, une large proportion des recherches vouées à l'identification et au développement de nouvelles thérapies anticancéreuses est basée sur l'apoptose (33-35). Au cours des dernières décennies, divers composés phytochimiques ont été caractérisés comme des agents pharmacologiques susceptibles d'éliminer les cellules cancéreuses *via* l'induction de l'apoptose considérée comme une des meilleures façons de traiter le cancer (36, 578). Parmi ces composés, l'isoliquiritigénine (ILG), un flavonoïde naturellement présent dans les racines de réglisse, possède de nombreuses propriétés thérapeutiques dont une activité antitumorale (579, 580). Dans le cadre d'un projet collaboratif entre l'Université de Franche-Comté et le département de Pharmacochimie du Xinjiang Medical University (Urumqi, Chine), nous avons participé à l'étude de son activité anticancéreuse présumée dans le modèle du cancer du col de l'utérus. Le premier objectif de notre travail a consisté, d'une part à analyser les propriétés antiprolifératives et pro-apoptotiques de l'ILG sur des lignées cellulaires humaines dérivées de cancer du col de l'utérus *in vitro* et, d'autre part à explorer l'influence potentielle de l'ILG sur leurs capacités migratoires et invasives *in vitro*, ainsi que sur la croissance tumorale dans un modèle murin de xénogreffes de cellules de cancer du col de l'utérus.

L'apoptose est définie chez les mammifères comme un processus permettant d'éliminer les cellules indésirables de manière immunologiquement silencieuse *via* leur capture par des cellules compétentes et spécialisées pour la phagocytose (158). Ces phagocytes dits "professionnels" vont ensuite dégrader les cellules apoptotiques internalisées. Si ces éléments définissent un dogme communément admis, des auteurs proposent que ce phénomène de capture de cellules apoptotiques puisse aussi aboutir au transfert horizontal d'ADN de la cellule apoptotique à la cellule l'ayant internalisée (410). Bien que ce ne soit pas leur fonction première, d'autres cellules comme les fibroblastes sont qualifiés de phagocytes "non-professionnels" et peuvent contribuer à ce processus de capture à l'issue controversée (161, 162). Toutefois, les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'internalisation et à la dégradation de cellules apoptotiques par ces cellules non spécialisées n'ont pas encore été clairement identifiés. Des travaux antérieurs du laboratoire ont mis en évidence que des cellules apoptotiques dérivées de cancer du col de l'utérus peuvent être internalisées par des fibroblastes primaires humains (HPFs pour *human primary fibroblasts*) dans un modèle de co-culture *in vitro*. Suite à la co-culture, des séquences d'oncogènes viraux sont détectées dans les fibroblastes receveurs qui acquièrent des propriétés de cellules transformées (421). Un tel transfert d'oncogènes d'HPV illustre parfaitement la définition du THG défini par Lars Holmgren comme le transfert d'ADN entre cellules somatiques *via* l'internalisation de corps apoptotiques (410) et prouve que ce THG est possible à partir de cellules humaines naturellement infectées et transformées par des virus

oncogéniques. Dans ce second volet de notre étude, l'objectif principal de notre travail a consisté en la caractérisation des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'internalisation des cellules apoptotiques issues de cellules tumorales par des HPFs grâce au modèle *in vitro* de co-culture ayant permis la démonstration du THG au laboratoire, mais aussi dans la maturation consécutive des phagosomes. Aussi, des objectifs secondaires ont été établis consistant, d'une part en la confirmation du lien de causalité entre la capture des cellules apoptotiques et le THG/acquisition de propriétés de transformation (croissance en agar mou) et, d'autre part la démonstration de la preuve *in vivo* de la capacité tumorigénique des cellules apoptotiques dérivées du cancer du col de l'utérus.

Deuxième partie : Travaux personnels

1. Exploration des effets anticancéreux potentiels de l'isoliquiritigénine dans le modèle du cancer du col de l'utérus

Responsable de 266 000 décès en 2012, le cancer du col de l'utérus est une des causes majeures de mortalité par cancer dans le monde (461) : les carcinomes épidermoïdes représentent 60 à 70% des cas et les adénocarcinomes 25 à 30% des cas (581). Près de 85% des décès imputables au cancer du col de l'utérus surviennent dans des pays en voie de développement, dans lesquels des programmes de dépistage basés sur la détection d'anomalies cytologiques du col utérin et de vaccination contre les infections aux HPV ne sont pas établis (461). Par ailleurs, les carcinomes du col utérin sont souvent diagnostiqués à un stade trop avancé pour envisager la chirurgie et développent couramment des résistances aux radiations et aux chimiothérapies, tenant ainsi en échec les traitements conventionnels actuels (582) (rapport concernant les traitements du cancer du col de l'utérus dans le cadre de la mise en œuvre du plan cancer 2009-2013 établi par l'Institut National du Cancer et la Ligue contre le cancer). Ces traitements sont lourds et ne sont pas dénués d'effets secondaires indésirables tels que des troubles génito-urinaires, digestifs, cutanés et une fréquente asthénie. L'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques est donc fondamentale pour l'amélioration de la prise en charge et du traitement du cancer du col de l'utérus.

Les flavonoïdes qui constituent une classe de plus de 4000 métabolites secondaires issus de plantes, sont connus pour avoir des effets cytotoxiques et antitumoraux et ont fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières années. Ces composés possèdent de multiples effets anticancéreux dont des propriétés antioxydantes et anti-prolifératives, l'arrêt du cycle cellulaire, la promotion de l'apoptose, la régulation des voies de transduction des signaux, l'inhibition de la migration, de l'invasion et de l'angiogenèse des cellules cancéreuses et la réversion des résistances multiples aux drogues (pour revue (583)). Les chalcones sont des flavonoïdes d'origine naturelle dont une centaine a été répertoriée comme ayant une activité antitumorale. L'isoliquiritigénine, les flavokavaïnes et le xanthohumol sont parmi les chalcones naturelles les plus étudiées et sont largement répandues dans le règne végétal (578). Parmi ces composés, l'isoliquiritigénine (ILG) fait l'objet de notre étude.

Depuis des siècles les racines et les rhizomes de réglisse (*Glycyrrhiza*) sont non seulement utilisés comme édulcorants naturels mais aussi comme des remèdes fréquemment employés en médecine traditionnelle chinoise. Dans les années 1970, l'ILG ou 2',4',4'-trihydroxychalcone a pu être isolée à partir de racines de plantes appartenant à la famille de la réglisse, incluant *Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza inflata* Bat, *Glycyrrhiza glabra* et *Glycyrrhizae Radix* (584) et a été reconnue comme un principe actif majeur de la réglisse, responsable de ses propriétés pharmacologiques anti-

inflammatoires, immunorégulatrices, antivirales, antimicrobiennes, antioxydantes, hépato- et cardio-protectrices (585).

L'action antitumorale de l'ILG suscite l'intérêt du monde scientifique depuis les travaux de Yamamoto et collaborateurs en 1991 (579). Dès lors, de nombreuses études ont mis en évidence l'action de l'ILG, seule ou couplée à d'autres thérapies, sur des cellules cancéreuses *in vitro* ou *in vivo* (580, 585). Malgré certaines variabilités, ces études conduites dans de nombreux modèles de cancer (leucémies, gliomes, myélomes, cancers du poumon, du foie, de la prostate, du côlon, du sein, de l'ovaire et du col de l'utérus) s'accordent sur le fait que l'ILG favorise l'arrêt du cycle cellulaire, entraîne l'apoptose des cellules cancéreuses et possède des propriétés anti-angiogéniques, anti-migratoires et anti-invasives. Ainsi, de par son activité pléiotrope, ce flavonoïde semble un composé prometteur pour l'amélioration des thérapies anticancéreuses (580).

1.1. Publication 1 : Isoliquiritigenin Induces Caspase-Dependent Apoptosis via Downregulation of HPV16 E6 Expression in Cervical Cancer Ca Ski Cells

1.1.1. Résumé de la publication 1

Dans le cadre d'un projet collaboratif entre l'Université de Franche-Comté et le département de Pharmacochimie du Xinjiang Medical University (Urumqi, Chine), nous avons étudié l'activité anti-proliférative de l'ILG sur des lignées cellulaires humaines dérivées de cancer du col de l'utérus *in vitro*. Ainsi, les effets de l'ILG sur les déterminants impliqués dans la balance survie / mort cellulaire, tels que la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire et la mort cellulaire par apoptose, ont été évalués, et ce dans quatre lignées cellulaires dérivées de cancer du col de l'utérus, hétérogènes sur le plan du statut viral, du statut de p53 et du type histologique des lésions cancéreuses dont elles sont issues : Ca Ski (HPV16, p53 sauvage, métastase d'un carcinome épidermoïde), SiHa (HPV16, p53 sauvage, carcinome épidermoïde), HeLa (HPV18, p53 sauvage, adénocarcinome) et C-33A (HPV négative, p53 mutée, carcinome épidermoïde faiblement différencié). Afin d'établir les possibles mécanismes anticancéreux de l'ILG, nous avons évalué dans la lignée cellulaire Ca Ski - représentative du carcinome du col utérin le plus fréquent, le carcinome épidermoïde HPV16 positif - les taux et le statut de clivage des protéines PARP, caspases-9, -8 et -3, mais aussi les taux des protéines p53, CKI p21, des protéines de la famille BCL-2 telles que BID, BAX, BCL-2, BAK, BCL-X_L et des transcrits et des protéines de E6 d'HPV16, qui sont impliquées dans la survie / mort de la cellule et affectent la chimiosensibilité des cellules tumorales aux agents anticancéreux. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à la caractérisation d'événements

mitochondriaux classiquement associés à la voie intrinsèque de l'apoptose tels que la dépolarisation de la membrane mitochondriale et la libération du cytochrome c.

Nos résultats indiquent que l'ILG inhibe la prolifération cellulaire des différentes lignées, induit un arrêt dans la progression du cycle cellulaire, en phase G2/M et dans certain cas en G0/G1, et une fragmentation de l'ADN, et ce de manière dépendante de la concentration et du temps de traitement. La mort par apoptose a été confirmée par des marquages à l'annexine V et à l'iodure de propidium et par l'observation de la condensation de la chromatine après marquage au DAPI. Dans les cellules Ca Ski, l'étude des acteurs moléculaires et des événements cellulaires engagés dans l'apoptose a démontré que l'ILG induit une diminution des taux de protéines p53, p21, de protéines anti-apoptotiques BCL-2, ainsi qu'une augmentation du taux de protéines pro-apoptotiques BAX. L'ILG entraîne aussi une diminution du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\psi_m$), une libération du cytochrome c ainsi qu'un clivage des caspases-9, -8 et -3 aboutissant au clivage de la PARP. De plus, dans les cellules Ca Ski exposées à l'ILG, le blocage de l'activité catalytique des caspases par l'inhibiteur de pan-caspase z-VAD-fmk s'accompagne d'une diminution du pourcentage de cellules présentant de l'ADN fragmenté confirmant ainsi l'implication des caspases dans la mort cellulaire induite par l'ILG. Enfin, la diminution des niveaux de transcrits et protéines E6 d'HPV16 suite au traitement des cellules Ca Ski indique que l'ILG semble réprimer l'expression de cette oncoprotéine virale.

La protéine suppresseur de tumeur p53 détient un rôle crucial dans l'arrêt de la prolifération au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire et dans l'apoptose de cellules humaines et murines lors de stress tels que ceux liés aux dommages à l'ADN (586). La perte de fonction de p53 est liée à un risque accru de carcinogénèse (587, 588). Aussi, p53 est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers (589). Une mutation sur ce gène est détectée dans près d'une tumeur sur deux, s'accompagnant dans la plupart des cas d'une inactivation de la voie de protection cellulaire médiée par la protéine p53. De plus, l'altération de la fonction de p53 réduit la chimiosensibilité des cellules cancéreuses à des agents chimiothérapeutiques (590, 591).

Le développement, la progression des lésions associées à HPV et le maintien du phénotype malin sont liés en partie à l'expression continue de l'oncoprotéine virale E6 qui favorise l'échappement au contrôle de la progression du cycle cellulaire et à l'apoptose *via*, entre autres, sa capacité à lier p53 et d'en induire la dégradation par le protéasome (486, 518). De plus, dans les lignées de carcinome du col de l'utérus HPV positives les voies de régulation cellulaire qui sont ciblées par l'oncoprotéine E6, notamment celles afférentes à l'apoptose sont maintenues à l'état latent mais restent intrinsèquement fonctionnelles, suggérant que la réactivation de la fonction de p53 *via* l'inhibition de

l'expression de E6 est une approche thérapeutique pertinente dans les tumeurs p53 sauvage associées à HPV (592).

Nos résultats suggèrent que p53 est un facteur clé dans l'activité anti-proliférative de l'ILG dans les cellules Ca Ski. L'augmentation des niveaux de p53 induite par l'ILG semble non seulement provoquer un arrêt dans la progression du cycle cellulaire, mais aussi déclencher l'apoptose dépendante des caspases et associée à la voie mitochondriale. Les effets de l'ILG sur l'augmentation du taux protéique de p53 et le déclenchement de l'apoptose qui en résulte pourraient être, au moins en partie, la conséquence de la diminution de l'expression de E6 d'HPV16 dans les cellules Ca Ski exposées à l'ILG ; suggérant ainsi que l'inhibition de l'expression de E6 par l'ILG pourrait participer à une restauration de la sensibilité des cellules Ca Ski à la chimiothérapie.

Dans leur ensemble, les résultats de cette étude démontrent que l'ILG exerce une activité anti-proliférative sur les cellules dérivées de cancer du col de l'utérus Ca Ski, SiHa, HeLa et C-33A en induisant leur mort cellulaire par apoptose. L'ILG pourrait se révéler être un composé phytothérapeutique prometteur dans la lutte contre le cancer du col de l'utérus.

Isoliquiritigenin Induces Caspase-Dependent Apoptosis *via* Downregulation of HPV16 E6 Expression in Cervical Cancer Ca Ski Cells

Authors

Fabienne Hirchaud^{1,2}, François Hermetet^{1,2}, Mouboul Ablise⁴, Sylvie Fauconnet^{1,2,3}, Dominique A. Vuitton^{1,2}, Jean-Luc Prêtet^{1,2,3}, Christiane Mougín^{1,2,3}

Affiliations

¹ Univ. Franche-Comte, Besançon, France
² EA3181, FED4234, LabEx LipSTIC ANR-11-LABX-0021, Besançon, France
³ CHRU Besançon, Besançon, France
⁴ College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China

Key words

- Leguminosae
- *Glycyrrhiza inflata*
- isoliquiritigenin
- apoptosis
- HPV16 E6
- cervix carcinoma

Abstract

Flavonoids have antitumoral properties and may be attractive candidates as anticancer therapy. Isoliquiritigenin which is a constituent of licorice (*Glycyrrhiza inflata*), a plant commonly used in traditional Uyghur medicine in Xinjiang, China, was studied for antiproliferative and apoptotic activity in human cervical cancer cells, Ca Ski, SiHa, HeLa, and C-33A. Its molecular mechanism of action was specifically examined in Ca Ski cells. Isoliquiritigenin decreased cell viability, induced cell accumulation in G2/M and morphological and biochemical features of apoptosis in the four cancer cell lines. In Ca Ski cells, isoliquiritigenin led to

a downregulation of HPV16 E6 expression associated with an increase of p53 and p21 levels, enhanced expression of Bax and decreased expression of Bcl-2 and Bid proform triggering dissipation of the mitochondrial membrane potential, released cytochrome c to the cytosol followed by activation of caspase cascade with cleavage of caspase-9, caspase-3, and PARP. Caspase-8 was also cleaved. Moreover treatment with a pan-caspase inhibitor prevented apoptosis. As Ca Ski cells are representative of carcinoma naturally occurring in the cervix, our results suggest a potential benefit of isoliquiritigenin for cervical cancer prevention and treatment.

received June 27, 2013
 revised August 28, 2013
 accepted Sept. 23, 2013

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1350956>
 Published online November 8, 2013
 Planta Med 2013; 79:
 1628–1635 © Georg Thieme
 Verlag KG Stuttgart · New York ·
 ISSN 0032-0943

Correspondence

Christiane Mougín
 Laboratoire de Biologie
 Cellulaire et Moléculaire
 EA3181-FED4234,
 Centre Hospitalier Régional
 Universitaire J Minjoz
 1 bd A Fleming
 25030 Besançon cedex
 France
 Phone: + 33 3 66 91 11
 Fax: + 33 3 81 66 93 70
 christiane.mougin@
 univ-fcomte.fr

Introduction

Cervix cancer is the third most common cancer among women worldwide [1]. Persistent cervical infection with one of 15 carcinogenic human papillomavirus (HPV) types is responsible for invasive cervical cancer [2], and the HPV16 and 18 cause at least 70% of cervical cancer [3, 4].

Natural products issued from herbal medicine or natural food have been tested for anticancer properties and were successfully introduced as new anticancer agents [5]. In traditional Chinese medicine, flavonoids that are ubiquitous in plants are used to treat many diseases. Among them, isoliquiritigenin (ILG) (○ Fig. 1) is a chalcone derivative isolated from licorice (*Glycyrrhiza inflata* BAT, Leguminosae) and shallots used in Asian, and are especially present in the Uygur traditional medicine, exhibiting a wide variety of biological functions including antioxidant [6], anti-inflammatory [7], antiplatelet [8], antiproliferative [9] and apoptotic effects [10–12].

The antitumor properties of ILG have been shown on several cell lines derived from prostate [13], lung [12, 14], and melanoma [15]. ILG has been re-

ported to inhibit proliferation of other cell lines such as human U87 glioma cells [16], multiple myeloma [17], or uterine leiomyoma cells [18]. ILG can induce a cell cycle arrest at different phases in human U87 glioma cells [16], hepatoma Hep G2 cells [10], colon cancer cells [19], and also cervical carcinoma HeLa cells [20]. From the studies performed on the various cell lines, it appears that ILG can promote apoptosis through a p53-dependent or -independent pathway depending on the cell type [10, 15, 18], and in a caspase-dependent manner [16]. A key regulator in ILG-induced apoptosis seems to be the dissipation of the mitochondrial membrane potential, which triggers cytochrome c release and caspase activation [11, 20, 21].

The ability of ILG to modulate the growth of cervical cancer cells and the mechanisms involved have not yet been characterized in detail. The aim of the present study was thus to test whether the compound was similarly efficient in decreasing cell viability on four cervical cancer-derived cell lines differing by their HPV and p53 status, and to shed light on its molecular mechanism by

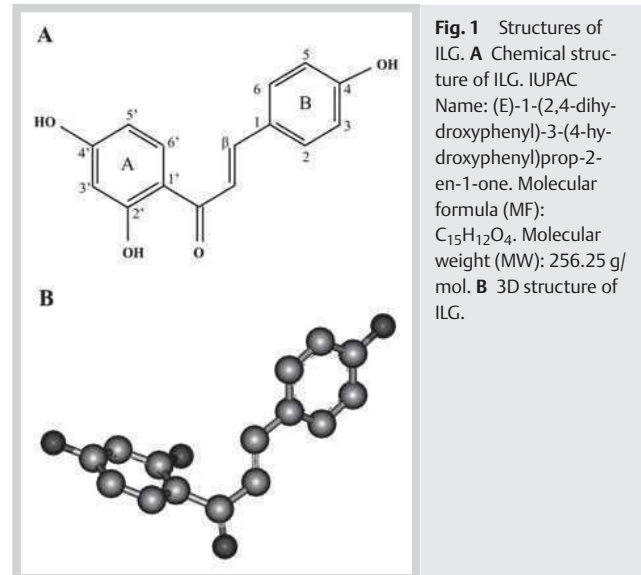
using Ca Ski cells, a cell line representative of the most common cervical cancer carcinomas in the world.

Results

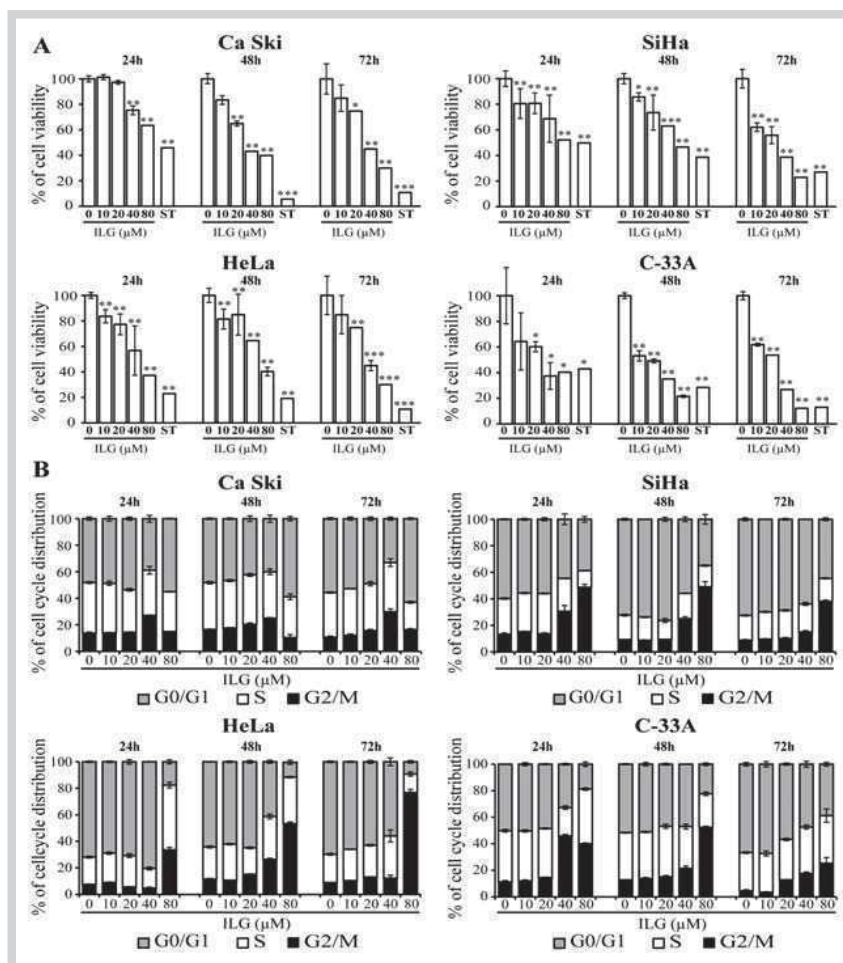
As shown in **Fig. 2A**, ILG displayed cytotoxic effects on the four cell lines. The viability of Ca Ski, SiHa, HeLa, and C-33A cells evaluated with the MTT assay was markedly decreased after exposure to ILG in a dose- and time-dependent manner with an obvious inhibition of cell growth with the highest dose (80 μM) at 48 h or 72 h compared to 24 h post-exposure. IC_{50} values of ILG were 39.09 μM , 53.76 μM , 58.10 μM , and 32.83 μM in inhibiting viability of Ca Ski, SiHa, HeLa, and C-33A, respectively, at 72 h post-exposure.

Cell cycle analysis performed on cells treated with 10 to 80 μM ILG for 24 to 72 h revealed a G2/M phase arrest after treatment with 80 μM ILG for any period tested in SiHa, HeLa, and C-33A cells. This arrest was indicated by decreased proportion of cells in G0/G1 (**Fig. 2B**). In Ca Ski cells, an accumulation of cells in G2/M phase occurred from 24 to 72 h when treated with 40 μM ILG, but there was an accumulation of cells in G0/G1 phase when treated with 80 μM ILG.

ILG induced apoptosis of Ca Ski (HPV16), HeLa (HPV18), and C-33A (HPV-) cells. Treatment with 80 μM ILG for 48 h resulted in changes in nuclear morphology evidenced by DAPI staining. Nuclei of control cells treated with vehicle were round while nuclei



of treated cells exhibited characteristic features of apoptosis-like nuclear pyknosis and karyorrhexis and DNA extrusion through the nuclear envelope (**Fig. 3A**). Apoptosis was also attested by the appearance of a Sub-G1 DNA peak detected by flow cytometry. The percentage of cells with fragmented DNA increased in a



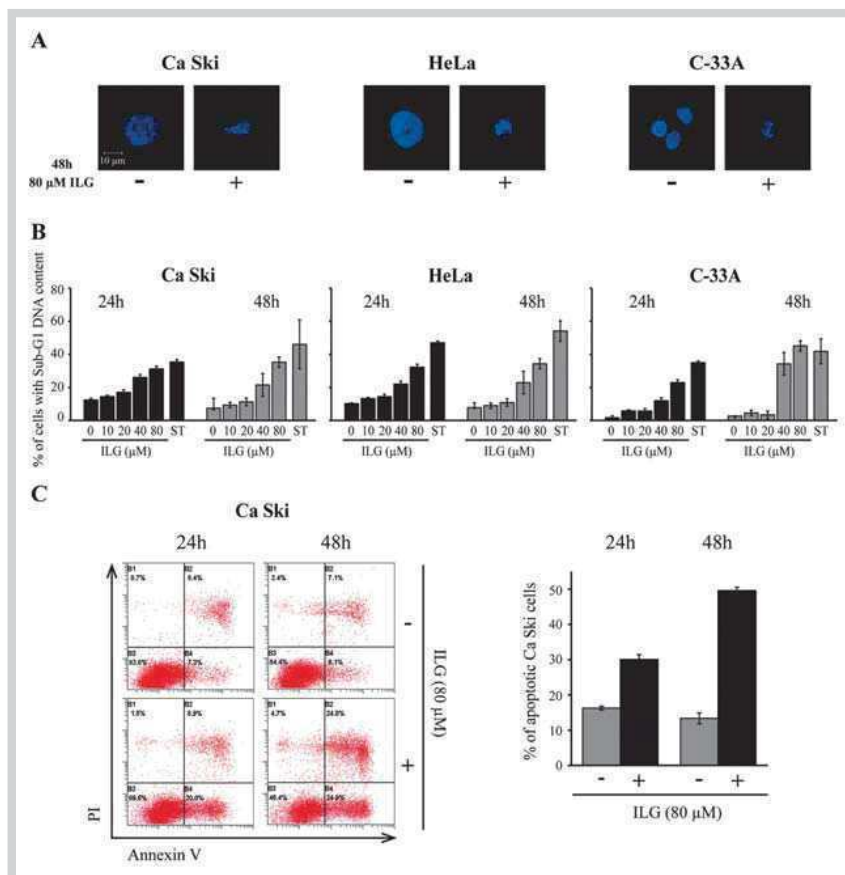


Fig. 3 ILG induces apoptosis of cervical cancer cells. **A** Ca Ski (HPV16), HeLa (HPV18), and C-33A (HPV-) cells were incubated with vehicle or 80 μ M ILG for 48 h. They were stained with DAPI and examined with confocal microscopy. **B** Cells were treated with increasing concentrations of ILG or 300 nM ST for 24 and 48 h. The percentage of cells showing hypodiploid DNA content (sub-G1 peak) was evaluated by flow cytometry after PI staining. Each bar represents the mean \pm SD of six determinations. **C** Ca Ski cells were treated with vehicle or 80 μ M ILG for 24 and 48 h. They were stained with annexin V and PI and analyzed by flow cytometry. The left panel represents scatter plots showing viable (annexin V⁻/PI⁻) (B3), early apoptotic (annexin V⁺/PI⁻) (B4), late apoptotic (annexin V⁺/PI⁺) (B2), and necrotic cells (annexin V⁻/PI⁺) (B1). In the right panel, bar charts show increased proportion of apoptotic Ca Ski cells after ILG exposure. Data represents mean \pm SD of three determinations.

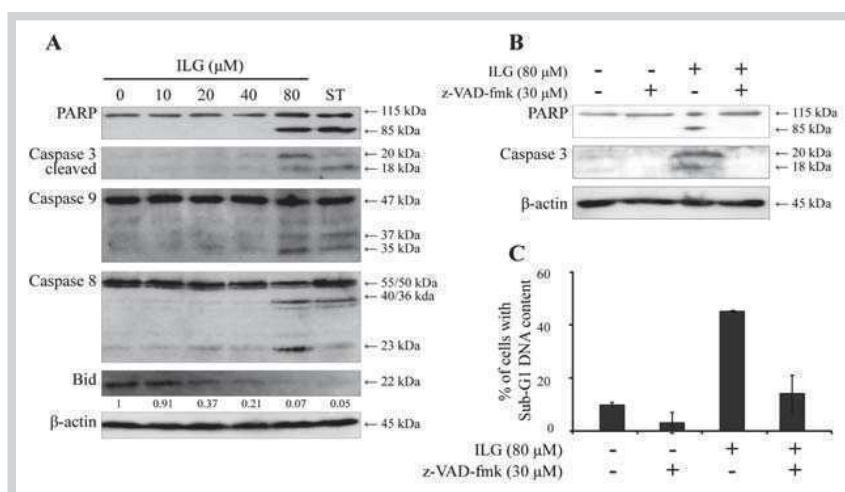


Fig. 4 ILG induces apoptosis of Ca Ski cells in a caspase-dependent manner. **A** Effects of increasing concentrations of ILG or 300 nM ST on cleavage of PARP, caspase-3, caspase-9, and caspase-8 and on the Bid proform in Ca Ski cells treated for 24 h. Actin serves as a loading control. The values below the gel represent the Bid signal intensities after normalization to beta actin. **B** Cells were pretreated with 30 μ M z-VAD-fmk 1 h prior to treatment with 80 μ M ILG for 24 h. Caspase inhibitor z-VAD-fmk suppressed PARP and caspase-3 cleavage. **C** z-VAD-fmk (30 μ M) suppressed apoptosis of cells exposed to 80 μ M ILG for 48 h. Each bar represents mean \pm SD of three determinations. Numbers on the right in **A** and **B** indicate molecular weight in kDa.

concentration- and time-dependent manner. No obvious apoptotic or hypodiploid cells were detected in cells treated with DMSO only (Fig. 3B). Apoptosis was further confirmed by analysis of annexin V/PI-stained cells. As shown in Fig. 3C, exposure to 80 μ M ILG resulted in an increase of apoptotic cells (30% and 50% at 24 and 48 h, respectively), whereas the DMSO-containing vehicle did not affect the viability of cells. ILG stimulated caspase activities in Ca Ski cells. Indeed, 80 μ M ILG induced cleavage of caspase-3 and its downstream substrate PARP in cells incubated for 24 h (Fig. 4A). To investigate whether a mitochondria- or a death receptor-mediated pathway

was responsible for cell death, we evaluated the levels of caspase-9 and caspase-8. As shown in Fig. 4A, 80 μ M ILG induced a cleavage of both caspases. Pretreatment of cells with 30 μ M z-VAD-fmk attenuated PARP and caspase-3 cleavages (Fig. 4B) and decreased the percentage of cells with a Sub-G1 DNA content (Fig. 4C), attesting to the involvement of caspase cascade in ILG-induced apoptosis.

The effect of ILG on the expression of Bcl-2 family proteins and p53 in Ca Ski cells is shown in Fig. 5A and B. When cells were treated with 80 μ M ILG for 24 h, the expression of the apoptotic protein Bax increased while that of Bcl-2 decreased. The ratio of

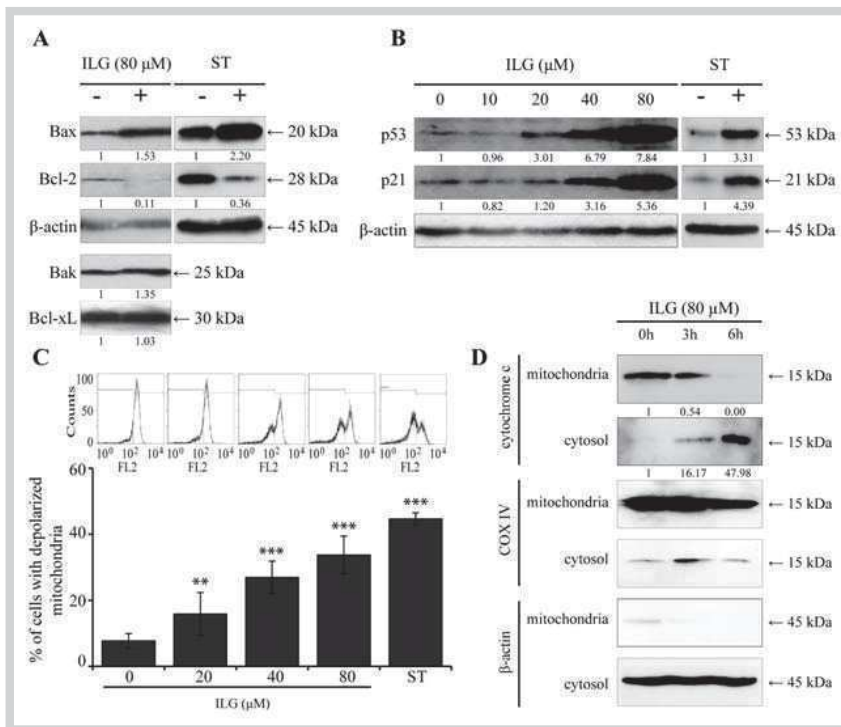


Fig. 5 ILG deregulates expression of Bcl-2 family proteins and induces mitochondrial membrane dissipation in Ca Ski cells. **A** Cells were treated with vehicle, 80 μM ILG or 300 nM ST for 24 h. Bax, Bcl-2, Bak, and Bcl-xL were analyzed using specific antibodies as described in Material and Methods. Actin blotting confirms equal protein loading. **B** Cells were treated with increasing concentrations of ILG or 300 nM ST for 24 h. The levels of p53 and p21 were detected by Western blot. **C** Cells were treated with increasing concentrations of ILG or 300 nM ST for 24 h. They were resuspended in Mitotracker red for analysis by flow cytometry. The upper panel shows representative flow cytometry plots. In the lower panel, the percentage of cells with depolarized mitochondrial membranes is indicated. Data are presented as mean \pm SD of nine determinations. ** $P < 0.01$; *** $p < 0.001$, compared with vehicle. **D** Cells were treated with 80 μM ILG for 3 and 6 h. Mitochondrial and cytosolic fractions were immunoblotted using cytochrome c antibody. Detection of COX IV and actin confirms equal loading and purity of protein fractions. Numbers on the right in **A**, **B**, and **D** indicate molecular weight in kDa. The values below the gels represent protein signal intensities after normalization to beta actin or to COX IV for mitochondrial fractions.

Bax/Bcl-2, which is crucial for the activation of the mitochondrial pathway, thus increased 14-fold in cells under ILG exposure. ILG showed no obvious effect on the pro-apoptotic Bak and the anti-apoptotic Bcl-xL proteins. ILG could also lead to cleavage/activation of Bid as revealed by the decrease of the 22 kDa Bid proform in a concentration-dependent manner, in accordance with caspase-8 activation (● Fig. 4A). The levels of p53 and p21 also increased significantly when cells were treated with increasing doses of ILG for 24 h (● Fig. 5B).

Since the loss of $\Delta\psi\text{m}$ is a characteristic event in the process of the intrinsic death pathway controlled by Bcl-2 family proteins and p53, we examined the effect of ILG on $\Delta\psi\text{m}$ dissipation. The MitoTracker red-CMXRos fluorescence allowed us to identify cells with depolarized mitochondrial membranes. As shown in ● Fig. 5C, the loss of $\Delta\psi\text{m}$ reached 40% when cells were treated for 24 h with 80 μM ILG. An increased amount of cytochrome c in the cytosolic fraction associated with a decreased amount in the mitochondrial fraction of treated cells was observed at early times (● Fig. 5D) confirming the release of cytochrome c from mitochondrial membranes into cytosol.

In HPV16 cervical cancer cells, p53 is targeted for ubiquitination after binding to E6 and E6AP. To determine whether treatment with ILG affected the expression of viral oncoproteins, the expression of HPV16 E6 was assessed by RT-qPCR and Western blot. When cells were treated by 80 μM ILG for 24 h, E6 mRNA and E6 protein expressions were significantly decreased (● Fig. 6). Therefore it is possible to speculate that the downregulation of E6 expression enhances p53 stabilization as shown in ● Fig. 5B.

Discussion

In 2013, it was demonstrated that ILG triggered mitochondrial- and endoplasmic reticulum-stress to induce apoptosis in HeLa cells [21]. Whether ILG was as efficient on other cervical carci-

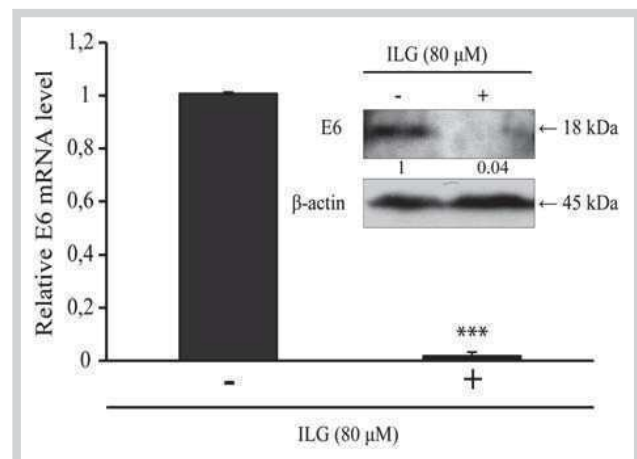


Fig. 6 ILG induces reduction of HPV16 E6 expression in Ca Ski cells. Ca Ski cells were treated with vehicle or 80 μM ILG for 24 h. HPV16 E6 RNA quantification from Ca Ski cells was performed by RT-qPCR as described in Material and Methods. The histogram (mean \pm SD of nine determinations) represents changes in the RNA expression levels of HPV16 E6. *** $P < 0.001$, compared with vehicle. *Inset*: HPV16 E6 protein expression. Actin was used as a protein loading control. Numbers in the right indicate molecular weight in kDa. The values below the gel represent the E6 signal intensities after normalization to beta actin.

ma-derived cells is not well documented. How the inhibition of cell proliferation and/or apoptosis was induced by ILG and especially if ILG could interfere with HPV oncoproteins are unknown. Cervical carcinogenesis, as well as maintenance of the transformed phenotype of the cervix cancer cells, requires the continuous expression of E6 and E7 oncoproteins [22]. It is known that E6 oncoprotein encoded by HPV types 16 and 18 accelerates the proteasomal degradation of p53 [23]. In addition, the HPV16 E6

protein protects cells from apoptosis triggered by tumor necrosis factor R1 and Fas [24, 25]. On the other hand, many experiments have been performed to block the expression of E6 in HPV-positive cancer cells by inhibiting viral oncogene expression [26], using RNA interference targeting E6 [27] or transfecting HPV16 E6/E7 anti-sense RNA [28] that sensitizes cells to senescence or apoptotic signaling. But no information exists about the signaling pathway and the initiation of apoptosis HPV16-expressing cells under ILG exposure. This is the reason why we focused our mechanistic studies on Ca Ski cells. These cells derived from a metastatic epidermoid cervical cancer contain 600 copies per cell of integrated HPV16 [29], an HPV genotype causing over 50% of cervical cancer cases [30], and continuously express HPV E6 protein. We have used staurosporine at 300 nM as a positive control in the majority of the experiments because we largely documented its capability to induce apoptosis in different models of cervical cancer cell lines [31–35]. In the present experiments, ILG markedly decreased the viability of the four cell lines differing by their HPV and p53 status and induced apoptosis of HPV16, HPV18, and HPV negative cells after 48 h, as assessed by the visible disruption in their nuclear morphology and flow cytometry results [36]. Our data highly suggest that the induction of apoptosis in HPV16-positive Ca Ski cells can be mediated by a downregulation of E6 resulting in a significant increase in the level of p53. This protein is transcriptionally active as shown by the increase in the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 that likely contributes to the cell cycle arrest in G2/M or G0/G1 phase depending on the cell type and on the concentration of ILG. In addition, an increased expression of Bax protein as well as a decreased expression of Bcl-2 protein correlate with the ability of p53 to suppress cell growth and to induce intrinsic apoptosis (for review see [37, 38]); p53 transactivates the pro-apoptotic protein Bax [39] and favors its activation and interaction with mitochondria [40], while it transrepresses the anti-apoptotic protein Bcl-2 [41] which acts on mitochondria to prevent MMP [42]. In this study, no change in Bak and Bcl-xL proteins was found although they are both key proteins able to interact with p53 at the mitochondrial level [43, 44] and participate in the regulation of the mitochondrial pathway. Our study presents evidence that this pathway was triggered by the breakdown of the mitochondrial membrane potential. Mitochondria released cytochrome c into cytosol as early as three hours after Ca Ski cell exposure to ILG, followed by caspase-9, caspase-3, and PARP cleavage. These results suggest that a caspase-dependent apoptosis is the major form of cell death occurring in cells after ILG treatment. This suggestion was supported by the findings that z-VAD-fmk, a pan-caspase inhibitor, induced a complete blockade of caspase-3 and PARP cleavage and inhibition of DNA fragmentation.

The release of cytochrome c can also be mediated after translocation of the truncated Bid to mitochondria. The present data revealed a cleavage of caspase-8 and a decrease of the proform Bid in favor of the protein truncation. Thus tBid/Bax may be implicated in the changes of mitochondrial membrane permeabilization. Garnett et al. provided evidence that HPV16 E6 targets caspase-8 for degradation which results in the inactivation of caspase-8 [45]. In view of these data, it is possible that the significant reduction of E6 observed in treated cells permits the stabilization and activation of caspase-8, leading to the cleavage of caspase-8. This suggests a possible contribution of the extrinsic pathway in the ILG-induced apoptosis of Ca Ski cells. In Hep-G2 cells, ILG induces programmed cell death through an upregulation of the Fas/Apo-1 receptor and Fas ligand. Pro-apoptotic proteins, such as

FADD are inactivated by the E6–E6AP complex [25]. In addition, p53 is able to activate Fas via an effect on Golgi transport, through a transcription-independent mechanism [46]. Thus, we may assume that by downregulating HPV16 E6 and subsequently upregulating p53, ILG also engages Ca Ski cells in apoptosis via the death receptor pathway. Further research is essential to confirm this hypothesis.

The two pathways which may execute ILG-induced apoptosis share the activation of effector caspases. Activated caspase-3 cleaves caspase substrates, such as the DNA fragmentation factor (DFF45)/inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) which dissociates from DFF40/CAD. Jong et al. [47] showed that HPV16 E6 interacts with DFF40 which blocks DNA cleavage. It is possible that the downregulation of E6 in ILG-treated Ca Ski cells might have also facilitated the DNA fragmentation that we observed by DAPI and flow cytometry analyses.

How the connections between ILG and HPV16 E6 influence the apoptotic process remains to be established. DNA methylation in cancer has become a topic of intense investigation. A high frequency of HPV16 promoter methylation that may favor the expression of E6 was found in human cervical cancers [43–45, 48–51]. Interestingly, Zorko et al. [52] have shown demethylating effects of ILG on the death-associated protein kinase-1 promoter region of cancer cell lines. Since we recently studied the methylation of HPV16 promoter [51], we attempted to determine whether ILG had the potential to affect this methylation. There was no evidence that ILG exhibited a demethylating activity in treated cells. A natural chalcone library has been screened and evaluated in structure-activity relationships. Among 21 chalcones, ILG was reported to inhibit both NF- κ B and HDAC activity [53]. NF- κ B is constitutively activated in human cancer, including cervical cancer [54, 55]. Xu et al. [56] provided evidence that HPV16 E6 is a regulator of the NF- κ B signaling pathway. It will be interesting to determine the crosstalk between the ILG, E6, and NF- κ B pathways to promote the apoptosis of HPV16 Ca Ski cells. Histone deacetylation is essential to HPV oncoprotein expression during cellular transformation, and HDAC1 as well as HDAC2 are overexpressed in Ca Ski cells and cervical cancers [57]. Again interactions between ILG, E6, and HDAC activity present an intriguing interplay which is tempting to decipher. Thus flavonoids such as ILG might serve as chemical inhibitors of E6 binding to its target proteins in cervical cancer cells in order to prevent and treat HPV-positive cervical cancers.

Materials and Methods

Chemicals

ILG (Fig. 1) was synthesized by M. Ablise (Urumqi, Xinjiang, China) in the Department of Medicinal and Organic Chemistry of Xinjiang Medical University (Urumqi) as previously described [58], and its purification was achieved in the laboratory ITODYS of Paris-7 University (France). Synthetic ILG has the same conformation as the natural ILG isolated from licorice roots of *Glycyrrhiza inflata*. The HPLC purity of ILG was 98%. ILG was dissolved in DMSO to generate an 80 mM stock solution. The stock was diluted to the required concentration before use with the growth medium (the final concentration of DMSO was less than 0.1% of the medium). Staurosporine (ST) was purchased from Sigma with an HPLC purity $\geq 95\%$ and dissolved in DMSO. RPMI 1640, EMEM, fetal bovine serum (FBS), penicillin, and streptomycin were purchased from Lonza. Cell proliferation kit I (MTT assay) was from

Roche; Annexin V-FITC kit from BD Biosciences; MitoTracker red-CMXRos from Fisher; mitochondria/cytosol fractionation kit from BioVision; anti-Bcl-xL, Bcl-2, Bak, Bax, procaspase-9 and cleaved fragments, Bid and COX IV from Cell Signaling; anti-p53, cytochrome c, procaspase-8 and cleaved fragments, procaspase-3 and cleaved fragments, PARP and secondary antibodies from Pharmingen; anti-HPV16 E6 from Euromedex; anti-actin from Sigma and pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk from Sigma.

Cell culture and treatments

The four cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). Ca Ski cells (HPV16, p53^{wt}) were maintained in complete RPMI 1640. SiHa (HPV16, p53^{wt}), HeLa (HPV18, p53^{wt}), and C-33A cells (HPV negative, p53^{mt}) were cultured in complete EMEM. The media were supplemented with 10% FBS, 100 units/mL penicillin and streptomycin. The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. The cells were treated by ILG (10 to 80 μM) for the indicated time periods. The cells were also treated by 300 nM ST serving as a positive control as we previously described [31, 33–35]. Inhibition of apoptosis was performed with z-VAD-fmk at 30 μM added 1 h prior to ILG.

Cell viability assay

Cells were seeded in 96-well plates at a density of 6000 cells/well with 100 μL of complete medium/well 24 h prior to ILG treatment and incubated for 24, 48, and 72 h. Then 10 μL (5 mg/mL) of MTT solution was added to each well. After 4 h, 100 μL of solubilization solution (10% SDS in 0.01 M HCl) were added to each well, and cells were incubated overnight. Absorbance was measured at a wavelength of 570 nm with the reference wavelength of 630 nm using the scanning multiwell spectrofluorimeter EnVision 2012 Multilabel Reader (Perkin Elmer). The relative cell viability is presented as a percentage of cells treated with vehicle.

DAPI staining

Cells were grown on coverslides in 6-well plates at a density of 15×10^4 cells/well and then treated with 80 μM ILG for 48 h. They were washed with phosphate buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde for 5 min. They were washed again with PBS and incubated with 5 μg/mL of DAPI for 5 min. An ultimate wash with PBS was performed. The coverslides were finally examined by fluorescent microscopy using the Olympus Fluoview 1000 (Olympus).

Flow cytometry

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 15×10^4 cells/well 24 h prior to ILG treatment and incubated for different time periods.

For cell cycle and sub-G1 analysis, cells were fixed overnight in ice-cold ethanol 70%. After having been washed, the cells were incubated with PI (10 μg/mL) in PBS supplemented with RNase A DNase-free (1 mg/mL) for 15 min at room temperature. The intracellular PI fluorescence intensities of 20 000 cells were measured in each sample using the flow cytometer FC500 (Beckman Coulter). The analysis of cell cycle distribution was performed on a viable gated cell population using Wincycle software (Phoenix Flox systems).

For the annexin V/IP assay, the cells were stained with annexin V-FITC and PI in darkness for 15 min at room temperature, resuspended with binding buffer and analyzed by flow cytometry with FC500.

For mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) measurement, cells were resuspended in 200 nM MitoTracker red-CMXRos diluted in the appropriate growth medium and incubated at 37 °C for 45 min. Then the cells were washed with PBS, centrifuged and resuspended in PBS for flow cytometry analysis. The percentage of cells with depolarized mitochondrial membranes was determined on the cytometer (Cell Lab Quanta; Beckman Coulter). A minimum of 10 000 events was collected for each sample.

Immunoblotting and antibodies

Proteins from cell lysates were extracted with the radioimmunoprecipitation assay lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% Na deoxycholate, 1 mM EDTA) with a mixture of protease inhibitors (30 μg/mL) (Roche). Proteins from cytosol and mitochondrial fractions were obtained using the mitochondria/cytosol fractionation kit as we described previously [35]. The protein concentrations were determined using the BioRad protein assay. Sixty μg of total proteins and 20 μg of subcellular fraction proteins were separated by 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Hybond TM-P membrane) (GE Healthcare). After transfer, the membranes were incubated for 60 min with appropriate primary antibodies and further incubated for 1 h with appropriate secondary antibodies conjugated to horseradish-peroxidase. Specific protein bands were revealed by the enhanced chemiluminescence (ECL Plus reagent) system (GE Healthcare). Densitometric analysis was performed with the software Image J.

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from Ca Ski cells according to the manufacturer's instructions using the QIamp RNA blood mini kit (Qiagen). Contaminating genomic DNA was removed with a DNase I RNase-free treatment (Invitrogen). Five hundred ng of RNA were reverse transcribed with 200 units MMLV-reverse transcriptase (Invitrogen). The real-time PCR was performed as we previously described [59] and was carried out with a 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems) and Taqman technology on 20 μL of a reaction mixture containing 1 x gene expression master mix (Applied Biosystems), 5 μL of cDNA diluted 1:20, 250 nM of HPV16 E6 (5'BHQ1-CAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTT-FAM-3') or 100 nM of β -2-microglobulin (B2M) (5'BHQ1-CCTCCATGATGCTGCTTACATGTCTCGATCCC-FAM-3') Taqman probes (Eurogentec), and 500 nM of each primer for E6 (forward primer: 5'-GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC-3'; reverse primer: 5'-TGTATAGTTGTTGCAGCTCTGTGC-3') and B2M (forward primer: 5'-GATGAGTATGCCTGCCGTGTG-3'; reverse primer: 5'-CAATCAAATGCGGCATCT-3') (Eurogentec). After an initial denaturation at 95 °C for 10 min, 40 amplification cycles were performed (95 °C for 15 sec, 60 °C for 1 min). The relative HPV16 E6 mRNA expression level was calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Statistical analysis

Data were expressed as means \pm SD of at least six measurements (corresponding to experiments performed independently at least two times in triplicate). P values were analyzed using the Wilcoxon test. Statistical analysis was done using SPSS statistical software. Significant differences between the vehicle and treated groups are indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Acknowledgements

This work was financially supported by grants from the Ligue Contre le Cancer (CCIR-GE) and funds from the Région de Franche-Comté and LabEx LipSTIC. F. Hirchaud received fellowships from the Université de Franche-Comté, Cancéropôle Grand-Est, and INTER UNEC. This work was also partly supported by the National Natural Science Foundation of China (81260379). We would like to thank E. Jacquin, A. Pechery, and A. Morel for helping us in RT-qPCR, Western blot, and statistical analyses, respectively, and S. Launay, J. Durel, and V. Mougey for technical support. We are grateful to all members of our laboratory and particularly I. Lascombe for their comments and cooperation. We thank Alexey Zykin for English language editing.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- 1 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893–2917
- 2 Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518–527
- 3 Garland SM. Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. *Pathology* 2002; 34: 213–224
- 4 Prétet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Charlot JF, Bouhour D, Kantelip B, Soubeyrand B, Leocmach Y, Mougín C, Riethmüller D. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. *Int J Cancer* 2008; 122: 428–432
- 5 Da Rocha AB, Lopes RM, Schwartzmann G. Natural products in anti-cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 364–369
- 6 Vaya J, Belinky PA, Aviram M. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 302–313
- 7 Chan SC, Chang YS, Wang JP, Chen SC, Kuo SC. Three new flavonoids and anti-allergic, anti-inflammatory constituents from the heartwood of *Dalbergia odorifera*. *Planta Med* 1998; 64: 153–158
- 8 Tawata M, Aida K, Noguchi T, Ozaki Y, Kume S, Sasaki H, Chin M, Onaya T. Anti-platelet action of isoliquiritigenin, an aldose reductase inhibitor in licorice. *Eur J Pharmacol* 1992; 212: 87–92
- 9 Maggolini M, Statti G, Vivacqua A, Gabriele S, Rago V, Loizzo M, Menichini F, Amdò S. Estrogenic and antiproliferative activities of isoliquiritigenin in MCF7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 82: 315–322
- 10 Hsu YL, Kuo PL, Lin CC. Isoliquiritigenin induces apoptosis and cell cycle arrest through p53-dependent pathway in Hep G2 cells. *Life Sci* 2005; 77: 279–292
- 11 Jung JI, Lim SS, Choi HJ, Cho HJ, Shin HK, Kim EJ, Chung WY, Park KK, Park JHY. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem* 2006; 17: 689–696
- 12 Hsu YL, Kuo PL, Chiang LC, Lin CC. Isoliquiritigenin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31: 414–418
- 13 Kwon GT, Cho HJ, Chung WY, Park KK, Moon A, Park JHY. Isoliquiritigenin inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased JNK/AP-1 signaling. *J Nutr Biochem* 2009; 20: 663–676
- 14 Ii T, Satomi Y, Katoh D, Shimada J, Baba M, Okuyama T, Nishino H, Kitamura N. Induction of cell cycle arrest and p21(CIP1/WAF1) expression in human lung cancer cells by isoliquiritigenin. *Cancer Lett* 2004; 207: 27–35
- 15 Iwashita K, Kobori M, Yamaki K, Tsushida T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64: 1813–1820
- 16 Zhou GS, Song LJ, Yang B. Isoliquiritigenin inhibits proliferation and induces apoptosis of U87 human glioma cells *in vitro*. *Mol Med Rep* 2013; 7: 531–536
- 17 Chen X, Wu Y, Jiang Y, Zhou Y, Wang Y, Yao Y, Yi C, Gou L, Yang J. Isoliquiritigenin inhibits the growth of multiple myeloma via blocking IL-6 signaling. *J Mol Med* 2012; 90: 1311–1319
- 18 Kim D, Ramachandran S, Baek S, Kwon SH, Kwon KY, Cha SD, Bae I, Cho CH. Induction of growth inhibition and apoptosis in human uterine leiomyoma cells by isoliquiritigenin. *Reprod Sci* 2008; 15: 552–558
- 19 Auyeung KKW, Ko JKS. Novel herbal flavonoids promote apoptosis but differentially induce cell cycle arrest in human colon cancer cell. *Invest New Drugs* 2010; 28: 1–13
- 20 Hsu YL, Chia CC, Chen PJ, Huang SE, Huang SC, Kuo PL. Shallot and licorice constituent isoliquiritigenin arrests cell cycle progression and induces apoptosis through the induction of ATM/p53 and initiation of the mitochondrial system in human cervical carcinoma HeLa cells. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: 826–835
- 21 Yuan X, Zhang B, Gan L, Wang ZH, Yu BC, Liu LL, Zheng QS, Wang ZP. Involvement of the mitochondrion-dependent and the endoplasmic reticulum stress-signaling pathways in isoliquiritigenin-induced apoptosis of HeLa cell. *Biomed Environ Sci* 2013; 26: 268–276
- 22 Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342–350
- 23 Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993; 75: 495–505
- 24 Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 21 730–21 739
- 25 Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 25 729–25 744
- 26 Goodwin EC, DiMaio D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 12 513–12 518
- 27 Vogt M, Butz K, Dymalla S, Semzow J, Hoppe-Seyler F. Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. *Oncogene* 2006; 25: 4009–4015
- 28 Hamada K, Sakaue M, Alemany R, Zhang WW, Horio Y, Roth JA, Mitchell MF. Adenovirus-mediated transfer of HPV 16 E6/E7 antisense RNA to human cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 1996; 63: 219–227
- 29 Pattillo RA, Hussa RO, Story MT, Ruckert AC, Shalaby MR, Mattingly RF. Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science* 1977; 196: 1456–1458
- 30 Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12–19
- 31 Bernard B, Fest T, Prétet JL, Mougín C. Staurosporine-induced apoptosis of HPV positive and negative human cervical cancer cells from different points in the cell cycle. *Cell Death Differ* 2001; 8: 234–244
- 32 Bernard B, Prétet JL, Charlot JF, Mougín C. Human papillomaviruses type 16+ and 18+ cervical carcinoma cells are sensitive to staurosporine-mediated apoptosis. *Biol Cell* 2003; 95: 17–26
- 33 Charlot JF, Prétet JL, Haughey C, Mougín C. Mitochondrial translocation of p53 and mitochondrial membrane potential (Delta Psi m) dissipation are early events in staurosporine-induced apoptosis of wild type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis* 2004; 9: 333–343
- 34 Charlot JF, Nicolier M, Prétet JL, Mougín C. Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin-alpha on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis* 2006; 11: 813–827
- 35 Nicolier M, Decrion-Barthod AZ, Launay S, Prétet JL, Mougín C. Spatiotemporal activation of caspase-dependent and -independent pathways in staurosporine-induced apoptosis of p53 wt and p53 mt human cervical carcinoma cells. *Biol Cell* 2009; 101: 455–467
- 36 Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovskiy B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2005; 12 (Suppl. 2): 1463–1467

- 37 Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25: 4798–4811
- 38 Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87: 99–163
- 39 Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 594–604
- 40 Ohtsuka T, Ryu H, Minamishima YA, Macip S, Sagara J, Nakayama KI, Aaronson SA, Lee SW. ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 121–128
- 41 Wu Y, Mehew JW, Heckman CA, Arcinas M, Boxer LM. Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 2001; 20: 240–251
- 42 Tomita Y, Marchenko N, Erster S, Nemajero A, Dehner A, Klein C, Pan H, Kessler H, Pancoska P, Moll UM. WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem* 2006; 281: 8600–8606
- 43 Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 443–450
- 44 Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 2003; 11: 577–590
- 45 Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 2006; 13: 1915–1926
- 46 Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 1998; 282: 290–293
- 47 Jong JE, Jeong KW, Shin H, Hwang LR, Lee D, Seo T. Human papillomavirus type 16 E6 protein inhibits DNA fragmentation via interaction with DNA fragmentation factor 40. *Cancer Lett* 2012; 324: 109–117
- 48 Kalantari M, Calleja-Macias IE, Tewari D, Hagmar B, Lie K, Barrera-Saldana HA, Wiley DJ, Bernard HU. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol* 2004; 78: 12762–12772
- 49 Bhattacharjee B, Sengupta S. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology* 2006; 354: 280–285
- 50 Ding DC, Chiang MH, Lai HC, Hsiung CA, Hsieh CY, Chu TY. Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 147: 215–220
- 51 Jacquin E, Baraquin A, Ramanah R, Carcopino X, Morel A, Valmary-Degano S, Bravo I, de Sanjose S, Riethmuller D, Mouglin C, Prétet JL. Methylation of human papillomavirus type 16 E2BS#1, E2BS#2 and Sp1 binding site CpGs in cervical cancer samples determined by high resolution melting PCR. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 3207–3215
- 52 Zorko BA, Pérez LB, De Blanco EJC. Effects of ILTG on DAPK1 promoter methylation in colon and leukemia cancer cell lines. *Anticancer Res* 2010; 30: 3945–3950
- 53 Orlikova B, Schnekenburger M, Zloh M, Golais F, Diederich M, Tasdemir D. Natural chalcones as dual inhibitors of HDACs and NF- κ B. *Oncol Rep* 2012; 28: 797–805
- 54 Nair A, Venkatraman M, Maliekal TT, Nair B, Karunakaran D. NF- κ B is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Oncogene* 2003; 22: 50–58
- 55 Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, Benedetto A, Bonifacio D, Di Bonito P, Paba P, Accardi L, Mariani L, Ruutu M, Syrjänen S, Favalli C, Syrjänen K. Upregulation of telomerase (hTERT) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus, virus persistence, or disease outcome in cervical cancer. *Diagn Cytopathol* 2006; 34: 739–748
- 56 Xu M, Katzenellenbogen RA, Grandori C, Galloway DA. NFX1 plays a role in human papillomavirus type 16 E6 activation of NF κ B activity. *J Virol* 2010; 84: 11461–11469
- 57 Lin Z, Bazzaro M, Wang MC, Chan KC, Peng S, Roden RBS. Combination of proteasome and HDAC inhibitors for uterine cervical cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 570–577
- 58 Hong-zhi L, Mamat A, Ablise M, Niyaz U, Turdi R. Synthesis and characterisation of isoliquiritigenin derivatives. *Chin J New Drugs* 2009; 19: 1882–1886
- 59 Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, Kantelip B, Schwarz E, Mouglin C, Prétet JL. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3678–3685

1.2. Travaux complémentaires : Effets de l'isoliquiritigénine sur certains phénotypes de cellules du cancer du col de l'utérus associés à l'invasion et à la dissémination métastatique

Si les effets anti-prolifératifs et de promotion de l'apoptose de l'ILG dans les lignées cellulaires de nombreux cancers sont relativement bien documentés, peu d'auteurs ont exploré l'influence potentielle de l'ILG sur les capacités migratoires et invasives de cellules cancéreuses bien que ces phénomènes soient des prérequis à la formation de métastases tumorales (593). Les données disponibles, présentées brièvement ci-dessous, se limitent au modèle du cancer du sein et dans une moindre mesure aux modèles de carcinome rénal et prostatique.

À partir de travaux menés sur les cellules MDA-MB231, deux études suggèrent que l'ILG peut avoir un potentiel thérapeutique dans le traitement des carcinomes mammaires agressifs *via* l'inhibition des voies de signalisation p38 MAPK, PI3K/AKT et NF- κ B, induisant entre autres l'inhibition de la migration, de l'invasion cellulaire et de l'expression et de la sécrétion de MMP-2 et -9 (594, 595). De plus, l'ILG semble inhiber le développement de métastases pulmonaires dans un modèle expérimental d'injection de cellules MDA-MB231 dans la veine de la queue de souris *nude* (595). Concernant d'autres types de cancer, l'ILG supprime les métastases pulmonaires issues de carcinomes rénaux murins et la migration, l'invasion et l'adhérence des cellules humaines DU-145 dérivées de cancer de la prostate (596, 597). Les mécanismes par lesquels l'ILG inhibe les capacités invasives et migratoires des cellules DU-145 semblent impliquer la voie de signalisation *c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)/ activator protein (AP)-1*. Ces effets sont associés à une diminution de la sécrétion de *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) induite par l'*epidermal growth factor* (EGF), de MMP-9, de TIMP-1 ainsi qu'à une augmentation de la sécrétion de TIMP-2 (597).

1.2.1. Objectif

L'objectif de nos travaux dans le modèle du cancer du col de l'utérus était de déterminer si, en complément de ses rôles anti-prolifératif et pro-apoptotique, l'ILG pouvait participer à l'inhibition du potentiel invasif des cellules cancéreuses et donc présenter un intérêt clinique renforcé. Dans ce contexte, l'effet de l'ILG sur la motilité cellulaire ainsi que sur l'activité, l'expression et/ou la sécrétion de MMP-2 et -9 a été étudié dans la lignée Ca Ski. Afin de s'affranchir des biais liés à la cytotoxicité de l'ILG, des doses définies dans la publication 1 comme n'affectant ni la prolifération ni la viabilité des cellules Ca Ski à 24h de traitement, *i.e.* 10 et 20 μ M, ont été utilisées.

1.2.2. Matériel et méthodes

1.2.2.1. Test de migration dit de "blessure-cicatrisation"

Les cellules Ca Ski ont étéensemencées en plaque 6 puits à raison de 4.10^5 cellules par puits dans du milieu complet. Le lendemain, une blessure a été réalisée sur le tapis cellulaire confluent à l'aide d'un cône stérile et les cellules ont été traitées avec 0, 10 ou 20 μM d'ILG diluée dans du milieu complet. Les blessures ont été photographiées aux temps t_0 , t_{8h} et t_{24h} en utilisant le microscope inversé Olympus BX51 Upright Microscope (Olympus, Tokyo, Japon). L'aire des blessures a été calculée à l'aide du logiciel ImageJ. Les ratios correspondant à l'aire de la blessure au temps t_0 sur l'aire des blessures aux temps t_{8h} ou t_{24h} ont été calculés et les résultats ont été présentés sous forme de pourcentage de recouvrement de la blessure à 8h et 24h. Ce pourcentage de recouvrement de la blessure est corrélé à la capacité de migration des cellules (598).

1.2.2.2. Obtention de milieux conditionnés et zymographie

Les cellules Ca Ski ont étéensemencées en plaque 6 puits à raison de $1,5.10^5$ cellules par puits et traitées avec 0, 10 ou 20 μM d'ILG diluée dans 300 μL de milieu complet dépourvu de sérum. Après 24h de culture, les milieux conditionnés ont été récupérés et centrifugés (5 min, 260 g) pour éliminer les débris cellulaires éventuels. La zymographie en gel de gélatine est une technique d'électrophorèse qui permet de mettre en évidence l'activité gélatinolytique des MMP en incorporant le substrat des gélatinases dans le gel de séparation avant sa polymérisation (599). Les différents milieux conditionnés, dilués dans du tampon de charge non dénaturant [Tris-HCl 150 mM pH 6,8, glycérol 20% (v/v), SDS 4% (p/v), bleu de bromophénol 0,05% (p/v)], ont été soumis à une électrophorèse (20 mA/gel) en gel de polyacrylamide 10% SDS 0,1% (p/v) contenant de la gélatine 0,1% (p/v) (Sigma Aldrich). Après la migration, le gel a été lavé deux fois 15 min dans une solution Triton X-100 à 2,5% (v/v), incubé 24h à 37°C dans le tampon [Tris-HCl 50 mM pH 8,0, CaCl_2 150 mM et ZnCl_2 5 μM], coloré dans une solution contenant 0,25% (p/v) de bleu de Coomassie, puis décoloré dans une solution contenant de l'acide acétique 5% (v/v), du méthanol 10% (v/v), jusqu'à l'apparition de bandes blanches correspondant aux zones de dégradation de la gélatine par les gélatinases. L'intensité de la dégradation est corrélée à la surface de la plage de lyse et est proportionnelle à la quantité et/ou à l'activité gélatinolytique des protéinases présentes dans les milieux conditionnés. La masse moléculaire des protéinases a été évaluée par comparaison avec un marqueur de taille, ce qui a permis leur identification.

1.2.3. Résultats

L'invasion est la résultante de deux phénomènes principaux, la capacité à dégrader la matrice extracellulaire et la migration cellulaire ; chacune de ces deux propriétés a été étudiée à partir de cellules Ca Ski exposées à l'ILG. L'analyse des tests de blessure-cicatrisation, que nous maîtrisons grâce à nos travaux de Master 2 Recherche publiés en 2012 (600) (cf. Annexes, Publication 3), a montré que la migration de la lignée cellulaire Ca Ski est inhibée de manière dose-dépendante en présence d'ILG comparativement aux cellules non-traitées (Figure 19A). En effet, le pourcentage moyen de recouvrement de l'aire de la blessure initiale est de 13,64% ± 3,30 et 8,65% ± 3,72 à 8h et de 69,83% ± 1,45 et 52,74% ± 6,97 à 24h pour les cellules traitées avec 10 et 20 µM d'ILG respectivement, tandis que ce pourcentage est de 25,73% ± 3,16 à 8h et de 98,36% ± 1,01 à 24h pour les cellules non-traitées (Figure 19B). Ainsi, l'ILG inhibe la migration cellulaire de la lignée métastatique de carcinome du col de l'utérus Ca Ski.

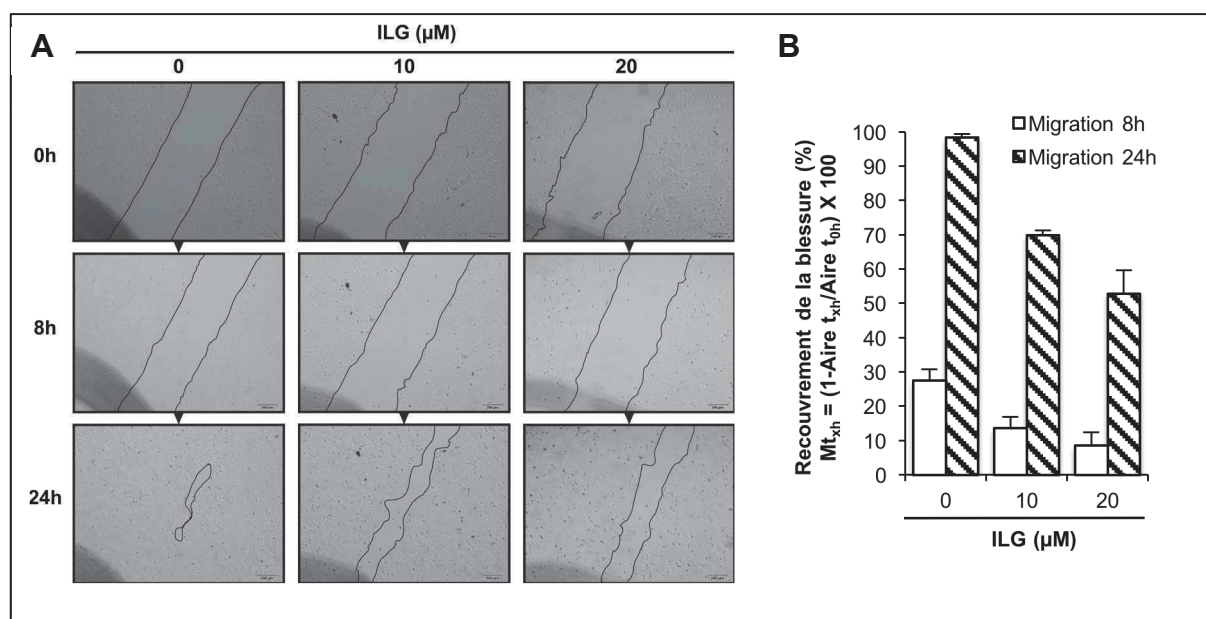


Figure 19 : L'effet inhibiteur de l'ILG sur la migration des cellules du cancer du col de l'utérus Ca Ski

Les cellules Ca Ski ont été traitées avec 0, 10 ou 20 µM d'ILG et l'aire des blessures a été mesurée à 0, 8 et 24h de traitement à raison de 4 champs par puits. **(A)** Microphotographies des blessures à 0, 8 et 24h de traitement. **(B)** Chaque histogramme représente la moyenne ± SD du pourcentage de recouvrement de la blessure initiale à 8 et 24h de traitement. Les images et les données sont représentatives de deux expériences indépendantes réalisées en quadruplicat.

Compte tenu du rôle majeur des MMP de type gélatinase MMP-2 et -9 dans le phénomène d'invasion tumorale (601), l'action de l'ILG sur leur activité, leur expression et/ou leur sécrétion par la lignée cellulaire Ca Ski a été analysée par zymographie en gel gélatine. Basée sur l'activité gélatinolytique des MMP, cette technique a permis l'identification de MMP-2 et -9 dans les milieux

conditionnés des cellules traitées ou non par 10 ou 20 μM d'ILG. En effet, le zymogramme obtenu à partir des milieux conditionnés des cellules Ca Ski a révélé 3 plages de lyse qui, d'après leurs poids moléculaires, correspondent à l'activité des formes zymogènes de MMP-9, MMP-2 et de la forme active de MMP-2 bien que cette dernière soit difficilement identifiable. La taille de ces plages de lyse diminue dans les pistes correspondant aux milieux conditionnés des cellules traitées par l'ILG comparativement aux cellules non traitées et ce, de manière dose-dépendante (Figure 20). Cette diminution rend compte de l'action inhibitrice de l'ILG sur l'activité gélatinolytique, l'expression et/ou la sécrétion des MMP-2 et -9 dans la lignée cellulaire Ca Ski.

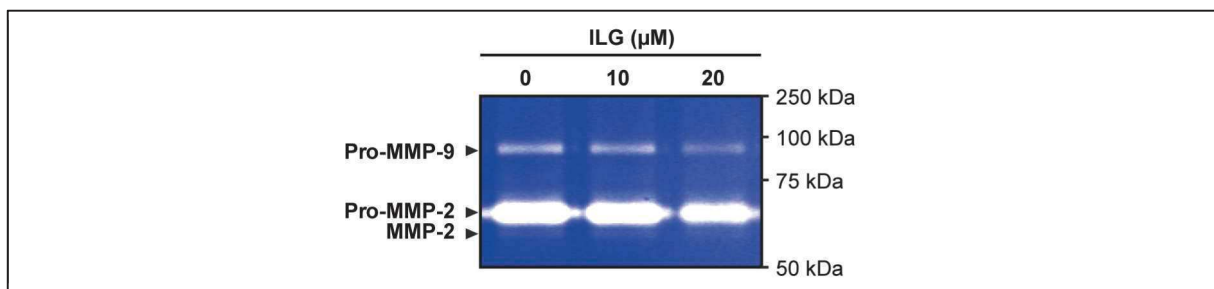


Figure 20 : L'effet inhibiteur de l'ILG sur l'activité gélatinolytique, l'expression et/ou la sécrétion de MMP-2 et -9 des cellules du cancer du col de l'utérus Ca Ski

Zymogramme illustrant l'activité gélatinolytique des MMP-2 et -9 contenues dans les milieux conditionnés de cellules Ca Ski traitées par 0, 10 ou 20 μM d'ILG. L'image présentée est représentative de deux expériences.

1.2.4. Conclusion

Ces données préliminaires démontrent pour la première fois que l'ILG inhibe la migration de cellules dérivées de cancer du col de l'utérus ainsi que l'activité, l'expression et/ou la sécrétion de MMP-2 et -9. Combinés, ces effets pourraient être en faveur d'une action anti-invasive. La potentielle action anti-invasive de l'ILG s'ajoute à ses propriétés anti-prolifératives et pro-apoptotiques et renforce ainsi son intérêt thérapeutique.

1.3. Travaux complémentaires : Effets de l'ILG dans un modèle murin de xénogreffes de cellules tumorales de cancer du col de l'utérus

1.3.1. Objectif

Afin d'explorer le potentiel thérapeutique de l'ILG dans le modèle du cancer du col de l'utérus *in vivo*, une étude préliminaire de xénogreffes de cellules HeLa et Ca Ski en sous-cutané a été initiée dans un modèle murin *nude*. Ce type d'étude n'ayant jamais été réalisé à partir de lignées cellulaires du cancer du col de l'utérus, le choix des doses (50, 200 et 600 µg/kg/injection), de la fréquence (5 injections par semaine pendant 6 semaines consécutives) et du type d'administration (injection intra-péritonéale) du traitement ont été faits d'après les travaux de Chen et collaborateurs. En effet, cette étude a préalablement démontré que l'injection intra-péritonéale d'ILG (100 et 200 µg/kg) inhibe de manière significative la croissance tumorale dans des modèles murins de xénogreffes de cellules de myélomes multiples humaines (U266) ou murines (MPC-11) (602).

1.3.2. Matériel et méthodes

1.3.2.1. Modèle animal : xénogreffes de cellules tumorales et traitement à l'isoliquiritigénine

Les souris Swiss *nu/nu* (Charles-River, L'arbresle, France) ont été maintenues et manipulées dans l'animalerie de l'UMR1098 INSERM (numéro d'agrément #C25-056-7). Les procédures expérimentales ont reçu l'approbation des Services Vétérinaires de la Santé et de la Protection Animale et d'un comité d'éthique local. Les cellules HeLa (6.10^6) et Ca Ski (4.10^6) diluées en matrigel (Matrigel® Matrix, Corning, Dutscher, Brumath, France) ont été injectées respectivement en sous-cutané dans les flancs droit et gauche de 12 souris âgées de 6 semaines. Quatre semaines après les xénogreffes de cellules HeLa et Ca Ski, des tumeurs palpables et comprises respectivement entre 0,01 et 0,05 cm³ et entre 0,02 et 0,15 cm³ ont été observées. Les souris ont été réparties en 4 groupes de 3 de façon à homogénéiser la taille de tumeurs au sein des groupes. Les traitements ont été effectués par injection intra-péritonéale d'ILG (50, 200 ou 600 µg/kg) pour les groupes traités ou de solvant (PBS DMSO 5%) pour le groupe témoin, à raison de 5 injections par semaine pendant 6 semaines consécutives. Les dimensions des tumeurs ont été mesurées deux fois par semaine avec un pied à coulisse et les volumes tumoraux calculés en utilisant la formule : volume tumoral (cm³) = 0,5 x longueur x largeur². Six semaines après le début des traitements, les souris ont été photographiées, sacrifiées et les tumeurs ont été prélevées, congelées à l'azote liquide et conservées à -80°C.

1.3.3. Résultats

Après 6 semaines de traitement, les volumes des tumeurs au sein d'un même groupe de souris étaient très hétérogènes. Aucune inhibition de croissance tumorale n'a été observée chez les souris traitées avec de l'ILG comparativement aux souris témoins et ce, quel que soit le type de cellules tumorales injectées (Figure 21). Les volumes moyens des tumeurs dans le groupe témoin sans traitement était de $0,17 \pm 0,1 \text{ cm}^3$ et $0,41 \pm 0,15 \text{ cm}^3$ pour les xénogreffes de cellules HeLa et Ca Ski respectivement, tandis que dans les groupes traitées avec l'ILG ils étaient de : (i) $0,21 \pm 0,2 \text{ cm}^3$ et $1,42 \pm 0,83 \text{ cm}^3$ (ILG $50 \mu\text{g}/\text{kg}$), (ii) $0,16 \pm 0,04 \text{ cm}^3$ et $0,53 \pm 0,09 \text{ cm}^3$ (ILG $200 \mu\text{g}/\text{kg}$) et (iii) $0,15 \pm 0,03 \text{ cm}^3$ et $0,59 \pm 0,29 \text{ cm}^3$ (ILG $600 \mu\text{g}/\text{kg}$).

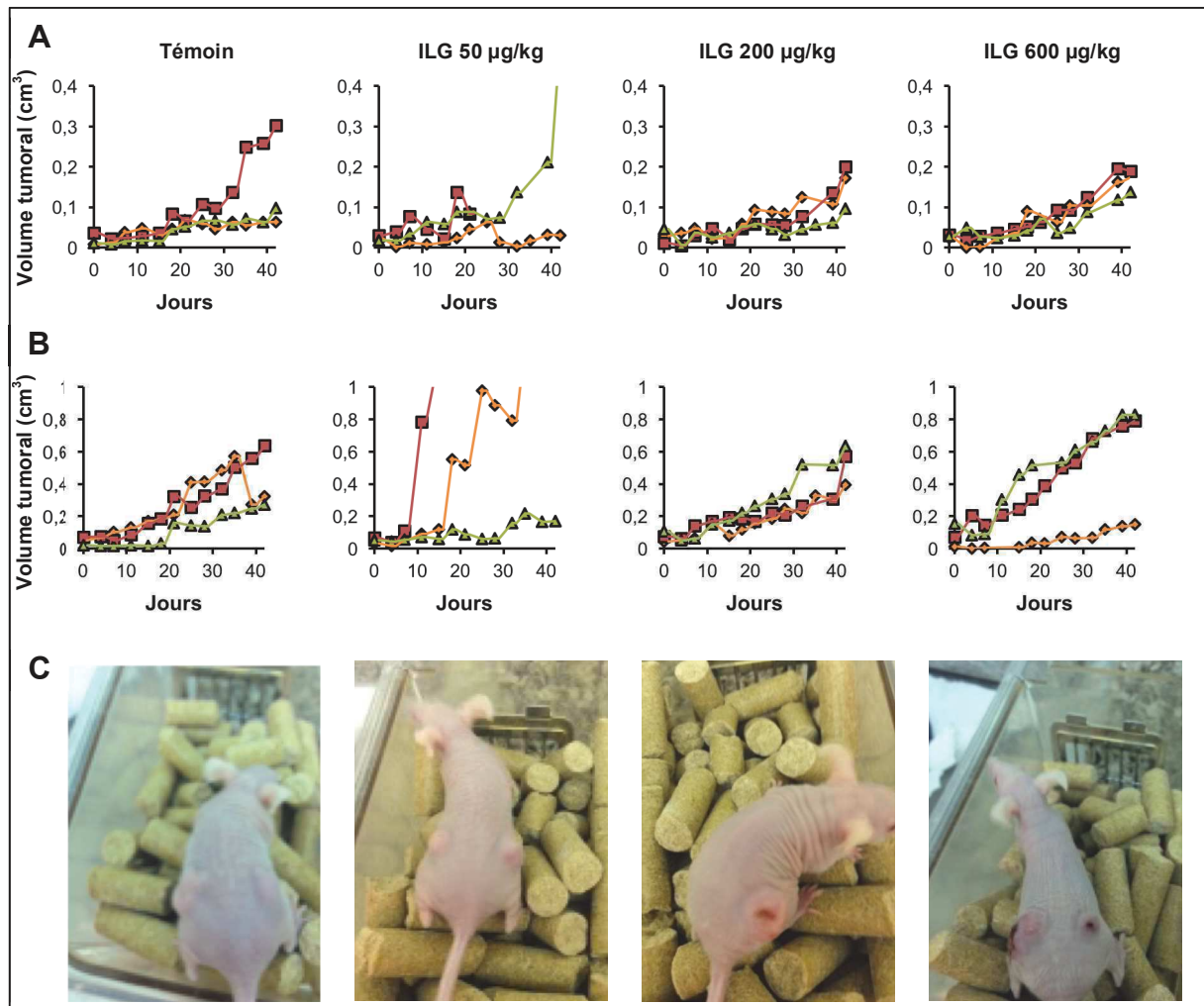


Figure 21 : Effets de l'ILG dans un modèle murin de xénogreffes de lignées cellulaires du cancer du col de l'utérus HeLa et Ca Ski

Les résultats, indiqués en volume tumoral, représentent la croissance tumorale associée à la xénogreffe de cellules (A) HeLa (flanc droit) et (B) Ca Ski (flanc gauche) dans des souris Swiss *nu/nu* traitées par 50, 200 et 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d'ILG, en injection intra-péritonéale et à raison de 5 injections par semaine sur une période de 6 semaines consécutives. (C) Les photographies montrent une souris de chaque groupe 6 semaines après le début des traitements.

1.3.4. Conclusion

Si l'ILG inhibe la prolifération de cellules cancéreuses du col de l'utérus *in vitro*, ce composé ne semble pas inhiber la croissance tumorale *in vivo*. Cependant on ne peut exclure que les conditions de traitement choisies n'étaient pas optimales pour influencer la croissance des tumeurs. Des mises au point de notre modèle seront nécessaires pour définir les effets antitumoraux potentiels de l'ILG *in vivo*. Différents schémas d'administration (doses, fréquences et voies) seront testés afin de déterminer les doses d'ILG maximum tolérées (eu égard de l'évolution pondérale et de l'hématotoxicité chez l'animal) compatibles avec les tests de suivi de progression tumorale dans les modèles de xénogreffes sous cutanées des lignées HeLa et Ca Ski. En effet, dans des études basées sur des xénogreffes de cellules MDA-MB231 ou H22 (hépatome murin) dans des souris *nude*, des doses d'ILG administrées à l'animal bien supérieures aux nôtres ont été utilisées (10 à 100 mg/kg en injection intra-péritonéale, administration journalière ou à raison de 3 injections par semaine). Dans ces conditions, l'ILG, associée ou non à des structures lipidiques, inhibe la croissance tumorale sans pour autant induire d'effets indésirables de toxicité pour l'animal (603, 604).

1.4. Conclusion générale

L'ensemble de nos résultats souligne une multiplicité d'actions de l'ILG sur les modèles cellulaires de cancer du col de l'utérus *in vitro*, incluant une activité anti-proliférative, pro-apoptotique, anti-migratoire et inhibitrice de l'activité, l'expression et/ou de la sécrétion de MMP-2 et -9. Notre travail suggère ainsi que l'ILG est un agent phytochimique attrayant par sa nature pléiotrope pour le traitement du cancer du col de l'utérus.

2. Internalisation de cellules tumorales apoptotiques par des fibroblastes primaires humains et transfert horizontal d'oncogènes viraux : étude des mécanismes cellulaires et moléculaires

Des travaux antérieurs du laboratoire ont mis en évidence que des cellules apoptotiques dérivées de cancer du col de l'utérus peuvent constituer des vecteurs d'oncogènes et induire la transformation de fibroblastes primaires humains dans un modèle de co-culture *in vitro* (421). Ces éléments tendent à démontrer l'existence d'un mécanisme alternatif de transformation cellulaire associée aux HPV, indépendant d'une infection virale de la cellule receveuse nouvellement transformée.

La caractérisation des mécanismes régulant l'internalisation de cellules apoptotiques qui précède le transfert horizontal de gènes (THG) est essentielle à la compréhension de ce processus et de la transformation des cellules receveuses qui en découle. En effet, le devenir des particules endocytées dans une cellule dépend en grande partie du mécanisme d'internalisation mis en jeu (354). Par ailleurs, si les mécanismes de reconnaissance et de capture des cibles apoptotiques par les phagocytes professionnels tels que les macrophages ou les cellules dendritiques sont bien décrits, ceux mis en jeu par les cellules phagocytaires non-professionnelles comme les fibroblastes sont encore mal connus et nécessitent d'être précisés (158, 162, 283). Enfin, selon le modèle évoqué par Holmgren, le THG résulte de la capture de cellules apoptotiques (410). Or, la capture de cellules apoptotiques est classiquement associée à leur élimination par les cellules du système immunitaire entre autres (158, 164). Puisque par définition le THG est susceptible d'aller à l'encontre de ce concept, l'exploration approfondie des mécanismes d'internalisation des cellules apoptotiques pouvant aboutir au THG apparaît aujourd'hui nécessaire.

2.1. Publication 2 : Efferocytosis of Apoptotic HPV-Positive Cervical Cancer Cells by Human Primary Fibroblasts

2.1.1. Résumé de la publication 2

L'objectif de ce travail a consisté en la caractérisation des événements impliqués dans l'internalisation des cellules apoptotiques issues de cellules tumorales par des HPFs selon le modèle *in vitro* de co-culture ayant permis la démonstration du THG au laboratoire (421). L'étude s'est principalement focalisée sur la caractérisation des interactions cellule phagocytaire/cellule apoptotique sur le plan morphologique et moléculaire.

La mort cellulaire par apoptose des cellules HeLa (HPV18+) et Ca Ski (HPV16+) a été induite par la combinaison de traitements (UV-B + staurosporine, 48h) qui a permis de générer une suspension de cellules apoptotiques majoritairement en apoptose tardive (>80%), dénommées LAC pour *Late Apoptotic/Dead Cells* et dépourvues de cellules vivantes (4).

Notre étude a nécessité la mise au point d'une méthode basée sur la cytométrie en flux impliquant le marquage spécifique de chacune des populations cellulaires préalablement à la co-culture et qui permet d'appréhender de manière quantitative la capture des cibles apoptotiques par les HPFs, et ce, sur un grand nombre de cellules. La capacité de cette méthode à discriminer les cellules ayant internalisé ou non les cibles apoptotiques a été évaluée en comparant les cinétiques de capture obtenues par cytométrie en flux aux cinétiques de capture déterminées par microscopie confocale. Des courbes très similaires ont été obtenues par les deux stratégies, nous permettant ainsi de valider notre nouvelle méthode d'analyse de capture par cytométrie en flux.

Les analyses morphologiques ont indiqué une réorganisation du cytosquelette d'actine évoquant la formation d'une synapse phagocytaire précédant l'internalisation de la cible apoptotique par les HPFs dans une vacuole toujours bordée d'actine. De plus, des évaginations de type "*ruffles*" ont aussi été observées à la surface des HPFs suggérant une capture de cellules apoptotiques mettant en jeu des mouvements membranaires apparentés à la macropinocytose. Enfin, une approche de microscopie référencée en position, développée dans le cadre d'un projet collaboratif du laboratoire, a permis d'apprécier, à l'échelle d'un fibroblaste et au cours du temps, une séquence d'événements associés à la capture de cellules apoptotiques. Cette séquence implique une étape d'adhérence de la cellule apoptotique à la membrane plasmique du fibroblaste et aboutit à l'internalisation complète de la cible dans les 6 heures qui suivent le premier contact cellule-LAC. Cette phase de latence, déjà décrite pour des phagocytes non-professionnels, suggère la mise en place d'une étape critique de reconnaissance impliquant la transduction de signaux nécessaires au remodelage du cytosquelette de la cellule phagocytaire (162).

Dans le but de comprendre l'implication des HPFs dans la clairance de cellules cancéreuses à différents stades d'avancement du processus apoptotique, des tests de capture ont été réalisés à partir d'une suspension de cellules en apoptose précoce (EAC pour *Early Apoptotic/Dying Cells*), générée par un traitement qualitativement équivalent à celui permettant d'obtenir des LAC mais limité dans la durée (UV-B + staurosporine, 6h). Les cinétiques de capture obtenues révèlent que les HPFs discriminent les cellules apoptotiques mourantes des cellules apoptotiques mortes ; le plus fort taux d'internalisation est observé quand les HPFs ont été co-cultivés avec les LAC. Ces éléments suggèrent que les cellules mortes acquièrent tardivement dans le processus de mort par apoptose des propriétés spécifiques nécessaires au déclenchement des mécanismes de capture par les HPFs.

Par ailleurs, la capture des LAC par les HPFs semble présenter une vitesse d'exécution moindre comparativement à celle accomplie par des macrophages. Elle implique un mécanisme actif dépendant d'un apport d'énergie (ATP) et d'ions bivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) puisqu'elle est inhibée à 4°C ou en présence d'EDTA. La cytochalasine D (un agent inhibant la polymérisation de l'actine) ou le diméthyle amiloride (DMA; un inhibiteur des échangeurs Na^+/H^+ qui prévient le "ruffling" membranaire et la macropinocytose) inhibent l'internalisation de façon dose-dépendante, suggérant la mise en œuvre d'un processus de phagocytose, vraisemblablement de type "*macropinocytotic mechanism*", et/ou de macropinocytose (346, 605).

Nos résultats s'accordent avec les données de la littérature indiquant que les HPFs se comportent donc comme des phagocytes non-professionnels (160, 162, 606, 607), capables d'internaliser, avec une efficacité et une rapidité moindre comparativement aux phagocytes professionnels, des fragments de cellules mortes plutôt que des cellules entières mourantes. Ainsi, ces composants majeurs du microenvironnement tumoral peuvent contribuer à l'efferocytose de cellules cancéreuses.

Certains des déterminants moléculaires qui permettent la reconnaissance des LAC par les fibroblastes et/ou nécessaires à la biogenèse ou à la maturation de phagosomes ont aussi été identifiés : l'exposition des phosphatidylsérines (PS) sur le feuillet externe de la membrane plasmique des LAC, un marqueur canonique de l'apoptose dont la reconnaissance par les HPFs implique, au moins en partie, le récepteur *Brain angiogenesis inhibitor-1* (BAI1). Après l'internalisation des corps apoptotiques la maturation des phagosomes semble impliquer le processus de *LC3-associated phagocytosis* (LAP), préalablement décrit dans des phagocytes professionnels (396, 397, 608), comme le démontre l'identification de LAMP-1 et de LC3-II à la membrane des phagosomes contenant les LAC.

Pris dans leur ensemble, nos résultats ont permis d'identifier les mécanismes mis en jeu lors de la capture de cellules apoptotiques par des HPFs et de la maturation consécutive des phagosomes, contribuant de fait à caractériser plus en détail l'efferocytose par des phagocytes non-professionnels. Dans le cas du cancer du col de l'utérus comme dans d'autres cancers, une association positive entre le taux d'apoptose intratumorale et certains paramètres comme la taille de la tumeur a été décrite et la présence de cellules apoptotiques dans ce contexte physiopathologique pourrait en partie contribuer au THG *via* leur capture (609-611). La capacité de phagocytose des HPFs démontrée ici *in vitro* suggère que les fibroblastes associés aux tumeurs pourraient contribuer à la capture des cellules cancéreuses apoptotiques au sein du microenvironnement tumoral.

1 Efferocytosis of Apoptotic HPV-Positive Cervical Cancer Cells

2 by Human Primary Fibroblasts

3 **Under review in Biology of the Cell**

4 François Hermetet¹, Elise Jacquin^{1,2}, Sophie Launay¹, Emilie Gaiffé¹, Mélanie Couturier³,
5 Fabienne Hirchaud¹, Patrick Sandoz⁴, Jean-Luc Prétet^{1,5}, Christiane Mougin^{1,5*}

6
7 ¹ EA3181, SFR FED4234, Université de Franche-Comté, COMUE Université Bourgogne
8 Franche-Comté, LabEx LipSTIC ANR-11-LABX-0021, Boulevard Alexandre Fleming, F-
9 25030 Besançon Cedex, France

10 ² Signalling Programme, The Babraham Institute, Babraham Research Campus, Cambridge
11 CB22 3AT, United Kingdom

12 ³ UMR 1098, INSERM, Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté,
13 Université de Franche-Comté, COMUE Université Bourgogne Franche-Comté, SFR
14 FED4234, LabEx LipSTIC ANR-11-LABX-0021, 8 rue du Docteur Jean-François-Xavier
15 Girod, BP 1937, F-25020 Besançon Cedex, France

16 ⁴ UMR 6174, Institut FEMTO-ST, CNRS, Université de Franche-Comté, COMUE Université
17 Bourgogne Franche-Comté, 32 avenue de l'Observatoire, F-25044 Besançon Cedex, France

18 ⁵ Centre Hospitalier Régional Universitaire, Boulevard Alexandre Fleming, F-25030,
19 Besançon Cedex, France

20
21 * Corresponding author

22 Phone: +33.3.81.66.91.11

23 Fax: +33.3.81.66.93.70

24 E-mail: christiane.mougin@univ-fcomte.fr

25
26 **Running title:** Clearance of Apoptotic Cancer Cells by Fibroblasts

27
28 **Key Words:** Efferocytosis; Human primary fibroblast; Apoptotic cancer cell;
29 Macropinocytotic mechanism; Brain-specific angiogenesis inhibitor 1.

30 **Abbreviations:** AC, apoptotic cells; B2M, human β -2-microglobulin; BAI1, brain-specific
31 angiogenesis inhibitor 1; CFDA, SE, 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl
32 ester; Ctrl, control; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride; DMA, 5-(N,N-
33 dimethyl) amiloride hydrochloride; EAC, early apoptotic/dying cells; HPFs, human primary
34 fibroblasts; HPV, human papillomavirus; LAC, late apoptotic/dead cells; LAMP-1,
35 lysosomal-associated membrane protein 1; LAP, LC3-associated phagocytosis; LC3,
36 microtubule-associated protein 1 light chain 3; LC3-II, lipidated LC3 form; M ϕ , human
37 monocyte-derived macrophages; MFG-E8, Milk Fat Globule-EGF factor 8; PE,
38 phycoerythrin; PI, propidium iodide; PS, phosphatidylserine; RT, room temperature; RT-
39 qPCR, quantitative reverse transcription PCR; SD, standard deviation; siRNA, short
40 interference RNA; STS, staurosporine; TIM, T-cell Ig and mucin domain; TRITC,
41 tetramethylrhodamine-B-isothiocyanate; TSP, thrombospondin.

42 **Abstract**

43 **Background information.** Efficient clearance of apoptotic cells, named efferocytosis, is a
44 fundamental physiological process for tissue development and homeostasis. The contribution
45 of non-professional phagocytes like fibroblasts to efferocytosis has been established, although
46 the underlying mechanisms are not well understood. We recently demonstrated that horizontal
47 DNA transfer can occur through the uptake of apoptotic human papillomavirus-positive
48 cancer cells by human primary fibroblasts leading to their transformation. The aim of this
49 present study was to analyze the cellular and molecular mechanisms that drive the phagocytic
50 activity of human primary fibroblasts in the context of apoptotic cervical cancer cell removal.

51 **Results.** Here we provide evidence that human primary fibroblasts engulf late more
52 efficiently than early apoptotic cells, but their phagocytic ability remains limited compared to
53 professional phagocytes such as human monocyte-derived macrophages. The engulfment
54 occurs in a time-, temperature- and calcium-dependent manner. Remodeling of actin-fibers
55 contributes to the biogenesis of apoptotic cell containing-macroendocytic vacuoles. Both
56 morphological analyses and pharmacological approaches confirmed the involvement of actin
57 driven-phagocytosis and likely macropinocytotic mechanisms in apoptotic target
58 internalization. The uptake of apoptotic cells requires phosphatidylserine recognition, which
59 is mainly mediated by phosphatidylserine-receptor brain-specific angiogenesis inhibitor 1.
60 Confocal microscopy analyses with organelle-specific markers revealed that internalized
61 apoptotic material traffics into late phagolysosomes and specific features of microtubule-
62 associated protein 1 light chain 3-associated phagocytosis were observed.

63 **Conclusions.** Our data show that *in vitro* fibroblasts contribute to apoptotic tumor cell
64 removal by phagocytosis and likely macropinocytotic mechanisms. Efferocytosis by
65 fibroblasts involves phosphatidylserine receptor brain-specific angiogenesis inhibitor 1, which
66 participates in subsequent uptake orchestration *via* actin cytoskeleton remodeling.

67 **Significance.** Our results highlight the cellular and molecular mechanisms of fibroblast-
68 mediated clearance of apoptotic tumor cells. Consequences regarding alternative mechanism
69 of carcinogenesis or tumor progression should be addressed.

70 **Introduction**

71 Clearance of apoptotic cells (AC), known as efferocytosis, largely contributes to tissue
72 homeostasis *in vivo* (Arandjelovic and Ravichandran, 2015). Although this fundamental
73 physiological process is a property of most cell types, macrophages are the main and most
74 effective phagocytes for the removal of AC (Savill and Fadok, 2000; Erwig and Henson,
75 2008; Hochreiter-Hufford and Ravichandran, 2013). They have been widely used to
76 investigate the molecular mechanisms underlying recognition, uptake, and degradation of AC
77 (Fadok et al., 2001a; Hochreiter-Hufford and Ravichandran, 2013).

78 The recognition of AC by macrophages involves numerous receptors expressed on the
79 macrophage cell surface that bind to their specific ligands exposed on AC, and which are
80 referred to as "eat me" signals (Fadok et al., 2001a; Lauber et al., 2004; Hochreiter-Hufford
81 and Ravichandran, 2013). To date, various "eat me" signals have been described including
82 altered sugars, lipids and proteins (Hochreiter-Hufford and Ravichandran, 2013), but the best
83 studied of these signals is phosphatidylserine (PS) (Fadok et al., 1998; Fadok et al., 2001b;
84 Hoffmann et al., 2001). Previous publications support the importance of PS receptors,
85 including the T-cell Ig and mucin domain (TIM) family (Kobayashi et al., 2007), brain-
86 specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) (Park et al., 2007), and stabilin-2 (Park et al., 2008),
87 in the clearance of AC through direct recognition of externalized PS on the AC surface. TIM-
88 4 is a small transmembrane protein that binds PS *via* its immunoglobulin domain and is
89 highly expressed by macrophage cell lines (Kobayashi et al., 2007; Miyanishi et al., 2007).
90 Bone marrow-derived macrophages from TIM-4^{-/-} mice were recently reported to have a
91 substantially reduced ability to engulf apoptotic bodies or PS-bearing targets (Martinez et al.,
92 2011; Flannagan et al., 2014). Such observations suggest that TIM-4 is the primary receptor
93 for PS in professional phagocytosis models. BAI1, another PS receptor, is a seven
94 transmembrane receptor that belongs to a subfamily of adhesion G-protein-coupled receptors
95 (Stephenson et al., 2014). The first recognized function of BAI1 was its ability to inhibit
96 angiogenesis and tumor formation through the proteolytic processing of its N-terminal
97 domain into secreted vaculostatins (Kaur et al., 2005). BAI1 is expressed in macrophage cell
98 lines and immunological tissues such as the bone marrow and spleen, and is known to
99 contribute to AC phagocytosis and myoblast fusion *via* its thrombospondin (TSP) type 1
100 repeats (Park et al., 2007; Cork and Van Meir, 2011; Hochreiter-Hufford et al., 2013). Other
101 receptors (*e.g.* vitronectin receptor ($\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin), Mer tyrosine kinase family (MerTK,
102 Tyro3 and Axl)) are involved in the indirect recognition of PS and require soluble bridging

103 proteins (e.g. TSP1 or Milk Fat Globule-EGF factor 8 (MFG-E8), Gas6 or protein S)
104 (Hochreiter-Hufford and Ravichandran, 2013).

105 Engagement of the PS receptors initiates signaling events within the phagocyte. The Rho-
106 family GTPases are prominent players in the transmission and integration of signals and
107 activate actin-related protein-2/3 (Arp2/3) complex, formins and WH2 domain-containing
108 nucleators (Pollard, 2007; Campellone and Welch, 2010; Kuhn and Geyer, 2014). This leads
109 to actin cytoskeleton remodeling and engulfment of dead cells into macroendocytic vacuoles
110 (Park et al., 2007; Swanson, 2008; Hochreiter-Hufford and Ravichandran, 2013).

111 Regarding the internalization of dead cells by professional phagocytes, different
112 mechanisms are now being apprehended, although information about their target cell
113 specificity (apoptotic and necrotic cells) remains sparse. Indeed, several observations indicate
114 that the interaction of macrophages with dead cells initiates internalization of the targets, and
115 that internalization can be preceded by phagocytosis "zipper"-like mechanism (*i.e.* related to
116 the formation of a close-fitting phagocytic cup) or macropinocytotic mechanism (*i.e.* related
117 to the membrane ruffling and the formation of spacious phagosomes in the ingesting
118 macrophages) (Krysko et al., 2006a; Erwig and Henson, 2008).

119 During the maturation of macroendocytic vacuoles, their membrane fuses with
120 intracellular organelles including early endosomes, late endosomes and lysosomes (Kinchen
121 and Ravichandran, 2008; Fairn and Grinstein, 2012). Recently, Martinez and colleagues
122 highlighted that efficient clearance of AC by macrophages involves the recruitment and
123 lipidation of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) to the AC-containing
124 phagosome membrane, followed by an acidification of the phagocytic vacuole (Martinez et
125 al., 2011). The authors suggested that during this process, termed LC3-associated
126 phagocytosis (LAP), LC3 facilitates the phagosome maturation and the subsequent
127 degradation of cellular corpses.

128 AC clearance by non-specialized phagocytic cells has been investigated in a limited
129 number of studies (Hall et al., 1994; Dini et al., 1995; Parnaik et al., 2000; Monks et al., 2005;
130 Patel et al., 2010; Wagner et al., 2011), the results of which suggest that the mechanisms
131 underlying prey cell recognition and clearance may differ from those observed in professional
132 phagocytes (Parnaik et al., 2000; Hochreiter-Hufford and Ravichandran, 2013).

133 Through the endocytic process, AC can act as a DNA vector that may confer a selective
134 advantage to the recipient cell (Bergsmeth et al., 2001; Ehnfors et al., 2009). In a previous
135 study, we provided evidence of engulfment of apoptotic human cervical cancer-derived cells
136 by human primary fibroblasts (HPFs) (Gaiffe et al., 2012). Apoptotic human papillomavirus

137 (HPV)-positive cells enabled horizontal transfer of oncogenes to HPFs revealed by *in situ*
138 hybridization and PCR analyses. HPFs subsequently expressed HPV E6 mRNA and exhibited
139 transformed cell properties, such as increased proliferation, anchorage-independent growth
140 capacity and aneuploidy. The results highlighted an alternative mechanism of HPV-associated
141 carcinogenesis from mesenchymal cells that are not natural targets of HPV (Unger et al.,
142 1999; Gaiffe et al., 2012).

143 In the present study, we analyzed the mechanisms that drive non-professional phagocytes,
144 namely HPFs, to clear apoptotic HPV-positive cervical cancer cells. Using flow cytometry,
145 confocal imaging and functional studies, we show that HPFs are able to phagocytize dead
146 tumor cell corpses by recognizing and binding PS, thanks to the specific receptor BAI1
147 expressed by HFP, and that they trigger translocation of LC3 to macroendocytic vacuoles.

148 **Results**

149 **Characterization of apoptotic cell death**

150 The apoptosis of cervical carcinoma donor cells was induced by UV-B exposure followed
151 by staurosporine (STS) treatment for 6 h and 48 h as previously described (Gaiffe et al.,
152 2012). To ensure that only dying and dead cells were used for endocytosis assays, sloughed
153 cells were collected and characterized by apoptosis assays. By contrast, viable HeLa and Ca
154 Ski used as untreated cell controls were harvested by trypsinization. As shown by Sub-G1
155 analysis, the percentage of cells with fragmented DNA increased in a time-dependent manner
156 ($8.6\% \pm 1.9$ and $60.5\% \pm 5.1$ at 6 and 48 h, respectively, for HeLa; $10.0\% \pm 2.0$ and $51.9\% \pm$
157 2.3 at 6 and 48 h, respectively, for Ca Ski); no obvious feature of apoptosis or hypodiploid
158 cells was detected in untreated cells (Figure 1A). Apoptosis was further confirmed by specific
159 nuclear morphology changes evidenced by DAPI staining (Figure 1B). Flow cytometry
160 analysis demonstrated that treatment for 6 h resulted in an increase of early apoptotic/dying
161 cells (EAC) defined as annexin V single-positive ($77.4\% \pm 4.6$ for HeLa; $83.1\% \pm 2.3$ for Ca
162 Ski) and treatment for 48 h resulted in a high rate of late apoptotic/dead cells (LAC) defined
163 as annexin V and PI double-positive ($92.1\% \pm 5.7$ for HeLa; $85.9\% \pm 4.2$ for Ca Ski) (Figure
164 1C).

165

166 **Late apoptotic cells are preferentially engulfed by HPFs**

167 To establish the extent to which HPFs could engulf apoptotic cervical carcinoma HeLa
168 and Ca Ski cells at various stages of apoptosis, HPFs were co-cultured with PKH67-labeled
169 EAC or LAC, washed twice to remove the non-ingested AC, fixed in PFA, and labeled with
170 phalloidin-TRITC and DAPI. Based on confocal microscopy analysis, HPFs having ingested
171 early or late PKH67-labeled apoptotic HeLa or Ca Ski cells could be clearly distinguished
172 from unloaded HPFs. Figure 2A is representative of confocal microscopy images of co-
173 culture. The engulfment of EAC ($1.2\% \pm 2.4$ and $1.6\% \pm 2.3$ at 2 and 6 h, respectively, for
174 HeLa; 0.0% and $1.7\% \pm 3.7$ at 2 and 6 h, respectively, for Ca Ski) analyzed by confocal
175 microscopy was much less efficient than that of LAC ($6.7\% \pm 4.3$ and $16.7\% \pm 4.6$ at 2 and 6
176 h, respectively, for HeLa; $1.9\% \pm 4.3$ and $9.3\% \pm 5.4$ at 2 and 6 h, respectively, for Ca Ski)
177 (Figures 2A and B). Indeed, although EAC and LAC were co-cultured with HPFs at a similar
178 ratio (10:1), most of the EAC were released following washing and the remaining cells mostly
179 displayed cell-cell contact but were not phagocytosed as shown in Figure 2A, left panel. The
180 6 h co-culture duration was chosen for further experiments in order to maintain the transient

181 nature of early apoptotic signature throughout the co-culture period and to avoid LAC
182 appearance (Silva, 2010). LAC were mostly engulfed by HPFs, starting after only 2 h of co-
183 culture (Figure 2B), as demonstrated by the presence of scattered yellow/green AC within the
184 red HPFs (Figure 2A, middle panel). This result demonstrates that cell fragments (1 to 15 μ m
185 in diameter) were unequivocally inside the HPFs. Moreover, the human monocyte-derived
186 macrophages (M ϕ), serving as professional phagocyte controls, exhibited their high capacity
187 for the uptake of LAC compared to HPFs (Figure 2A, right panel).

188 Using the quantitative flow cytometry approach, we assessed the percentage of PKH26-
189 stained HPFs that engulfed PKH67-stained apoptotic cancer cells at early time periods (2 h
190 and 6 h) of co-culture. As shown by the appearance of PKH26- and PKH67 double positive
191 populations (Figure 2C), the cytometry analyses confirmed that the rate of LAC uptake ($5.7\% \pm 1.7$
192 ± 1.7 and $17.8\% \pm 1.0$ at 2 and 6 h, respectively, for HeLa; $5.4\% \pm 0.3$ and $11.9\% \pm 0.6$ at 2
193 and 6 h, respectively, for Ca Ski) by HPFs was higher than the rate of EAC uptake ($1.2\% \pm$
194 1.1 and $4.6\% \pm 0.6$ at 2 and 6 h, respectively, for HeLa; $1.7\% \pm 0.4$ and $2.3\% \pm 0.3$ at 2 and 6
195 h, respectively, for Ca Ski), as observed by microscopy (Figures 2C and D). Taken together,
196 these results show that HPFs clearly distinguished EAC and LAC, and that their phagocytic
197 capacity was limited to apoptotic subcellular fragments (LAC), which is consistent with their
198 non-professional nature.

199 We next studied the kinetics of AC internalization by HPFs and M ϕ by varying the
200 exposure time (2 - 72 h) of LAC to the phagocytic cells. Again, the phagocytic capacity was
201 defined as the percentage of HPFs and M ϕ that engulf LAC. Figure 2E indicates that HPFs
202 and M ϕ reached their maximal phagocytic capacity at 24 h post-exposure. Nevertheless, the
203 percentage of phagocytosing HPFs was lower compared to M ϕ (Figure 2E). Overall, HPFs
204 engulfed AC with a lower efficiency than M ϕ , an observation that further substantiates their
205 amateur phagocyte nature.

206 Moreover, we studied in detail the morphological aspects of dead cell engulfment by
207 HPFs using confocal microscopy (Figure 2F). The reorganization of the actin cytoskeleton
208 observed during internalization of double-PKH67/DAPI-labeled LAC suggests both
209 phagocytosis and macropinocytotic processes. During the initial step of endocytosis, LAC
210 bound to the plasma membrane. Actin polymerization was localized underneath the plasma
211 membrane in contact with LAC to be ingested, and a dense network of actin filaments
212 appeared in this region (Figure 2F(a)). Then, membranous expansions extended around the
213 dead cell (Figure 2F(b)) to ultimately engulf it in a membrane-bound vacuole (Figure 2F(d)).
214 Actin-rich membrane ruffles were also observed, suggesting a macropinocytosis-like

215 movement-mediated capture of LAC by HPFs (Figure 2F(c)). The ingested LAC was
216 completely enclosed into HPFs within 6 h (Figure 2F(d)).

217 In addition, the monitoring of AC clearance was evaluated by position-referenced
218 microscopy as previously published (Galeano et al., 2011). By tracking the fluorescent dyes
219 during co-culture between PKH26-labeled HPFs and CFDA, SE-labeled HeLa LAC at
220 different time periods, we observed that apoptotic corpses quickly (1 h) adhered to the plasma
221 membrane of HPFs and were efficiently internalized by HPFs within 6 h after first tethering
222 (Figure 2G, see Video S1 in the Supplementary Material). These time-lapse events have been
223 already described for other non-professional phagocytes (Parnaik et al., 2000; Monks et al.,
224 2005).

225

226 **Clearance of LAC by HPFs is inhibited by low temperature incubation,** 227 **EDTA, cytochalasin D and dimethylamiloride**

228 As visualized by confocal microscopy, the surface morphology of HPFs revealed
229 dynamic actin-based membrane protrusions of HPFs that induce phagocytic cup formation
230 during AC internalization. To better understand the endocytosis mechanisms used by HPFs to
231 engulf AC, physical and chemical inhibitors were tested. When recipient cells were co-
232 incubated with HeLa and Ca Ski AC at 4°C or in the presence of 2 mM EDTA, the percentage
233 of internalization significantly dropped to 4.1-14.8% suggesting that internalization requires
234 energy and divalent ions (Ca^{2+} , Mg^{2+}) (Figure 3A). Cytochalasin D (an F-actin
235 depolymerizing agent) or 5-(N,N-dimethyl) amiloride hydrochloride (DMA; an inhibitor of
236 Na^+/H^+ exchange that prevents membrane ruffling and macropinocytosis) were used to treat
237 HPFs prior to the addition of LAC (Swanson and Watts, 1995; Ivanov, 2008). These
238 treatments resulted in significant decreases of LAC uptake by HPFs in a dose-dependent
239 manner, suggesting the involvement of phagocytosis and/or macropinocytosis in the
240 internalization process (Figure 3A). Partial inhibition of LAC uptake was seen using
241 chlorpromazine (an inhibitor of clathrin-dependent endocytosis) at a concentration of 20 μM
242 (Ivanov, 2008). By contrast nystatin (an inhibitor of caveolin-dependent endocytosis) had no
243 effect on the uptake of LAC whatever the concentration used (Ivanov, 2008) (Figure 3A).
244 Taken together, these data suggest that phagocytosis and macropinocytotic mechanisms
245 contribute to AC clearance.

246 It is noteworthy that 6 h treatment with high concentrations of EDTA (> 2 mM),
247 cytochalasin D (> 4 μM), chlorpromazine (> 20 μM) and nystatin (> 20 μM) interfered with

248 HPFs viability, as monitored by MTT test (see Figure S1 in the Supplementary Material), and
249 were not considered for internalization assays.

250

251 **Efferocytosis of LAC by HPFs is partially mediated by phosphatidylserine** 252 **and BAI1**

253 PS exposure is widely considered as a canonical marker of apoptosis. The contribution of
254 PS recognition by HPFs in AC clearance was evaluated by measuring the ability of HPFs to
255 engulf PKH67-AC incubated with an excess of annexin V. Pretreatment with 40 and 160
256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of annexin V efficiently blocked PS recognition by annexin V-PE (Figure 3B) and
257 resulted in a dose-dependent decrease of LAC uptake by HPFs (Figure 3C). Four main PS
258 receptors have been shown to be involved in the uptake of AC by professional phagocytes,
259 namely BAI1, TIM-1, TIM-4 and stabilin-2 (Kobayashi et al., 2007; Park et al., 2007; Park et
260 al., 2008). Among these 4 different PS receptors, we noted that 2 were expressed by M ϕ ,
261 namely BAI1 and TIM-4 as shown by quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)
262 analysis (Figure 3D). The receptors involved in endocytosis of AC by amateur phagocytes
263 have not been clearly identified. Here, HPFs expressed only BAI1 and displayed lower levels
264 of mRNA compared to M ϕ (Figure 3D). Moreover, immuno-localization studies with the
265 H270 antibody indicated that BAI1 was not uniformly distributed but showed variable and
266 patchy membrane staining in HPFs, as well as in M ϕ , in the absence of AC (Figure 3E).
267 During co-culture between HPFs and AC, BAI1 showed a tendency to accumulate within the
268 phagocytic cup (Figure 3F). We hypothesized that BAI1 may subserve an engulfment
269 function of apoptotic corpses by HPFs. To assess the function of BAI1 in this system, short
270 interference RNA (siRNA) against BAI1 were transfected in HPFs prior to co-culture as
271 described in detail in the Materials and Methods section. Compared to a siRNA negative
272 control, this resulted in a significant decrease of BAI1 mRNA levels (Figure 3G) and a lower
273 ability to internalize PKH67-labeled LAC, either HeLa or Ca Ski LAC (Figure 3H). Thus, we
274 believe BAI1 to be a surrogate molecule to engulf apoptotic targets.

275

276 **Recruitment of LC3 onto the macroendocytic vacuoles occurs after LAC** 277 **efferocytosis by HPFs**

278 Since some components of the autophagy machinery are involved in the maturation of
279 macroendocytic vacuoles (Sanjuan et al., 2007; Florey et al., 2011; Martinez et al., 2011), we
280 further sought to assess the recruitment of LC3 and lysosomal-associated membrane protein 1

281 (LAMP-1) to macroendocytic vacuoles after AC engulfment by HPFs. Western blotting
282 analyses revealed that HPFs co-cultured with LAC contained higher levels of the lipidated
283 LC3 form (LC3-II) compared to control cells, suggesting that LAC uptake led to LC3-II
284 conversion in HPFs (Figure 4A). Confocal microscopy analyses of LC3 immunostaining after
285 cell fixation showed that LC3 could be recruited to AC-containing vacuoles (Figure 4B).
286 Thus, LC3-II conversion after AC uptake might be at least partly associated with direct LC3
287 lipidation onto macroendocytic vacuoles. Taken together, these results indicate that AC
288 uptake by HPFs can initiate LAP as previously described in macrophages (Sanjuan et al.,
289 2007; Florey et al., 2011; Martinez et al., 2011). Furthermore, positive staining of some
290 macroendocytic vacuoles with LAMP-1, a classical marker of lysosomal compartments
291 (Tjelle et al., 2000), suggests a fusion of AC-containing vacuoles with lysosomes (Figure 4B).

292 **Discussion**

293 *In vivo*, the rapid and efficient clearance of dying cells is fundamental for tissue
294 development and homeostasis, as well as for protection against chronic inflammation and
295 autoimmunity. As typical professional phagocytes, macrophages play a central role in the
296 efferocytosis process. Over the last few decades, it has become clear that epithelial cells
297 (Parnaik et al., 2000; Monks et al., 2005; Patel et al., 2010), endothelial cells (Dini et al.,
298 1995), and fibroblasts (Hall et al., 1994; Parnaik et al., 2000), collectively known as non-
299 professional or amateur phagocytes, may contribute to dead cell clearance. With regard to
300 fibroblasts, they are known to be involved in a variety of physiological (*e.g.* deposition of
301 extracellular matrix, regulation of epithelial differentiation) or pathological processes (*e.g.*
302 regulation of inflammation, engagement in wound healing) (Tomasek et al., 2002; Parsonage
303 et al., 2005; Bainbridge, 2013; Chiarugi, 2013). They are also able to remove apoptotic
304 corpses (Hall et al., 1994; Holmgren et al., 1999; Gaiffe et al., 2012). Professional phagocytes
305 possess a battery of apoptotic-cell surface ligands and intermediate molecules that can lead to
306 uptake of apoptotic cells (AC) (Hochreiter-Hufford and Ravichandran, 2013). Although
307 amateur phagocytes like fibroblasts contribute to AC efferocytosis, the mechanisms of this
308 process are not well understood.

309 We recently demonstrated that horizontal DNA transfer can occur through the uptake of
310 apoptotic HPV-positive cancer cells by human primary fibroblasts (HPFs) leading to their
311 transformation (Gaiffe et al., 2012). In the current study, by using the same *in vitro* co-culture
312 approach, we confirm that HPFs take up late apoptotic cancer cells and we demonstrate that
313 internalization depends to a significant extent on BAI1. Interestingly, HPFs discriminate
314 precisely between dying apoptotic targets (EAC) and dead cells (LAC) and mainly engulf
315 LAC (Figures 2A-D), and not dying whole cells, in contrast to professional phagocytes such
316 as macrophages (Cocco and Ucker, 2001; Xu et al., 2006). This is in line with observations
317 reporting that other amateur phagocytes also preferentially engulf apoptotic corpses (Parnaik
318 et al., 2000; Patel et al., 2010). Moreover, LAC uptake by HPFs phagocytes occurs more
319 slowly and less efficiently than by professional phagocyte macrophages (Figure 2E). These
320 data corroborate those obtained with epithelial, endothelial and peritoneal mesothelial cells, as
321 non-professional phagocytes, exhibiting a limited internalization potential compared to
322 macrophages (Monks et al., 2005; Patel et al., 2010; Wagner et al., 2011). In addition, the
323 relatively long-time sequential events observed using position-referenced microscopy (Figure
324 2G, see Video S1 in the Supplementary Material) suggest that upon first tethering, LAC

325 uptake by HPFs requires a critical extended recognition and transduction period that triggers
326 actin cytoskeleton remodeling for efferocytosis. This is in agreement with previous
327 observations (Parnaik et al., 2000; Monks et al., 2005). To the best of our knowledge, the
328 molecular mechanisms underlying this delay remain elusive.

329 Confocal microscopy analyses reveal that the internalization process involves the typical
330 sequence of phagosome formation (cup-shaped invaginations of the plasma membrane that
331 subsequently close at their distal margins to form intracellular membrane-bounded organelles)
332 largely mediated by active actin cytoskeleton remodeling (Swanson, 2008) (Figure 2F).
333 Engulfment by typical macropinocytotic mechanism cannot be excluded, as observed by
334 specific restructuring of the actin cytoskeleton, such as membrane ruffles (Figure 2F(c))
335 (Erwig and Henson, 2008; Swanson, 2008). Indeed, the partial inhibition of LAC uptake by
336 the macropinocytosis inhibitor dimethylamiloride (Swanson and Watts, 1995; Ivanov, 2008)
337 (Figure 3A), suggests that macropinocytosis-like mechanisms might proceed to LAC
338 clearance, in line with reports from several authors (Hoffmann et al., 2001; Ogden et al.,
339 2001; Xu et al., 2006). In addition, the data obtained with cytochalasin D, a cell permeable
340 myotoxin that inhibits both phagocytosis and macropinocytosis through the depolymerization
341 of actin filaments (Ivanov, 2008), confirm the involvement of actin driven-phagocytosis and
342 likely macropinocytotic mechanisms in LAC internalization (Figure 3A). In macrophages
343 typically driving phagocytosis of apoptotic bodies, it has been demonstrated that
344 macropinocytosis could participate in dead cell uptake in a PS-dependent manner (Hoffmann
345 et al., 2001; Krysko et al., 2006b). Thus, in our model, two engulfment mechanisms, namely
346 phagocytosis and macropinocytosis, might interplay for the removal of apoptotic material.
347 Participation of clathrin-mediated endocytosis might also contribute to LAC uptake, as
348 documented by the results of chlorpromazine experiments. However, the reduction of LAC
349 internalization might be explained by side effects of that chemical on other endocytic
350 pathways. Indeed, chlorpromazine can interfere with the formation of phagosomes or
351 macropinosomes (Dutta and Donaldson, 2012), likely because of the clathrin-actin crosstalk
352 (Shen et al., 2013).

353 The first step to removing AC calls for distinction of viable cells from dying cells. The
354 flipping of membrane lipids that occurs during the early stages of apoptosis results in their
355 exposure on the outer leaflet of the plasma membrane, where they can be recognized by
356 phagocytes (Fadok et al., 1998). Here, the use of annexin V, an inhibitor for PS-mediated
357 efferocytosis, demonstrates that the exposure of PS on the outer leaflet of the LAC-plasma
358 membrane is a key event for LAC recognition and subsequent uptake by HPFs (Figures 3B

359 and C). Nevertheless, EAC, which also expose PS (Figure 1C) remain weakly engulfed
360 (Figures 2A-D). It seems clear that PS exposure is required but not sufficient for the target
361 cells to be engulfed by macrophages (Cocco and Ucker, 2001; Segawa et al., 2011). As
362 suggested by Borisenko *et al.*, levels of exposed PS above the phagocyte sensitivity threshold
363 might be necessary to allow efficient AC engulfment (Borisenko et al., 2003). When the
364 plasma membrane of AC becomes permeabilized (*i.e.*, in late apoptotic cells), additional
365 molecules are revealed to shape a new combination of "eat-me" and "don't-eat-me" signals
366 (Poon et al., 2010), which might favor optimal AC engulfment by HPFs.

367 Our data also demonstrate that engulfment of apoptotic cancer cells is $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -
368 dependent, since this process is inhibited following the chelation of extracellular $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
369 by EDTA (Figure 3A). Our findings also indicate that engulfment is significantly inhibited at
370 4°C (Figure 3A). It is noteworthy that these two conditions were reported to inhibit the AC-
371 tethering step that subsequently prevents AC uptake by macrophages (Dransfield et al., 2015).
372 Since integrins are known to be inactive at 4°C, we may suggest a role for these cell adhesion
373 receptors in the tethering of AC by our amateur phagocytes, likely by the MFG-E8-TSP1-
374 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ or $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ through indirect interaction with PS (Hall et al., 1994; Hanayama et al., 2002;
375 Borisenko et al., 2004).

376 In 2007, TIM-4 and BAI1 were first identified in macrophages as direct phagocytic
377 receptors for PS-exposing apoptotic corpses (Kobayashi et al., 2007; Park et al., 2007).
378 Interestingly, our data demonstrate here that the BAI1 receptor is expressed by both HPFs and
379 macrophages (Figures 3D and E), contrary to TIM-4, whose expression is restricted to
380 macrophages (Figure 3D). Moreover, siRNA-mediated knockdown of BAI1 in HPFs caused a
381 significant reduction of BAI1 mRNA associated with a reduction of efferocytosis capacity
382 (Figures 3G and H), as already shown in a model of astrocytes (Park et al., 2007). Together,
383 the present results highlight the involvement of PS recognition in AC efferocytosis and the
384 role of BAI1 as a key PS receptor in our amateur phagocytes. The actin cytoskeletal
385 remodeling observed by confocal microscopy during LAC engulfment (Figure 2F) is likely
386 the consequence of an activation of the ELMO/Dock180/Rac1 pathway by interaction with
387 the intracellular domain of BAI1 (Park et al., 2007). However, our experiments highlight that
388 both PS-masking and BAI1 siRNA lead to partial reduction of AC clearance (Figures 3C and
389 H), suggesting that other molecules may also trigger recognition and subsequent uptake of
390 AC by HPFs. One of the molecules potentially involved may be the fibroblast vitronectin
391 receptor (Hall et al., 1994). While the vitronectin receptor is defined as an integrin receptor
392 triggering TSP-mediated clearance of AC (Savill et al., 1992; Hall et al., 1994), it has also

393 been reported that this phagocytic receptor is attracted to PS through indirect interactions *via*
394 the bridge molecules MFG-E8 (Hanayama et al., 2002; Borisenko et al., 2004). The protein
395 complex thus formed has been shown to bind the ELMO/Dock180/Rac1 signaling complex
396 (Albert et al., 2000). Thus, BAI1 and vitronectin receptor signaling could be intimately
397 interconnected. This apparent redundancy supports the idea of a complex recognition network
398 that may explain why the identification of cell surface proteins involved in the removal of AC
399 by non-professional phagocytes is challenging.

400 Ingested cellular material can be degraded following maturation of macroendocytic
401 vacuoles through fusion of early endosomes, late endosomes and lysosomes (Kinchen and
402 Ravichandran, 2008; Fairn and Grinstein, 2012). Here, we provide further evidence that
403 maturation of AC-containing vacuoles is associated with changes in the composition of their
404 membranes, as shown by the detection of LAMP-1, a specific marker of lysosomes (Figure
405 4B). Interestingly, LAMP-1 colocalizes with the key autophagy-related protein LC3 (Figure
406 4B). Florey *et al.* recently uncovered a non-canonical activity of this autophagy protein that is
407 associated with macroendocytic engulfment (Florey et al., 2011; Florey and Overholtzer,
408 2012). During this process, so-called LC3-associated phagocytosis (LAP), LC3 is directly
409 lipidated onto a variety of single-membrane compartments such as AC-containing vacuoles
410 (Florey et al., 2011; Martinez et al., 2011). In professional phagocytes, Martinez *et al.* have
411 suggested that direct LC3 recruitment onto the phagosome membrane promotes phagosome
412 maturation and subsequent degradation of the engulfed AC (Martinez et al., 2011). To the
413 best of our knowledge, this is the first time that LAP is observed in amateur phagocytes.
414 However, its significance in the clearance of LAC and possible altered intracellular
415 processing, especially in the context of horizontal gene transfer, remains to be clarified. The
416 identification of other elements of the engulfment machinery expressed by HPFs and the
417 characterization of their function in clearance of AC are within the scope of our future
418 investigations. Fibroblasts are known to secrete chemokines and cytokines involved in
419 leukocyte recruitment and/or activation, and there is accumulating data for a role of cancer-
420 associated fibroblasts in cancer progression through paracrine pressure (Karagiannis et al.,
421 2012; Harper and Sainson, 2014). Thus, studies are necessary to clarify how far cancer-
422 associated fibroblast-mediated efferocytosis might influence the antitumor-immune response
423 and tumor progression.

424 **Materials and Methods**

425 **Cell culture**

426 HeLa (HPV18 DNA-positive) and Ca Ski (HPV16 DNA-positive) cervical cancer cell
427 lines were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) and used
428 to generate early (EAC) or late (LAC) apoptotic cells. They were maintained as previously
429 described (Hirchaud et al., 2013).

430 HPFs were isolated from surgical residues of adult healthy human skin as previously
431 described (Gaiffe et al., 2012). The surgical residues were anonymized by Prof. Philippe
432 Humbert (Laboratory of engineering and cutaneous biology, UMR 1098, University Hospital,
433 Besançon, France). HPFs are not subject to validation from an ethics committee in accordance
434 with law L.1245-2 of the "Code de la Santé Publique" applicable in France. However, the
435 laboratory (Prof. Philippe Humbert) that provided HPFs has documents stating the patient's
436 non-opposition to the use of surgical residues for medical research in accordance with law
437 L.1211-2. None of the authors had any interaction with patients from whom the surgical
438 residues were collected. HPFs were grown at 37°C (5% CO₂) in complete DMEM L-
439 glutamine (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% fetal bovine serum (Lonza)
440 and 10×10^4 U/L penicillin/streptomycin (Lonza).

441 Blood samples were collected from healthy donors after regulatory approval of the local
442 ethics committee of Franche-Comté (CPP Est II, Besançon, France) and the French Ministry
443 of Higher Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
444 Recherche, agreement number # AC-2015-2408, May 22 2015). Signed informed consent was
445 obtained from these healthy donors (Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-
446 Comté, Besançon, France). Human monocytes were isolated and purified from peripheral
447 blood mononuclear cells of buffy coat using Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Orsay, France).
448 After isolation from peripheral blood mononuclear cells using a CD14⁺ selection kit
449 (Miltenyi Biotech, Paris, France), monocytes were differentiated into human monocyte-
450 derived macrophages (M ϕ) by culturing cells at 1×10^6 cells/mL in a 24-well plate for 7 days
451 in RPMI (Gibco, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and
452 50 ng/mL macrophage colony-stimulating factor (Miltenyi Biotech). Non-adherent cells were
453 removed by washing prior experiments.

454 Cells were routinely checked for mycoplasma contamination.

455 **Generation of apoptotic cells**

456 Twenty-four hours prior to apoptosis induction, cancer cells were seeded at 5×10^4
457 cells/cm² and apoptosis was induced with UV-B irradiation (UV cross-linker, Ultra-Violet
458 Products Ltd., Cambridge, UK) (20 mJ/cm²) followed by 300 nM staurosporine (STS; Sigma-
459 Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) treatment for the indicated time periods. Cells (viable
460 and apoptotic) were then washed twice thoroughly with PBS (Lonza) before apoptosis assays
461 and endocytosis assays described hereafter.

462

463 **Confocal microscopy**

464 **Apoptosis detection**

465 For imaging analysis, apoptotic cells (AC) were dropped on polysine® microscope slides
466 (ThermoScientific, Illkirch, France), washed with PBS and fixed with 3.7% (w/v)
467 paraformaldehyde (PFA; Sigma-Aldrich) for 10 min at room temperature (RT). DNA from
468 AC was stained with 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI;
469 Invitrogen, Life Technologies, St. Aubin, France) for 5 min at RT. After a last wash with
470 PBS, glass coverslips of 1.9 cm² (Dutscher, Brumath, France) were mounted on slides in
471 Vectashield Mounting Media for Fluorescence (VectorLabs, Burlingame, California, USA).
472 Cells were examined by fluorescent confocal microscopy using the Olympus FluoView 1000
473 (Olympus, Tokyo, Japan) with appropriate filter settings and 40X/1.0 or 100X/1.0 numeric
474 aperture oil objectives. Images were captured and data were generated using the Olympus
475 FluoView10-ASW (Version 4.2) software.

476 **Endocytosis assay**

477 HeLa and Ca Ski cells were fluorescently labeled with PKH67 (green) prior to apoptosis
478 induction according to the manufacturer's instructions (PKH67-Fluorescent Cell Linker Kits
479 for General Cell Membrane Labeling; Sigma-Aldrich). In brief, 10^7 HeLa or Ca Ski cells/mL
480 were washed in serum-free culture medium and resuspended in 2 mL PKH67-containing
481 Diluent C (2×10^{-6} M) for 4 min at RT. Non-labeled HPFs and Mφ (10^4 and 10^5 cells/cm²
482 respectively) were seeded on coverslips of 1.9 cm² in a 24-well plate. Then PKH67-labeled
483 AC were co-cultured with HPFs or Mφ at a 10:1 ratio for different time periods at 37°C in
484 500 μL DMEM according to our previous data (Gaiffe et al., 2012). Coverslips were washed
485 twice with PBS to remove the non-ingested AC. HPFs or Mφ were fixed with 3.7% (w/v)
486 PFA. F-actin was stained with phalloidin-tetramethylrhodamine-B-isothiocyanate (TRITC)
487 (Sigma-Aldrich) (2.5×10^{-2} g/L) for 30 min at 4°C and DNA was stained with 300 nM DAPI

488 for 5 min at RT. Cells were finally examined and images captured as described above. For
489 each condition, more than 200 HPFs or M ϕ were randomly observed and scored by two
490 independent blinded observers. The percentages of HPFs or M ϕ having ingested AC were
491 calculated.

492 Uptake of AC by HPFs was also investigated by position-referenced microscopy to track
493 the fate of HPFs exposed to AC, as previously described (Galeano et al., 2011). Briefly, 5-
494 (and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester- (CFDA, SE; Invitrogen) labeled AC
495 were incubated with PKH26-labeled HPFs for 11 h with an observation every hour. Images
496 recorded at different time points are superimposed in a common coordinate system with
497 subpixel accuracy.

498 **Fluorescent staining**

499 Fluorescence analyses were performed as described above using Cell Proliferation Dye
500 eFluor® 450 (eBioscience, San Diego, CA, USA), phalloidin-TRITC, rabbit monoclonal anti-
501 BAI1 (SC-66815 Anti-Mouse, Rat, Human, BAI-1 (H270), Santa Cruz Biotechnology, Inc.,
502 Dallas, Texas, USA), rabbit polyclonal anti-LC3A/B (#4108, Cell Signalling Technology,
503 Danvers, MA, USA), mouse anti-LAMP1 (CD107a, BD Pharmingen, BD Biosciences, Le
504 Pont de Claix, France) primary antibodies, and DAPI according to the manufacturer's
505 recommendations. For immunostaining, primary antibodies and goat-anti-rabbit-Alexa 488-
506 and donkey-anti-mouse-CyTM3- (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove,
507 PA, USA) conjugated secondary antibodies were used diluted at 1:100 and 1:250
508 respectively.

509

510 **Flow cytometry**

511 **Apoptosis detection**

512 For Sub-G1 analysis, cells were fixed overnight in ice-cold 70% ethanol. After washing
513 with PBS, cells were incubated with propidium iodide (PI; BD Pharmingen) (10 μ g/mL) in
514 PBS supplemented with DNase-free RNaseA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) (1
515 mg/mL) in darkness for 15 min at RT. The intracellular PI fluorescence intensities of 20,000
516 cells were measured for each sample using the FC500 flow cytometer (Beckman Coulter,
517 Orange County, CA, USA). The cytometry analyses were performed using CXP software
518 (Beckman Coulter). For the annexin V/PI apoptosis assay, the cells were stained with FITC
519 annexin V from Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) and PI in darkness for 15 min at

520 RT, resuspended in binding buffer and analyzed by flow cytometry according to the
521 manufacturer's instructions.

522 **Endocytosis assay**

523 HeLa and Ca Ski cells were labeled with PKH67 (green) prior to apoptosis and HPFs
524 were labeled with PKH26 (red) according to the manufacturer's instructions (PKH26-
525 Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling; Sigma-Aldrich). HPFs
526 were seeded at 10^4 cells/cm² in a 24-well plate. Then PKH67-labeled HeLa or Ca Ski were
527 co-cultured with 20,000 PKH26-labeled adherent HPFs at a 10:1 ratio for different time
528 periods in the conditions described previously (Gaiffe et al., 2012). HPFs incubated with AC
529 were harvested by trypsinization and engulfment was assayed using 2-color flow cytometry.
530 The percentage of PKH26-positive cells stained positive for PKH67 was considered as the
531 proportion of HPFs having ingested AC. Appropriate controls were performed to set the
532 cytometer for each color. When indicated, culture or co-culture conditions were modified
533 prior to endocytosis assays. A PS masking assay was performed to assess the contribution of
534 the PS exposed by late apoptotic cells (LAC) in their uptake by HPFs. Briefly, LAC were pre-
535 incubated in binding buffer with 40 or 160 μ g/mL unlabeled purified recombinant annexin V
536 (BD Pharmingen) at RT for 30 min, before being used in flow cytometry endocytosis assays.
537 To quantify the saturation rate of annexin V specific binding sites, a fraction of pre-incubated
538 cells were incubated with phycoerythrin (PE) annexin V (BD Pharmingen) at RT for 30 min.
539 Titration of blocked annexin V binding sites was performed by flow cytometry analysis.
540 HPFs were pre-incubated with EDTA (Lonza) (up to 2 mM), cytochalasin D (Sigma-Aldrich)
541 (up to 4 μ M), DMA (Sigma-Aldrich) (up to 80 μ M), chlorpromazine (Sigma-Aldrich) (up to
542 20 μ M) and nystatin (Sigma-Aldrich) (up to 20 μ M) at 37°C for 1 h before performing flow
543 cytometry endocytosis assays at 37°C (Ivanov, 2008). In additional experiments, HPFs were
544 co-incubated with apoptotic targets at 4°C. Moreover, BAI1 siRNA (On-TargetPlus SMART
545 pool; Dharmacon, Lafayette, CO, USA) and siRNA negative control (Eurogentec, Angers,
546 France) were introduced into HPFs by transfection (Lipofectamine® 2000; Life
547 Technologies) 48 h before exposure to LAC. In brief, 50 μ M siRNA were added to 2×10^4
548 cells incubated in Opti-MEM (Life Technologies). RNA was prepared to assess the level of
549 BAI1 expression by RT-qPCR analysis.

550 **RNA isolation and RT-qPCR analysis**

551 RNA was extracted from 10⁶ cells using the QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen,
552 Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. Contaminant
553 genomic DNA was removed by treatment with 0.2 U/μL of DNase I Amplification Grade
554 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) before reverse transcription with 500 ng of RNA using
555 the Superscript VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies).

556 Quantitation of BAI1, TIM-4, and human β-2-microglobulin (B2M) transcripts was
557 performed with a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies) in
558 the 1X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), using respectively the
559 Hs01105174_m1 and Hs00293316_m1 Assays-on-Demand™ (Applied Biosystems) or 500
560 nM of each primer (forward primer: 5'-GATGAGTATGCCTGCCGTGTG-3'; reverse primer:
561 5'-CAATCCAAATGCGGCATCT-3', Eurogentec) and 200 nM of probe (5'-6-FAM-
562 CCTCCATGATGCTGCTTACATGTCTCGATCCC-BHQ-1-3', Eurogentec) targeting the
563 B2M. RT-qPCR were performed in 20 μL of a reaction mixture containing 4 μL of diluted
564 cDNA (1:5) with 45 amplification cycles (95°C for 15 sec, 60°C for 1 min). Relative
565 quantitation of mRNA was performed according to the 2^{-ΔΔCt} method algorithm with B2M
566 serving as housekeeping control and 5 serial dilutions (1:10) cDNA from Mφ as calibrator.

567

568 **Western blotting**

569 Western blotting was performed as described previously (Gaiffe et al., 2012). Cells were
570 collected in RIPA lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40,
571 0.5% Na deoxycholate, 1 mM EDTA) containing anti-proteases (30 μg/mL) (Roche) and
572 proteins were extracted from whole cells. Protein concentrations were quantified using the
573 Biorad Protein Assay® (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) according to the
574 manufacturer's instructions. Thirty μg of proteins were boiled in Laemmli's buffer (BioRad
575 Laboratories) supplemented with 5% β-mercaptoethanol and run on 15% SDS-
576 polyacrylamide gel. Proteins were then electrotransferred onto Hybond™-P polyvinylidene
577 difluoride membranes (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Saclay, France), probed
578 overnight with rabbit polyclonal anti-LC3A/B (#4108) and mouse monoclonal anti-β-actin
579 (clone AC15, Sigma-Aldrich) diluted at 1:1000 or 1:10,000 respectively according to the
580 manufacturer's instructions. After washing, immune complexes were revealed with
581 horseradish peroxidase-conjugated- goat-anti-rabbit Ig and goat-anti-mouse Ig antibodies (BD
582 Biosciences) for 1 h diluted at 1:8000 or 1:20,000 respectively. The reaction was visualized

583 using ECL reagents (Pierce ECL2 Western Blotting Substrate, ThermoScientific) and images
584 were captured with a charge-coupled device camera of the imaging system Chemidoc XRS+
585 (Bio-Rad Laboratories). Band density was quantified by Image Lab software (Bio-Rad
586 Laboratories) and normalized to the loading control (β -actin). The values resulting from three
587 different experiments were expressed as LC3II/LC3I ratio normalized to the control value and
588 reported under the western blotting as mean values \pm standard deviation (SD).

589

590 **Statistical analysis**

591 Data are expressed as means \pm SD of at least nine measurements (corresponding to
592 experiments performed independently at least 3 times in triplicate). Data analysis was
593 performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA). Statistical
594 analysis was carried out using the Wilcoxon test. Significant differences between groups are
595 indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

596 **Acknowledgments**

597 We thank Gwenael Rolin and Marion Tissot for kindly providing human primary
598 fibroblasts. The authors are grateful to Virginie Mougey, Victor Mariez, Francis Bonnefoy,
599 Julie Frejaville, Sylvie Fauconnet, Aurélie Baguet, and Oliver Florey for their technical help
600 and advice. We are indebted to Fiona Ecartot (EA3920, Université de Franche-Comté,
601 France) for her thorough re-reading of this manuscript.

602

603 **Author Contributions**

604 Conceived and designed the experiments: FHe EJ EG JLP CM. Performed the experiments:
605 FHe EJ SL EG FHi. Analyzed the data: FHe EJ JLP CM. Contributed
606 reagents/materials/analysis tools: SL MC PS. Wrote the paper: FHe EJ JLP CM.

607 **References**

- 608 Albert, M.L., Kim, J.I. and Birge, R.B. (2000) alphavbeta5 integrin recruits the CrkII-
609 Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol.* **2**,899-905
- 610 Arandjelovic, S. and Ravichandran, K.S. (2015) Phagocytosis of apoptotic cells in
611 homeostasis. *Nat Immunol.* **16**,907-917
- 612 Bainbridge, P. (2013) Wound healing and the role of fibroblasts. *J Wound Care.* **22**,407-408,
613 410-412
- 614 Bergsmedh, A., Szeles, A., Henriksson, M., Bratt, A., Folkman, M.J., Spetz, A.L. and
615 Holmgren, L. (2001) Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies.
616 *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**,6407-6411
- 617 Borisenko, G.G., Iverson, S.L., Ahlberg, S., Kagan, V.E. and Fadeel, B. (2004) Milk fat
618 globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8) binds to oxidized phosphatidylserine:
619 implications for macrophage clearance of apoptotic cells. *Cell Death Differ.* **11**,943-945
- 620 Borisenko, G.G., Matura, T., Liu, S.X., Tyurin, V.A., Jianfei, J., Serinkan, F.B. and Kagan,
621 V.E. (2003) Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis
622 of apoptotic Jurkat cells--existence of a threshold. *Arch Biochem Biophys.* **413**,41-52
- 623 Campellone, K.G. and Welch, M.D. (2010) A nucleator arms race: cellular control of actin
624 assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**,237-251
- 625 Chiarugi, P. (2013) Cancer-associated fibroblasts and macrophages: Friendly conspirators for
626 malignancy. *Oncoimmunology.* **2**,e25563
- 627 Cocco, R.E. and Ucker, D.S. (2001) Distinct modes of macrophage recognition for apoptotic
628 and necrotic cells are not specified exclusively by phosphatidylserine exposure. *Mol Biol*
629 *Cell.* **12**,919-930
- 630 Cork, S.M. and Van Meir, E.G. (2011) Emerging roles for the BAI1 protein family in the
631 regulation of phagocytosis, synaptogenesis, neurovasculature, and tumor development. *J*
632 *Mol Med (Berl).* **89**,743-752
- 633 Dini, L., Lentini, A., Diez, G.D., Rocha, M., Falasca, L., Serafino, L. and Vidal-Vanaclocha,
634 F. (1995) Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. *J Cell Sci.* **108 (Pt**
635 **3)**,967-973
- 636 Dransfield, I., Zagorska, A., Lew, E.D., Michail, K. and Lemke, G. (2015) Mer receptor
637 tyrosine kinase mediates both tethering and phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Death*
638 *Dis.* **6**,e1646

639 Dutta, D. and Donaldson, J.G. (2012) Search for inhibitors of endocytosis: Intended
640 specificity and unintended consequences. *Cell Logist.* **2**,203-208

641 Ehnfors, J., Kost-Alimova, M., Persson, N.L., Bergsmedh, A., Castro, J., Levchenko-
642 Tegnebratt, T., Yang, L., Panaretakis, T. and Holmgren, L. (2009) Horizontal transfer of
643 tumor DNA to endothelial cells in vivo. *Cell Death Differ.* **16**,749-757

644 Erwig, L.P. and Henson, P.M. (2008) Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death*
645 *Differ.* **15**,243-250

646 Fadok, V.A., Bratton, D.L., Frasch, S.C., Warner, M.L. and Henson, P.M. (1998) The role of
647 phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.*
648 **5**,551-562

649 Fadok, V.A., Bratton, D.L. and Henson, P.M. (2001a) Phagocyte receptors for apoptotic cells:
650 recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest.* **108**,957-962

651 Fadok, V.A., de Cathelineau, A., Daleke, D.L., Henson, P.M. and Bratton, D.L. (2001b) Loss
652 of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for
653 phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem.* **276**,1071-
654 1077

655 Fairn, G.D. and Grinstein, S. (2012) How nascent phagosomes mature to become
656 phagolysosomes. *Trends Immunol.* **33**,397-405

657 Flannagan, R.S., Canton, J., Furuya, W., Glogauer, M. and Grinstein, S. (2014) The
658 phosphatidylserine receptor TIM4 utilizes integrins as coreceptors to effect phagocytosis.
659 *Mol Biol Cell.* **25**,1511-1522

660 Florey, O., Kim, S.E., Sandoval, C.P., Haynes, C.M. and Overholtzer, M. (2011) Autophagy
661 machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single
662 membranes. *Nat Cell Biol.* **13**,1335-1343

663 Florey, O. and Overholtzer, M. (2012) Autophagy proteins in macroendocytic engulfment.
664 *Trends Cell Biol.* **22**,374-380

665 Gaiffe, E., Pretet, J.L., Launay, S., Jacquin, E., Saunier, M., Hetzel, G., Oudet, P. and
666 Mougin, C. (2012) Apoptotic HPV positive cancer cells exhibit transforming properties.
667 *PLoS One.* **7**,e36766

668 Galeano, Z.J., Sandoz, P., Gaiffe, E., Launay, S., Robert, L., Jacquot, M., Hirchaud, F., Pretet,
669 J.L. and Mougin, C. (2011) Position-referenced microscopy for live cell culture
670 monitoring. *Biomed Opt Express.* **2**,1307-1318

671 Hall, S.E., Savill, J.S., Henson, P.M. and Haslett, C. (1994) Apoptotic neutrophils are
672 phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and
673 involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J Immunol.* **153**,3218-3227

674 Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (2002)
675 Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature.* **417**,182-187

676 Harper, J. and Sainson, R.C. (2014) Regulation of the anti-tumour immune response by
677 cancer-associated fibroblasts. *Semin Cancer Biol.* **25**,69-77

678 Hirchaud, F., Hermetet, F., Ablise, M., Fauconnet, S., Vuitton, D.A., Pretet, J.L. and Mouglin,
679 C. (2013) Isoliquiritigenin induces caspase-dependent apoptosis via downregulation of
680 HPV16 E6 expression in cervical cancer Ca Ski cells. *Planta Med.* **79**,1628-1635

681 Hochreiter-Hufford, A. and Ravichandran, K.S. (2013) Clearing the dead: apoptotic cell
682 sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*
683 **5**,a008748

684 Hochreiter-Hufford, A.E., Lee, C.S., Kinchen, J.M., Sokolowski, J.D., Arandjelovic, S., Call,
685 J.A., Klibanov, A.L., Yan, Z., Mandell, J.W. and Ravichandran, K.S. (2013)
686 Phosphatidylserine receptor BAI1 and apoptotic cells as new promoters of myoblast
687 fusion. *Nature.* **497**,263-267

688 Hoffmann, P.R., deCathelineau, A.M., Ogden, C.A., Leverrier, Y., Bratton, D.L., Daleke,
689 D.L., Ridley, A.J., Fadok, V.A. and Henson, P.M. (2001) Phosphatidylserine (PS) induces
690 PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell*
691 *Biol.* **155**,649-659

692 Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavolgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I. and Falk, K.I.
693 (1999) Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood.* **93**,3956-
694 3963

695 Ivanov, A.I. (2008) Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to
696 be useful? *Methods Mol Biol.* **440**,15-33

697 Karagiannis, G.S., Poutahidis, T., Erdman, S.E., Kirsch, R., Riddell, R.H. and Diamandis,
698 E.P. (2012) Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both
699 paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol Cancer Res.* **10**,1403-1418

700 Kaur, B., Brat, D.J., Devi, N.S. and Van Meir, E.G. (2005) Vasculostatin, a proteolytic
701 fragment of brain angiogenesis inhibitor 1, is an antiangiogenic and antitumorigenic
702 factor. *Oncogene.* **24**,3632-3642

703 Kinchen, J.M. and Ravichandran, K.S. (2008) Phagosome maturation: going through the acid
704 test. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**,781-795

705 Kobayashi, N., Karisola, P., Pena-Cruz, V., Dorfman, D.M., Jinushi, M., Umetsu, S.E., Butte,
706 M.J., Nagumo, H., Chernova, I., Zhu, B., Sharpe, A.H., Ito, S., Dranoff, G., Kaplan, G.G.,
707 Casasnovas, J.M., Umetsu, D.T., Dekruyff, R.H. and Freeman, G.J. (2007) TIM-1 and
708 TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells.
709 *Immunity*. **27**,927-940

710 Krysko, D.V., D'Herde, K. and Vandenabeele, P. (2006a) Clearance of apoptotic and necrotic
711 cells and its immunological consequences. *Apoptosis*. **11**,1709-1726

712 Krysko, D.V., Denecker, G., Festjens, N., Gabriels, S., Parthoens, E., D'Herde, K. and
713 Vandenabeele, P. (2006b) Macrophages use different internalization mechanisms to clear
714 apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ*. **13**,2011-2022

715 Kuhn, S. and Geyer, M. (2014) Formins as effector proteins of Rho GTPases. *Small GTPases*.
716 **5**,e29513

717 Lauber, K., Blumenthal, S.G., Waibel, M. and Wesselborg, S. (2004) Clearance of apoptotic
718 cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell*. **14**,277-287

719 Martinez, J., Almendinger, J., Oberst, A., Ness, R., Dillon, C.P., Fitzgerald, P., Hengartner,
720 M.O. and Green, D.R. (2011) Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-
721 associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc Natl*
722 *Acad Sci U S A*. **108**,17396-17401

723 Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T. and Nagata, S. (2007)
724 Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*. **450**,435-439

725 Monks, J., Rosner, D., Geske, F.J., Lehman, L., Hanson, L., Neville, M.C. and Fadok, V.A.
726 (2005) Epithelial cells as phagocytes: apoptotic epithelial cells are engulfed by mammary
727 alveolar epithelial cells and repress inflammatory mediator release. *Cell Death Differ*.
728 **12**,107-114

729 Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V.A.
730 and Henson, P.M. (2001) C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface
731 calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp*
732 *Med*. **194**,781-795

733 Park, D., Tosello-Tramont, A.C., Elliott, M.R., Lu, M., Haney, L.B., Ma, Z., Klibanov, A.L.,
734 Mandell, J.W. and Ravichandran, K.S. (2007) BAI1 is an engulfment receptor for
735 apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature*. **450**,430-434

736 Park, S.Y., Jung, M.Y., Kim, H.J., Lee, S.J., Kim, S.Y., Lee, B.H., Kwon, T.H., Park, R.W.
737 and Kim, I.S. (2008) Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane
738 phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ*. **15**,192-201

739 Parnaik, R., Raff, M.C. and Scholes, J. (2000) Differences between the clearance of apoptotic
740 cells by professional and non-professional phagocytes. *Curr Biol.* **10**,857-860

741 Parsonage, G., Filer, A.D., Haworth, O., Nash, G.B., Rainger, G.E., Salmon, M. and Buckley,
742 C.D. (2005) A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol.* **26**,150-156

743 Patel, V.A., Lee, D.J., Feng, L., Antoni, A., Lieberthal, W., Schwartz, J.H., Rauch, J., Ucker,
744 D.S. and Levine, J.S. (2010) Recognition of apoptotic cells by epithelial cells: conserved
745 versus tissue-specific signaling responses. *J Biol Chem.* **285**,1829-1840

746 Pollard, T.D. (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins.
747 *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **36**,451-477

748 Poon, I.K., Hulett, M.D. and Parish, C.R. (2010) Molecular mechanisms of late
749 apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ.* **17**,381-397

750 Sanjuan, M.A., Dillon, C.P., Tait, S.W., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M.,
751 Tanaka, K., Cleveland, J.L., Withoff, S. and Green, D.R. (2007) Toll-like receptor
752 signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature.*
753 **450**,1253-1257

754 Savill, J. and Fadok, V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.*
755 **407**,784-788

756 Savill, J., Hogg, N., Ren, Y. and Haslett, C. (1992) Thrombospondin cooperates with CD36
757 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing
758 apoptosis. *J Clin Invest.* **90**,1513-1522

759 Segawa, K., Suzuki, J. and Nagata, S. (2011) Constitutive exposure of phosphatidylserine on
760 viable cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**,19246-19251

761 Shen, Q., He, B., Lu, N., Conradt, B., Grant, B.D. and Zhou, Z. (2013) Phagocytic receptor
762 signaling regulates clathrin and epsin-mediated cytoskeletal remodeling during apoptotic
763 cell engulfment in *C. elegans*. *Development.* **140**,3230-3243

764 Silva, M.T. (2010) Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic
765 program. *FEBS Lett.* **584**,4491-4499

766 Stephenson, J.R., Purcell, R.H. and Hall, R.A. (2014) The BAI subfamily of adhesion
767 GPCRs: synaptic regulation and beyond. *Trends Pharmacol Sci.* **35**,208-215

768 Swanson, J.A. (2008) Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell*
769 *Biol.* **9**,639-649

770 Swanson, J.A. and Watts, C. (1995) Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* **5**,424-428

771 Tjelle, T.E., Lovdal, T. and Berg, T. (2000) Phagosome dynamics and function. *Bioessays.*
772 **22**,255-263

773 Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. and Brown, R.A. (2002)
774 Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol*
775 *Cell Biol.* **3**,349-363

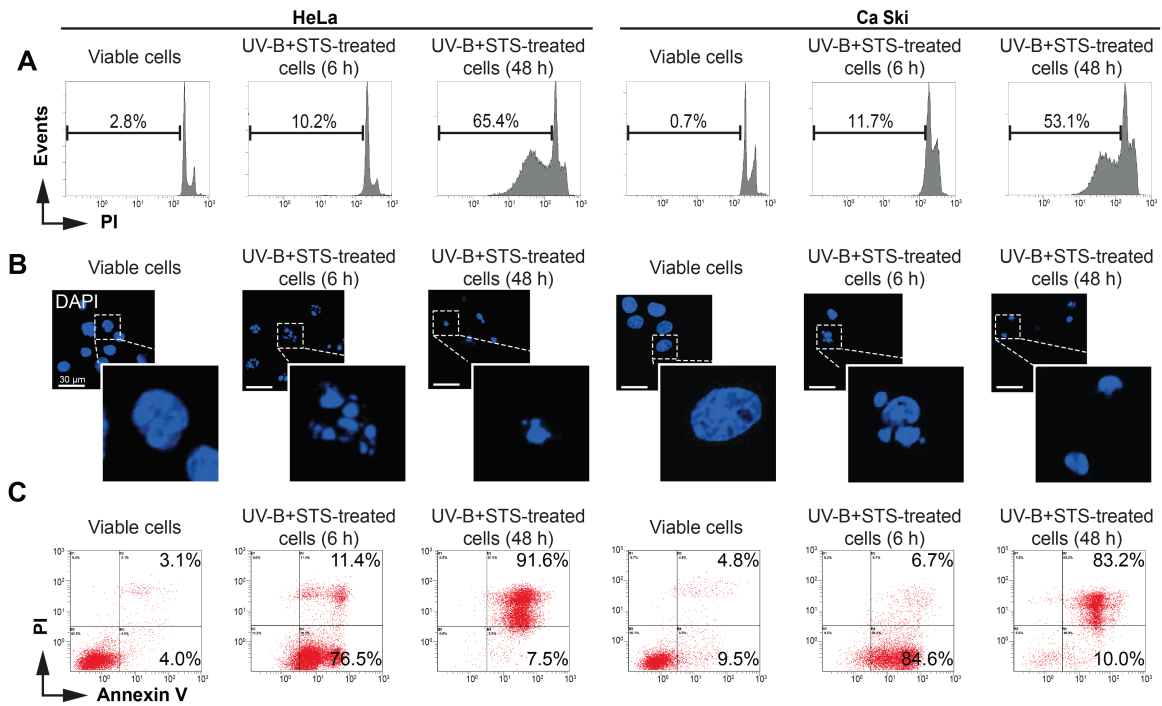
776 Unger, E.R., Vernon, S.D., Hewan-Lowe, K.O., Lee, D.R., Thoms, W.W. and Reeves, W.C.
777 (1999) An unusual cervical carcinoma showing exception to epitheliotropism of human
778 papillomavirus. *Hum Pathol.* **30**,483-485

779 Wagner, B.J., Lindau, D., Ripper, D., Stierhof, Y.D., Glatzle, J., Witte, M., Beck, H.,
780 Keppeler, H., Lauber, K., Rammensee, H.G. and Konigsrainer, A. (2011) Phagocytosis of
781 dying tumor cells by human peritoneal mesothelial cells. *J Cell Sci.* **124**,1644-1654

782 Xu, W., Roos, A., Schlagwein, N., Woltman, A.M., Daha, M.R. and van Kooten, C. (2006)
783 IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood.* **107**,4930-
784 4937

785

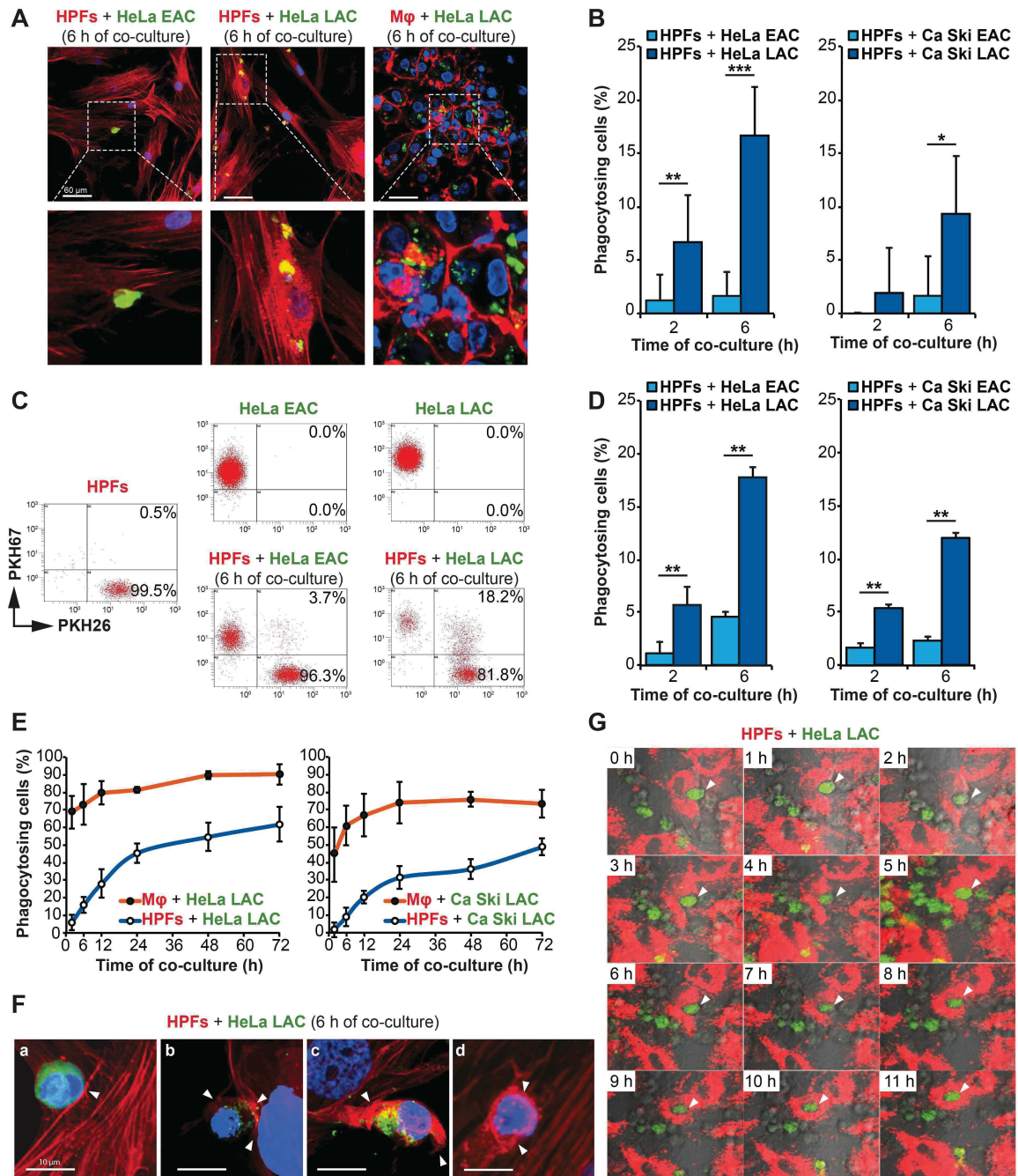
786 **Figures**



787

788 **Figure 1. Generation of early and late apoptotic cancer cells.**

789 **(A)** Sub-G1 analysis of HeLa (left panel) and Ca Ski (right panel) cells treated by UV
 790 irradiation and staurosporine (STS). The percentages of cells showing hypodiploid DNA
 791 content (Sub-G1 peak) are indicated. The graphs are representative of 3 independent
 792 experiments in triplicate. **(B)** Nuclear fragmentation observed by fluorescent microscopy after
 793 DAPI staining. Images are representative of 3 independent assays. Bar = 30 μm. **(C)** Early
 794 apoptosis and late apoptosis were respectively assessed by single cell staining with annexin V
 795 and double cell staining with annexin V and PI. The dot plots are representative of 3
 796 independent assays in triplicate.

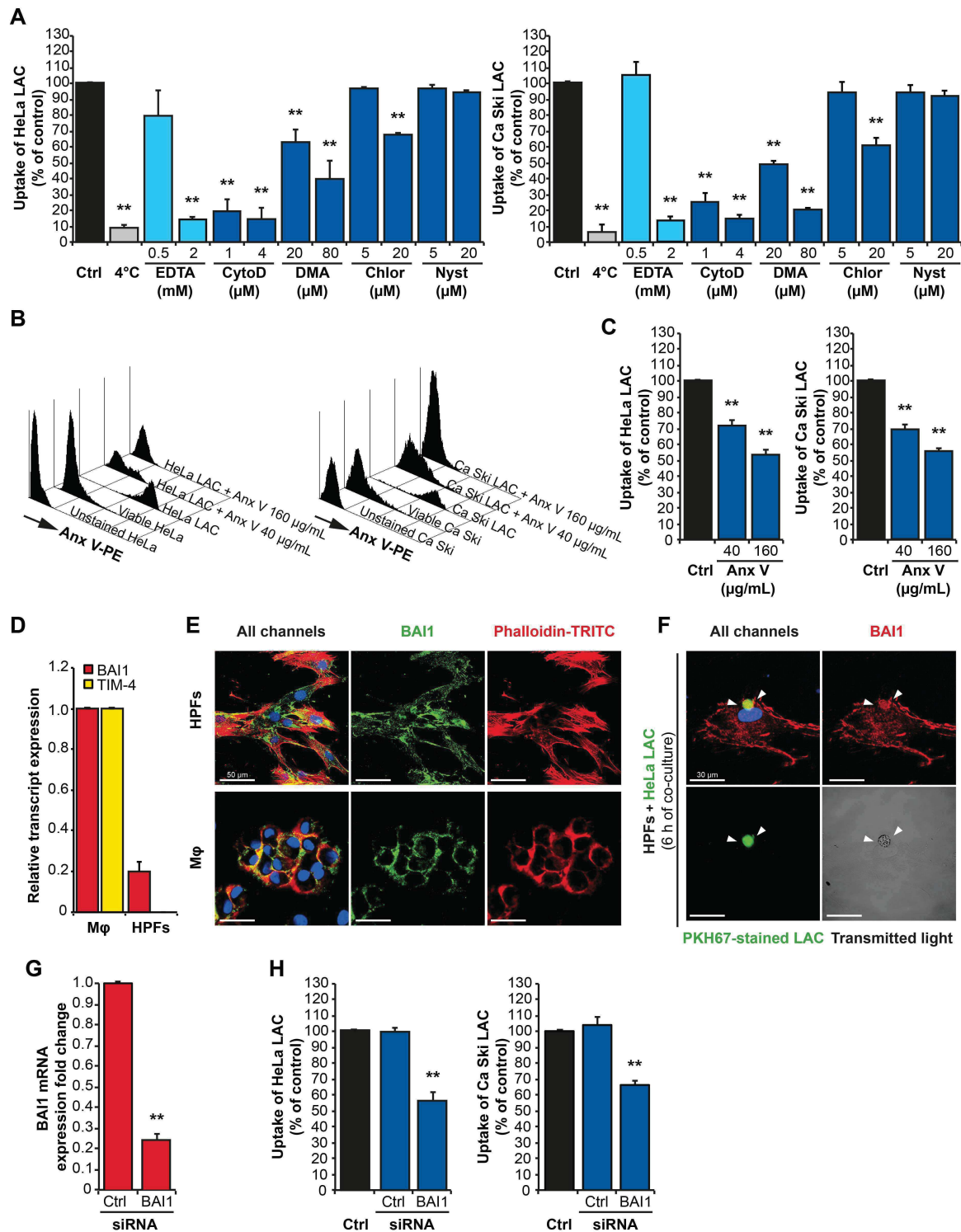


797

798 **Figure 2. Uptake of apoptotic cells by HPFs occurs in a time- and stage-dependent**
 799 **manner.**

800 (A) The binding and uptake of PKH67-labeled HeLa EAC and LAC (green) by HPFs (left
 801 and middle panel respectively) or Mφ (right panel) were investigated by confocal microscopy.
 802 The nuclei and actin cytoskeleton were respectively stained with DAPI (blue) and TRITC-
 803 conjugated phalloidin (red). Images are representative of 3 independent assays. Bar = 60 μm.
 804 (B) Quantitative assessments (means ± SD) of HeLa (left panel) or Ca Ski (right panel) EAC-
 805 and LAC-engulfment by HPFs based on confocal microscopy analyses (3 independent
 806 assays). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. (C) Representative dot plots for HPFs, HeLa

807 EAC, HeLa LAC and HeLa AC-phagocytosing HPFs. The percentages of phagocytosing
808 HPFs (PKH26⁺/PKH67⁺) and non-phagocytosing HPFs (PKH26⁺/PKH67⁻) indicated in their
809 respective quadrants were determined by flow cytometry as described in Materials and
810 Methods. **(D)** Quantitative analyses (means \pm SD) of HeLa (left panel) or Ca Ski (right panel)
811 EAC- and LAC-engulfment by HPFs based on flow cytometry analyses (3 independent assays
812 in triplicate). ** $p < 0.01$. **(E)** Uptake kinetics of HeLa (left panel) or Ca Ski (right panel)
813 LAC by HPFs and M ϕ based on confocal microscopy analyses. **(F)** Morphological analysis of
814 the uptake of PKH67-labeled (*green*) HeLa LAC by HPFs. Arrowheads point to the
815 remodeling of the actin cytoskeleton labeled with TRITC-conjugated phalloidin (*red*). Bar =
816 10 μ m. **(G)** Sequence of images obtained by position-referenced microscopy illustrating
817 engulfment of a HeLa LAC (arrow) stained with CFDA, SE (*green*) by PKH26-labeled (*red*)
818 adherent HPFs. A time-lapse version of G is given in Video S1.

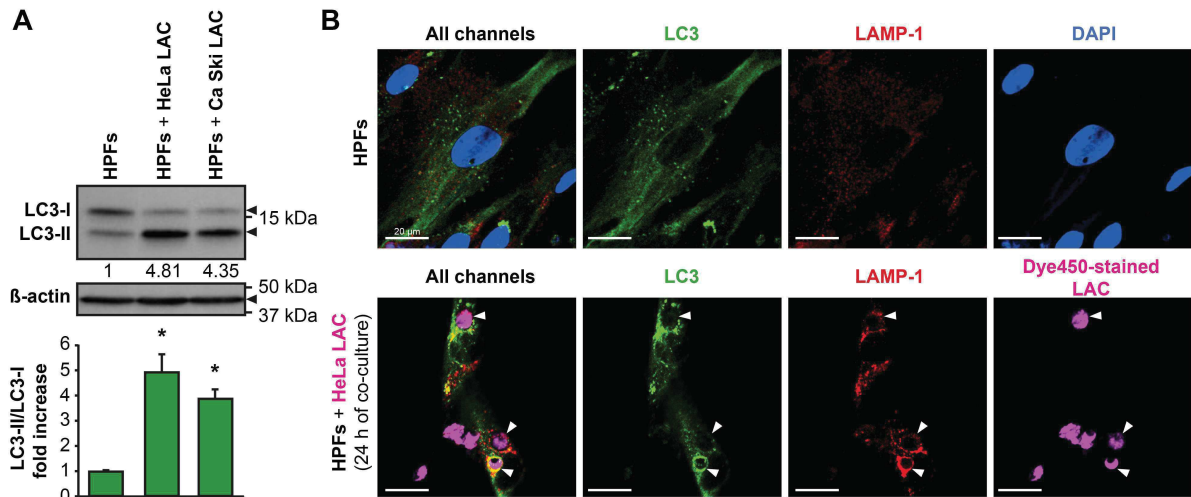


819

820 **Figure 3. Involvement of phosphatidylserine and BAI1 receptor in the uptake of late**
 821 **apoptotic cells by HPFs.**

822 (A) Uptake of HeLa LAC (left panel) or Ca Ski LAC (right panel) by HPFs preincubated at
 823 4°C or with EDTA, cytochalasin D (CytoD), DMA, chlorpromazine (Chlor) and nystatin
 824 (Nyst). Data were obtained by flow cytometry and are means ± SD of 3 independent assays in
 825 triplicate. ** p < 0.01; compared to control. (B) Dose-dependent PS masking of HeLa (left

826 panel) or Ca Ski (right panel) LAC by preincubation with unlabeled annexin V (Anx V). The
827 graphs are representative of 3 independent experiments in triplicate. **(C)** Uptake of PKH67-
828 labeled HeLa (left panel) or Ca Ski (right panel) LAC preincubated with or without (Ctrl)
829 unlabeled annexin V (Anx V). Data were obtained by flow cytometry and are means \pm SD of
830 3 independent assays in triplicate. ** $p < 0.01$; compared to control. **(D)** Expression of BAI1
831 and TIM-4 mRNA in HPFs and M ϕ . Data are normalized to M ϕ and are means \pm SD of 3
832 independent assays in triplicate. **(E)** BAI1 subcellular localization (Alexa Fluor 488 signal,
833 *green*) in HPFs and in M ϕ . Bar = 50 μ m. **(F)** BAI1 accumulation (Cy3 signal, *red*) within the
834 phagocytic cup (arrows) containing PKH67-labeled HeLa LAC (*green*). Bar = 30 μ m. Images
835 are representative of 3 independent assays. **(G)** BAI1 mRNA quantitation in siRNA BAI1 and
836 siRNA control (Ctrl) transfected HPFs. Data are means \pm SD of 3 independent assays in
837 triplicate. ** $p < 0.01$. **(H)** Uptake of PKH67-labeled HeLa (left panel) or Ca Ski (right panel)
838 LAC by siRNA BAI1 and siRNA control (Ctrl) transfected HPFs. Data were obtained by flow
839 cytometry and are means \pm SD of 3 independent assays in triplicate. ** $p < 0.01$; compared to
840 control.



841

842 **Figure 4. Uptake of late apoptotic cells by HPFs induces LC3 lipidation onto the**
 843 **macroendocytic vacuoles.**

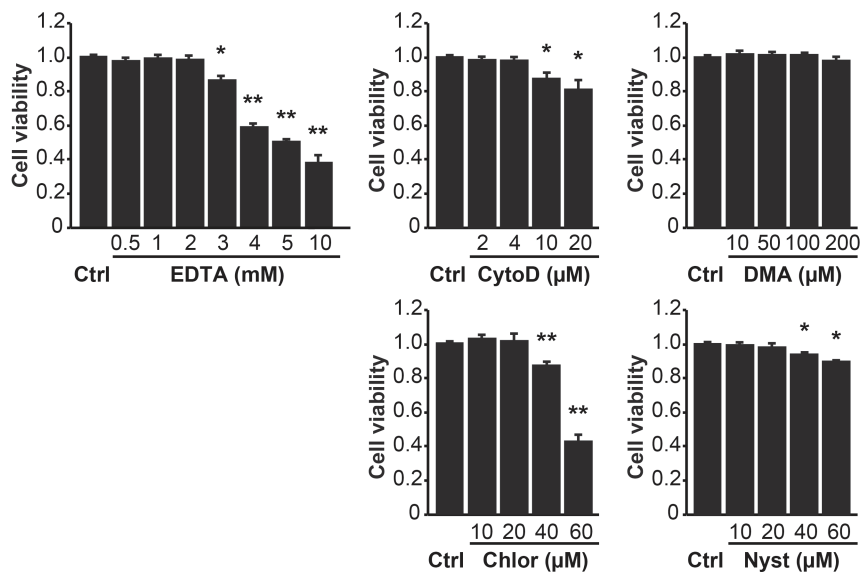
844 **(A)** Immunoblots of LC3 and β -actin were performed to evaluate LC3 lipidation in HPFs and
 845 in HPFs co-cultured with HeLa and Ca Ski LAC. The values of the densitometric analysis
 846 were normalized and expressed as fold increase. In the lower panel, bar charts represent the
 847 mean \pm SD of 6 determinations. * $p < 0.05$; compared to HPFs. **(B)** Colocalization of LC3
 848 (Alexa Fluor 488 signal, *green*) and LAMP-1 (Cy3 signal, *red*) to the membrane of Cell
 849 Proliferation Dye eFluor® 450-labeled (*purple*) HeLa LAC-containing vacuoles (arrows) in
 850 HPFs. Images are representative of 3 independent assays. Bar = 20 μ m.

851 **Supplementary Material**

852 **Video S1. The HPF delays ingestion of an apoptotic corpse for hours after recognizing it.**

853 The video combines a sequence of images - obtained by confocal fluorescence microscopy
854 and phase contrast imaging - obtained from a co-culture between CFDA, SE -labeled (*green*)
855 HeLa LAC and PKH26-labeled (*red*) adherent HPFs observed at time intervals of one hour
856 over a period of 11 h.

857



858

859 **Figure S1. Viability of HPFs.**

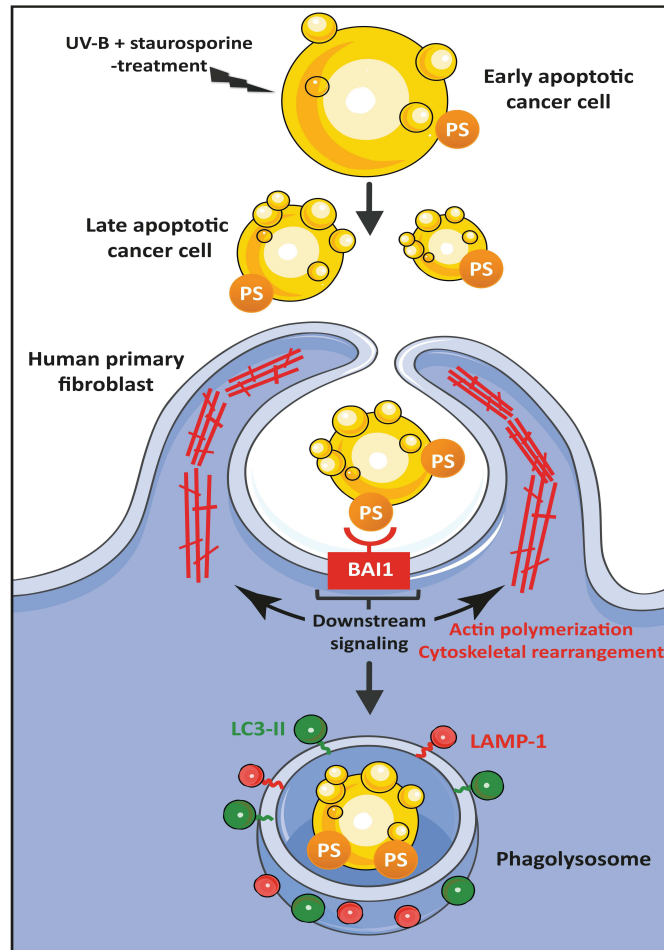
860 Viability of HPFs treated or not (Ctrl) with increasing concentrations of EDTA, cytochalasin
861 D (CytoD), DMA, chlorpromazine (Chlor) and nystatin (Nyst) was assessed using MTT
862 assay. Data are means \pm SD of 3 independent assays in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$;
863 compared to control.

864

865 **Method S1. Cell viability assay.**

866 HPFs were seeded in 96-well plates (3000 cells/well) with 100 μ L of complete medium/well
867 24 h prior to EDTA or chemical inhibitors of endocytosis treatment and incubated for 6 h at
868 37°C. Then 10 μ L (5 mg/mL) of MTT (Cell Proliferation Kit I, Roche Diagnostics, Meylan,
869 France) solution was added to each well. After 4 h, 100 μ L of solubilization solution (10%
870 SDS in 0.01 M HCl) were added to each well, and cells were incubated overnight.
871 Absorbance at 572 nm wavelength was measured with a 650 nm reference wavelength using
872 the scanning multiwall spectrofluorimeter EnVision 2012 Multilabel Reader.

873 **Graphical Abstract:** The underlying mechanisms of fibroblast-mediated efferocytosis are
874 not well understood. Here we demonstrate that non-professional phagocytes engulf
875 subcellular fragments rather than dying whole cells requiring the recognition of
876 phosphatidylserine (PS) by receptor Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 1 (BAI1) and actin
877 cytoskeleton remodeling. Lysosomal-associated membrane protein-1 (LAMP-1) and
878 microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) colocalise on apoptotic cell-containing
879 phagosomes.



880

2.1.2. Travaux complémentaires : Caractérisation des mécanismes d'internalisation des cellules en apoptose précoce/mourantes et suivi de l'avancement du processus de mort au cours du temps

Selon les recommandations récentes de la NCCD, l'apoptose est un processus dynamique comprenant une étape précoce au cours de laquelle les cellules mourantes se caractérisent par l'exposition de PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique, suivie d'une étape tardive au cours de laquelle les cellules mortes présentent non seulement une exposition des PS mais aussi une perte de leur intégrité membranaire (4). Indépendamment du type cellulaire HeLa ou Ca Ski, les résultats de la publication 2 ont démontré la propension des fibroblastes primaires humains (HPFs pour *Human Primary Fibroblasts*) à la capture de cellules apoptotiques à un degré de mort avancé (LAC pour *Late Apoptotic/Dead Cells*) comparativement aux cellules mourantes/en apoptose précoce (EAC pour *Early Apoptotic/Dying Cells*). Bien que l'objet de la publication 2 était de caractériser la capture des LAC par les HPFs, l'étude de la capture des EAC a été menée parallèlement.

2.1.2.1. Objectifs

Pour caractériser les mécanismes d'internalisation possiblement distincts utilisés par les HPFs pour capturer les EAC comparativement à ceux mis en jeu pour la capture des LAC, des analyses de capture en cytométrie en flux ont été menées en faisant varier les conditions de co-culture comme décrit dans la publication 2 (température, ajout d'agents pharmacologiques). Un suivi de l'évolution du degré de mort parmi les cellules de la suspension nommée EAC a aussi été réalisé en contrôlant au cours du temps la perte d'intégrité membranaire qui reflète la transition des cellules de l'apoptose précoce à tardive. Cette étude a été réalisée à partir de méthodes décrites dans la publication 2.

2.1.2.2. Résultats

Une diminution du taux de capture des EAC par les HPFs a été déterminée pour les co-cultures réalisées à 4°C, et de manière dose-dépendante en présence d'EDTA, de cytochalasine D et de diméthyle amiloride (Figure 22). Ces effets sur l'inhibition de la capture suggèrent la mise en œuvre d'un processus actif dépendant d'un apport d'énergie (ATP) et d'ions bivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) et impliquant un mécanisme de phagocytose, vraisemblablement de type "*macropinocytotic mechanism*", et/ou de macropinocytose. Ces résultats étant similaires à ceux obtenus lors de l'étude de la capture de LAC (cf. Résultats, Publication 2), les mécanismes d'internalisation qui régissent la capture de cellules en apoptose précoce (EAC) et tardive (LAC) sont vraisemblablement les mêmes.

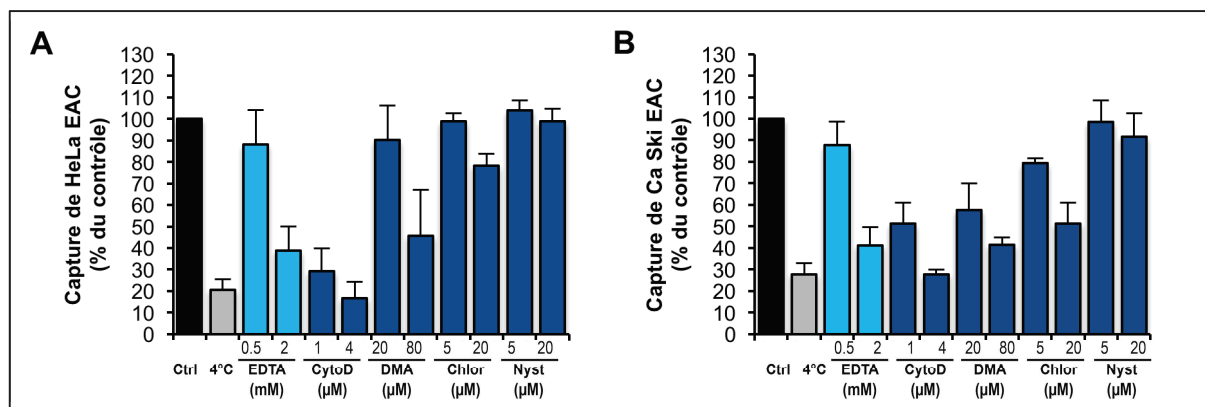


Figure 22 : L'internalisation des cellules en apoptose précoce (EAC) par les fibroblastes primaires humains (HPFs) est inhibée à 4°C et en présence d'EDTA, de cytochalasine D et de diméthyle amiloride

Les cellules EAC (A) HeLa et (B) Ca Ski marquées au PKH67 ont été co-cultivées 6h avec des HPFs marqués au PKH26 et pré-incubés 1h avant la co-culture à 4°C ou avec de l'EDTA, cytochalasine D (CytoD), diméthyle amiloride (DMA), chlorpromazine (Chlor) ou nystatine (Nyst). Les différentes conditions de traitement ont été maintenues au cours des 6h de co-culture, puis les cellules ont été collectées et analysées par cytométrie en flux. Les données représentent les moyennes \pm SD de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Lors du suivi au cours du temps de l'évolution du degré de mort de la suspension de cellules apoptotiques EAC, le pourcentage des cellules initialement caractérisées par un marquage majoritairement positif pour l'annexine V (Anx V) et négatif pour l'iodure de propidium (IP) à t+0h (76,5% et 84,5% pour HeLa et Ca Ski respectivement) diminue faiblement pendant 24h, puis de manière importante à t+48h (44,2% et 16,6% pour HeLa et Ca Ski respectivement) de culture au profit des cellules caractérisées par un marquage majoritairement Anx V+/IP+ (52,2% et 77,8% pour HeLa et Ca Ski respectivement) (Figure 23). La perte d'intégrité membranaire des cellules apoptotiques de la suspension EAC observée principalement à partir de t+12h reflète la transition des cellules progressant du stade apoptose précoce au stade apoptose tardive.

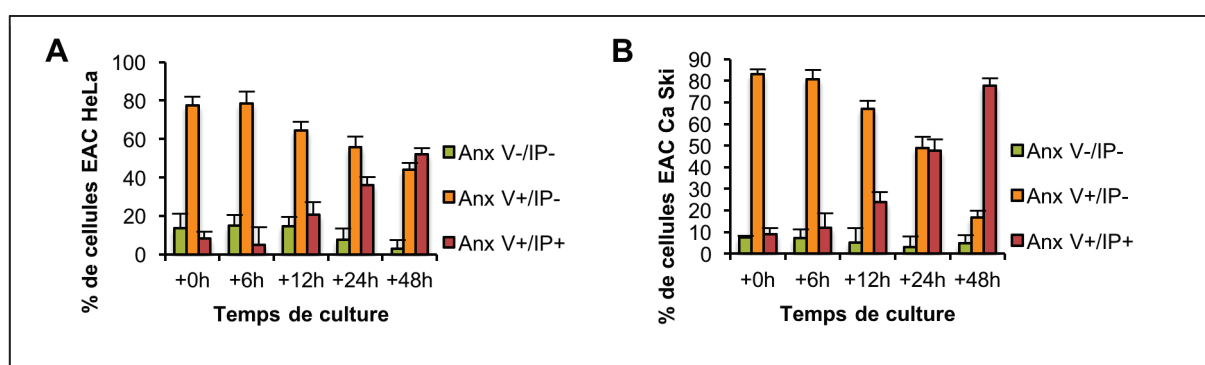


Figure 23 : Avancement du processus de mort des cellules en apoptose précoce (EAC) au cours du temps

Les cellules EAC (A) HeLa et (B) Ca Ski préalablement obtenues pour les manipulations de co-culture ont été remises en culture puis collectées à t+0, 6, 12, 24 ou 48h, marquées par l'annexine V (Anx V) et par l'iodure de propidium (IP) et analysées par cytométrie en flux. Les données représentent les moyennes \pm SD de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicat.

2.1.2.3. Conclusion

En comparaison avec les résultats obtenues à partir de LAC (cf. Résultats, Publication 2), les effets comparables des drogues testées sur la capture par les HPFs de EAC suggèrent deux hypothèses : soit (i) les mécanismes d'internalisation mis en jeu sont similaires pour les suspensions cellulaires apoptotiques EAC et LAC, indépendamment de la vitesse d'exécution plus faible pour la capture des premiers ; soit (ii) le pourcentage de capture très limité pouvant apparaître lors de la co-culture de HPFs avec EAC reflète uniquement la capture de la très faible proportion, mais néanmoins existante (<10% pour HeLa et Ca Ski), de cellules en apoptose tardives présentes dans cette suspension de cellules majoritairement caractérisées en apoptose précoce. Aucune de ces deux possibilités n'est à exclure, bien que les analyses de l'évolution du degré de mort de la suspension EAC semblent être en faveur de la seconde hypothèse. Ainsi, l'augmentation de l'internalisation au cours du temps observée lors des cinétiques de capture pourrait être associée, au moins en partie, à la progression du processus apoptotique et donc à l'apparition de cellules mortes (LAC) pendant les co-cultures.

2.1.3. Travaux complémentaires : Confirmation de l'expression de BAI1 dans les fibroblastes primaires humains et les macrophages dérivés de monocytes humains et validation de la spécificité de l'anticorps BAI1 H270

2.1.3.1. Objectifs

Afin de confirmer l'expression de BAI1 dans les HPFs nous avons validé la spécificité de l'anticorps commercial H270 pour détecter la protéine BAI1 à partir de diverses lignées cellulaires disponibles au laboratoire.

2.1.3.2. Résultats

L'expression des transcrits BAI1 a été analysée à partir d'ARN totaux extrait des HPFs, de macrophages dérivés de monocytes humains (Mφ), mais aussi de cellules MCF-7 dérivées de cancer du sein et de cellules HeLa. Les étapes de transcription inverse (RT pour *reverse transcriptase*) et de *polymerase chain reaction* (PCR) ont été réalisées selon les méthodes décrites dans la publication 2 à l'aide de trousse commerciales (*Assay on Demand*, Applied Biosystems). L'analyse des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose a démontré que les cellules MCF-7 expriment l'ARNm codant le récepteur BAI1 tout comme les cellules HPFs et Mφ. Les cellules HeLa ne l'expriment pas, elles ont été définies comme un témoin négatif d'expression de BAI1 (Figure 24A). Les cellules exprimant (MCF-7) ou non (HeLa) l'ARNm de BAI1 ont été utilisées pour tester la spécificité de l'anticorps H270 (Santa-Cruz) pour la détection des protéines BAI1 en accord avec les

recommandations du fournisseur et dans les conditions décrites dans la publication 2. L'utilisation de l'anticorps H270 pour des expériences d'immunofluorescence a révélé un marquage ponctiforme et non uniformément distribué à la membrane des cellules MCF-7 (Figure 24B), des HPFs et des M ϕ (cf. Résultats, Publication 2). En revanche, aucun marquage n'a été obtenu à partir des cellules HeLa (Figure 24B), suggérant la spécificité de cet anticorps pour la protéine BAI1.

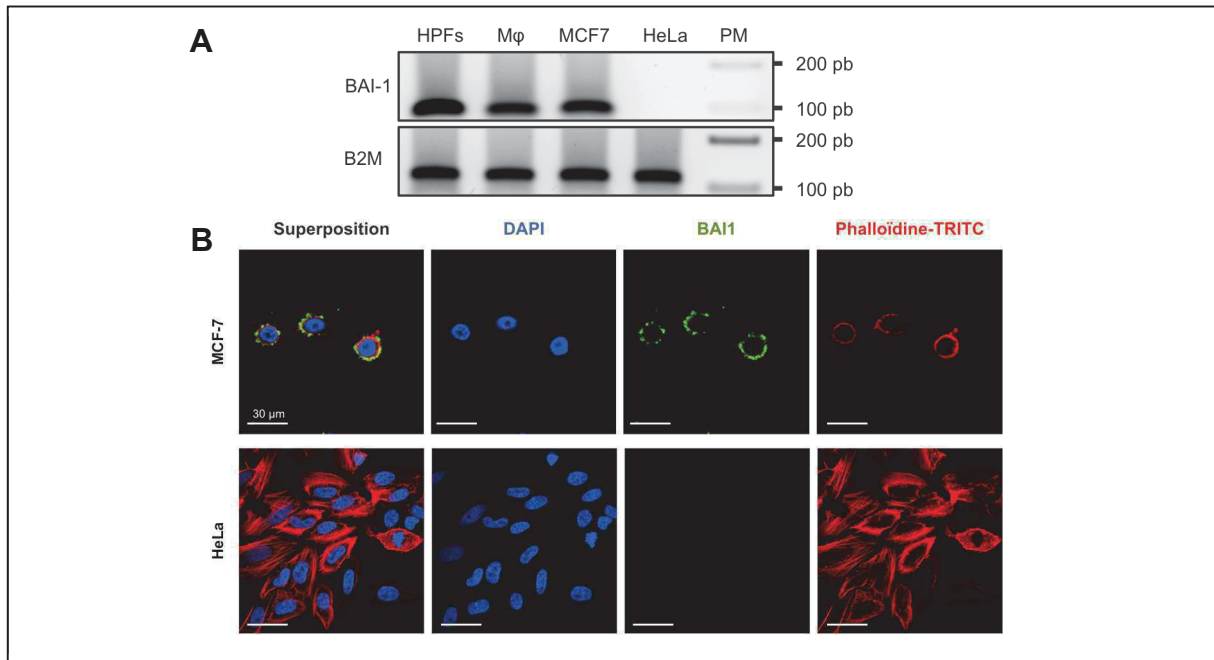


Figure 24 : Confirmation de l'expression de BAI1 dans les fibroblastes primaires humains (HPFs) et validation de la spécificité de l'anticorps BAI1 H270

(A) La détection par RT-PCR des ARNm codant le récepteur aux phosphatidylsérines BAI1 et la β -2-microglobuline (B2M) humains a été réalisée à partir de HPFs, de macrophages dérivés de monocytes humains (M ϕ), de cellules MCF-7 et HeLa. L'analyse des produits d'amplification de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose est représentative de 3 expériences indépendantes. **(B)** La détection par immunofluorescence de la protéine BAI1 a été réalisée, à l'aide de l'anticorps BAI1 H270, à partir de cellules MCF-7 et HeLa dont les microfilaments d'actine et les noyaux ont été respectivement marqués par la phalloïdine-TRITC et le DAPI. Les cellules M ϕ et MCF-7 représentent des témoins positifs d'expression de BAI1 et HeLa le témoin négatif. Les images obtenues par microscopie confocale sont représentatives de 2 manipulations indépendantes.

2.2. Travaux complémentaires : La capture de cellules apoptotiques HPV+ est nécessaire au transfert des oncogènes et à l'acquisition consécutive d'une capacité de croissance indépendante de l'ancrage

2.2.1. Objectifs

Les études antérieures du laboratoire ont mis en évidence que les HPFs co-cultivés avec des cellules apoptotiques HPV positives (HeLa ou Ca Ski) forment des colonies lorsqu'ils sont ensemencés en agar mou (*soft-agar*) témoignant de l'acquisition de propriétés de croissance indépendante de l'ancrage, une propriété caractéristique des cellules transformées. Par ailleurs, le test de formation de colonies en agar mou (*soft-agar assay*) est considéré comme le test le plus précis et le plus rigoureux pour la détection *in vitro* de la transformation maligne des cellules (612, 613).

Compte tenu de la détection de séquences de l'oncogène E6 d'HPV dans une proportion des HPFs co-cultivées, ces résultats suggéraient que le THG *via* la capture des cellules apoptotiques pouvait être responsable de l'acquisition par les HPFs co-cultivés de propriétés caractéristiques de cellules transformées. Pour confirmer ces résultats, les expériences de co-culture entre HPFs et LAC HeLa ou Ca Ski, selon un ratio de 1 cellule pour 10 LAC pendant 48h, ont été reproduites en ajoutant une étape de tri cellulaire par FACS visant à discriminer et isoler, dès la fin de la co-culture, la fraction de fibroblastes ayant internalisé des cellules apoptotiques (HPFs PKH26+/PKH67+) de la fraction de fibroblastes non-internalisants (HPFs PKH26+). Dans le but de confirmer la dépendance de l'acquisition de propriétés phénotypiques de cellules transformées mais aussi du transfert de gènes viraux à la capture des cellules apoptotiques, les fractions de fibroblastes ayant internalisé des cellules apoptotiques (HPFs PKH26+/PKH67+) et non-internalisants (HPFs PKH26+) ont été comparées, d'une part pour leur capacité à croître en absence de support solide et, d'autre part pour leur contenu en séquences d'ADN d'HPV.

2.2.2. Matériel et méthodes

2.2.2.1. Cytométrie en flux et tri cellulaire

Des cellules apoptotiques LAC HeLa et Ca Ski marquées au PKH67 ont été co-cultivées pendant 48h avec des HPFs marqués au PKH26 dans les conditions décrites dans la publication 2, puis les HPFs ont été collectés suite à l'action de la trypsine et triés par FACS (FACS Aria II, BD Biosciences). Lors du tri cellulaire, les HPFs PKH26+ ont été différenciés des cellules apoptotiques PKH67+ par leur fluorescence spécifique. Les cellules doublement marquées ont été considérées comme la proportion de HPFs ayant internalisé les cellules apoptotiques et de fait ayant acquis leur fluorescence

spécifique (HPFs PKH26+/PKH67+). Les cellules caractérisées par un simple marquage PKH26+ ont été considérées comme la proportion de HPFs non-internalisants (HPFs PKH26+). Chacune de ces deux populations cellulaires a été mise en culture pendant 7 jours en condition standard avant d'être soumise à un test de croissance cellulaire en agar mou et à une extraction d'ADN total.

2.2.2.2. Test de croissance cellulaire en agar mou

Les tests de croissance en agar mou (*soft agar*) ont été réalisés en plaques 6 puits, à partir de 3.10^5 cellules/ml contenues dans du milieu semi-solide d'agar (milieu de culture, 10% sérum de veau foetal (SVF), 0,35% agar ; Invitrogen) et déposées sur une sous-couche d'agar (milieu de culture, 10% SVF, 0,5% agar). Les cellules ont été cultivées pendant 28 jours au cours desquels la surface de la couche supérieure d'agar a été recouverte tous les 3 jours de milieu de culture contenant 10% de SVF. À l'issue de cette période de croissance, les colonies de cellules ont été photographiées à l'aide du microscope inversé Olympus BX51 Upright Microscope (Olympus, Tokyo, Japan) et celles d'une taille supérieure à 30 μm ou 50 μm de diamètre ont été dénombrées sur toute la profondeur de la couche d'agar d'un champ microscopique.

2.2.2.3. Extraction d'ADN et détection de gènes par PCR

L'ADN total a été extrait à partir de 10^6 cellules en utilisant le kit QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur. La détection des gènes E6 d'HPV16 et 18 et de l'albumine humaine a été réalisée par PCR dans 20 μL d'un mélange réactionnel composé de tampon 1X Dream Taq Green Buffer (Fischer), de 500 ng d'ADN total et des amorces sens et antisens (Eurogentec, Seraing, Belgique) dont les séquences et les concentrations utilisées sont indiquées dans le Tableau 2. Les programmes de PCR ont été exécutés comme suit : 5 min à 94°C, 40 cycles d'amplification (30 sec à 95°C, 1 min à 57/55/55°C pour l'albumine/E6 d'HPV16/E6 d'HPV18 respectivement, 30 sec à 72°C) et 7 min à 72°C. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Tableau 2 : Séquences des amorces

Cible	Amorce	Séquence nucléotidique (5'-3')	Concentration finale (nM)
E6 HPV16	sens	CAG-TCA-CTC-GAG-ACC-CAC-CAA-AAG-AGA-ACT	250
	antisens	CAC-ACG-GAA-TTC-TTA-CAG-CTG-GGT-TTC-TCT-ACG-TGT	250
E6 HPV18	sens	GGG-GGA-TCC-ATG-GCG-GCG-TTT-GAA-GAT-CCA-ACA	250
	antisens	GGG-GAA-TTC-TTA-TAC-TTG-TGT-TTC-TCT-GCG-TCG	250
Albumine humaine	sens	GCT-GTC-ATC-TCT-TGT-GGG-CTG-T	400
	antisens	ACT-CAT-GGG-AGC-TGC-TGG-TTC	400

2.2.3. Résultats

La formation de colonies en agar mou illustre la capacité à croître indépendamment de l'ancrage des HPFs ayant capturé des cellules apoptotiques (HPFs PKH26+/PKH67+), tandis que les HPFs préalablement co-cultivés mais non-internalisants (HPFs PKH26+) et les HPFs cultivés seuls ne présentent pas cette capacité (Figures 25A et B).

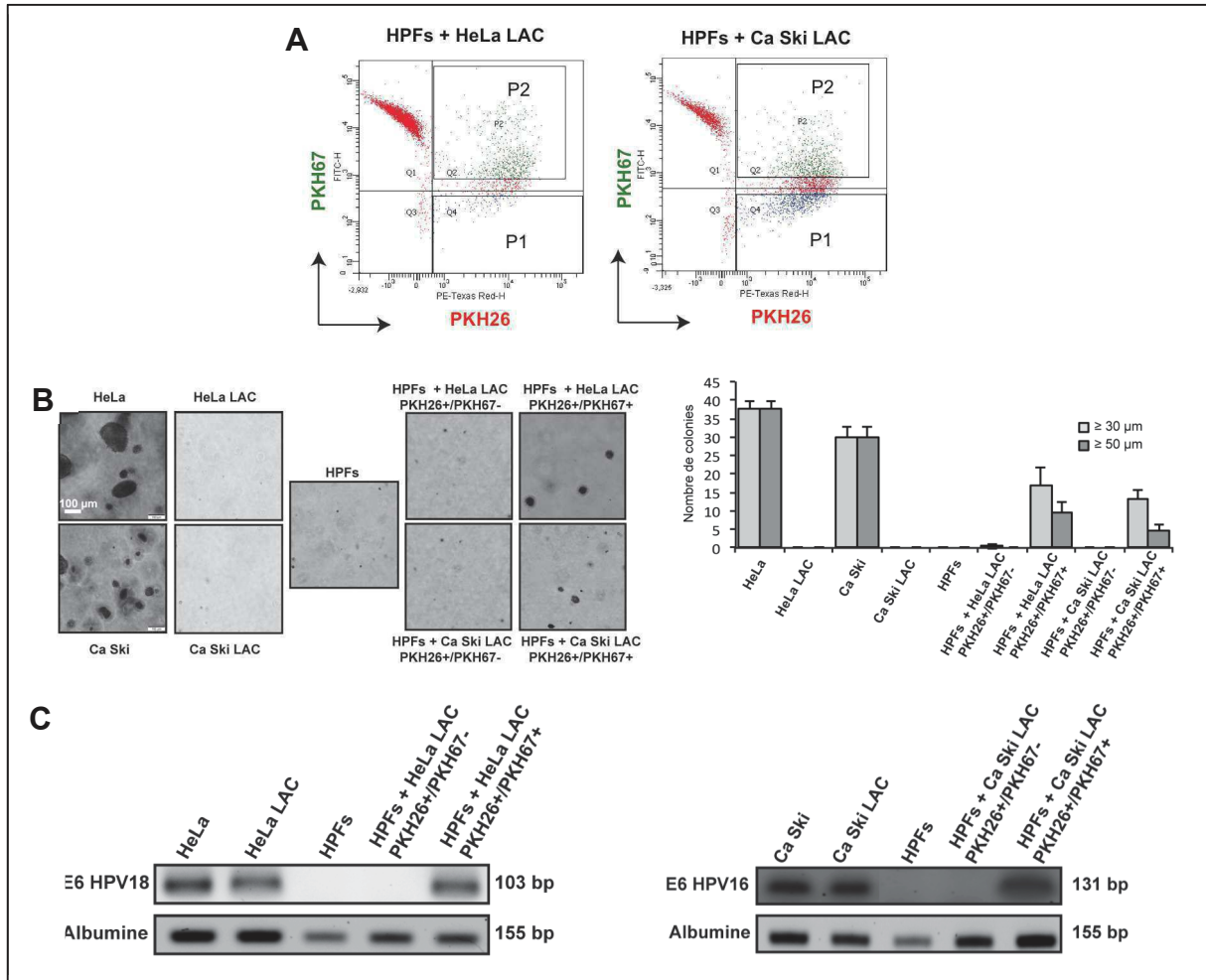


Figure 25 : Dépendance de l'acquisition de propriétés de croissance en agar mou et du THG à la capture des cellules apoptotiques HPV+ par les fibroblastes primaires humains (HPFs)

Des cellules apoptotiques (LAC) issues de cellules HeLa ou Ca Ski marquées au PKH67 ont été co-cultivées pendant 48h avec des HPFs marqués au PKH26. **(A)** L'internalisation des cellules apoptotiques a été mise en évidence par FACS, et les populations de fibroblastes ayant capturé ou non des cibles apoptotiques ont été triées, sur la base de leur marquage PKH26+/PKH67+ ou PKH26+ respectivement, et remises en culture séparément. **(B)** Ces populations cellulaires ont été cultivées pendant une semaine en condition standard, ensesencées en agar mou, cultivées pendant 28 jours puis photographiées sous un microscope inversé. Les cellules HeLa et Ca Ski constituent des témoins positifs de croissance en agar mou, HPFs et les cellules apoptotiques (HeLa LAC et Ca Ski LAC) les témoins négatifs. Le dénombrement des colonies dont le diamètre était supérieur à $30 \mu\text{m}$ (gris clair) ou à $50 \mu\text{m}$ (gris foncé) a été réalisé sur toute la surface et la profondeur d'un champ et les données, issues d'une expérience, représentent les moyennes \pm SD du nombre de colonies de 10 champs représentatifs. **(C)** La détection par PCR des oncogènes E6 d'HPV 18 ou 16 a été appliquée aux différentes populations cellulaires issues du tri cellulaire. Les cellules viables (HeLa et Ca Ski) et apoptotiques (HeLa LAC et Ca Ski LAC) constituent des témoins positifs d'expression de E6 et HPFs le témoin négatif. Les données représentent l'électrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification de séquences des oncogènes viraux E6 d'HPV 18 ou 16 et de l'albumine humaine.

De manière intéressante, les oncogènes E6 présents dans les cellules HeLa et Ca Ski avant et après l'induction de l'apoptose ont pu être détectés par PCR dans les fractions de HPFs PKH26+/PKH67+ ayant capturé des cibles apoptotiques, démontrant un transfert de séquences d'ADN viral. En revanche, aucun signal E6 n'a pu être observé dans les HPFs PKH26+ non-internalisants (Figure 25C).

2.2.4. Conclusion

Ces résultats suggèrent que le transfert de gènes et l'acquisition consécutive d'une capacité de croissance indépendante de l'ancrage ne sont pas seulement associés à la simple co-culture entre cellules apoptotiques HPV positives et HPFs mais dépendent de la capture des cibles apoptotiques, confirmant de fait leur fonction de vecteur de gènes lors du THG comme défini par Holmgren (410). Ce modèle de transfert horizontal d'oncogènes viraux dépendant de la capture de cellules apoptotiques s'oppose à un autre modèle de THG impliquant la capture d'ADN circulant libéré par des cellules vivantes *via* un mécanisme apparenté à la transfection passive d'acides nucléiques (424, 614).

2.3. Travaux complémentaires : Vers la démonstration de la preuve *in vivo* de la conservation de la capacité tumorigénique des cellules apoptotiques tumorales HeLa

2.3.1. Objectif

Dans leur ensemble, les travaux du laboratoire sont les premiers démontrant que des cellules tumorales apoptotiques issues de cancer du col de l'utérus conservent un pouvoir oncogénique lié à la présence de séquences d'HPV qu'elles peuvent transmettre après leur capture par des cellules receveuses. Jusqu'alors démontrés *in vitro*, ces mécanismes semblent trouver écho *in vivo* sur la base d'expérimentations préliminaires de xénogreffes de cellules apoptotiques HPV+ injectées en intradermique dans des souris *nude*.

2.3.2. Matériel et méthodes

2.3.2.1. Modèle animal : xénogreffes de cellules apoptotiques tumorales

Les cellules en apoptose tardive/mortes (LAC) HeLa et Ca Ski ont été injectées en intradermique dans les flancs droit et gauche respectivement de 3 souris Swiss *nu/nu* de 6 semaines à raison de $20 \cdot 10^6$ cellules. En parallèle, $6 \cdot 10^6$ cellules HeLa viables et $4 \cdot 10^6$ cellules Ca Ski viables ont été injectées en intradermique dans les flancs droit et gauche respectivement de 3 souris. Un contrôle quotidien des marqueurs du bien-être général des souris (poids, absence de plaie) a été effectué. Plus particulièrement, les sites d'injection ont été observés quotidiennement afin de détecter la survenue éventuelle de tumeur. Quinze semaines après les injections, les souris ont été photographiées, sacrifiées et les tumeurs et les organes foie, rate, intestin, peau, poumon et rein ont été prélevés, puis fixés au paraformaldéhyde après prélèvement d'une fraction pour congélation à -80°C dans du RiboZol™ (VWR International, Strasbourg, France).

2.3.3. Résultats

L'injection de cellules apoptotiques HeLa et Ca Ski en intradermique dans les flancs de 3 souris *nude* a provoqué la formation d'une masse tumorale, palpable et mesurable dès 37 jours post-injection, sur le site d'injection de cellules apoptotiques HeLa d'une souris sur trois (Figure 26).



Figure 26 : Capacité tumorigénique des cellules apoptotiques tumorales HeLa *in vivo*

Seule une souris Swiss *nu/nu* sur trois, xéno greffée en intradermique avec les cellules tumorales apoptotiques HeLa (flanc droit) et Ca Ski (flanc gauche), présente une masse tumorale (flèche) localisée au site d'injection de cellules apoptotiques HeLa, palpable à partir de 37 jours après la xéno greffe. Les photographies montrent les 3 souris xéno greffées en intradermique avec les cellules tumorales apoptotiques et ont été réalisées 15 semaines après les injections.

2.3.4. Conclusion

Bien que la caractérisation de la tumeur obtenue reste à effectuer, ces résultats suggèrent que cette croissance néoplasique peut être associée à une transformation de cellules murines localisées au site de l'injection des cellules apoptotiques HeLa et potentiellement consécutive au transfert d'oncogènes viraux d'HPV18. L'étude moléculaire de cette masse tumorale aura pour objectif la détermination de l'origine murine des cellules qui la composent et, le cas échéant, d'identifier dans ces cellules des marqueurs nucléiques humains ou viraux comme les oncogènes d'HPV issus des cellules mortes injectées. Si tel est le cas, et suite à la reproduction de la manipulation sur un plus grand nombre de souris, la démonstration *in vivo* du transfert horizontal d'oncogènes aboutissant à la transformation cellulaire murine confirmera non seulement la pertinence de ces mécanismes déterminés jusqu'alors *in vitro*, mais montrera aussi que ces mécanismes outrepassent les barrières d'espèces.

Troisième partie : Discussion et perspectives

Cancer du col de l'utérus et enjeux actuels

En dépit des méthodes de dépistage et des programmes de détection précoce, le cancer invasif du col de l'utérus représente toujours un problème majeur de santé publique. Alors que l'incidence et la mortalité du cancer du col de l'utérus ont diminué dans les pays développés, plus de 80% des nouveaux cas surviennent dans les pays en développement et sont diagnostiqués principalement à des stades avancés (461, 582). Ainsi, le risque pour une femme de développer un cancer du col de l'utérus avant ses 65 ans a été estimé à 0,69% dans les pays développés et à 1,38% dans les pays en développement (615).

À ce jour, il n'y a pas de traitements antiviraux spécifiques des infections par HPV, mais la vaccination prophylactique est récemment apparue comme une stratégie de prévention primaire efficace contre les tumeurs malignes du col de l'utérus (616). Aussi, deux vaccins prophylactiques sont disponibles ; l'un bivalent, Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgique) qui cible les HPV16 et -18 ; et l'autre quadrivalent, Gardasil® (Merck & Co, Whitehouse Station, NJ USA) qui cible les HPV16 et -18 ainsi que deux HPV-BR (HPV6 et -11). Ces vaccins ne présentent aucun bénéfice pour les personnes ayant déjà été infectées par les HPV ciblés et, en raison de leur coût élevé, sont plutôt inaccessibles aux populations des pays en développement. Pour ces raisons, l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des cancers invasifs du col de l'utérus apparaît comme une approche essentielle pour lutter contre cette pathologie, en particulier dans les pays en voie de développement.

S'il est détecté suffisamment tôt, le cancer du col de l'utérus est généralement curable. Cependant, le traitement de carcinomes métastatiques ou issus d'une récurrence est relativement peu efficace et s'accompagne généralement d'effets secondaires sévères. Les thérapies conventionnelles incluent la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie (rapport concernant les traitements du cancer du col de l'utérus dans le cadre de la mise en œuvre du plan cancer 2009-2013 établi par l'Institut National du Cancer et la Ligue contre le cancer). L'hystérectomie, consistant en l'ablation chirurgicale de l'utérus associée ou non à l'ablation des paramètres et de la partie supérieure du vagin (colpo-hystérectomie), ou la radiothérapie sont efficaces chez la majorité des patientes atteintes d'un cancer de stade précoce. Toutefois, la chimiothérapie est toujours le premier choix pour les patientes atteintes d'une maladie à un stade avancé et dont le pronostic reste très faible. Bien que la chimiothérapie - néoadjuvante avant la chirurgie ou en combinaison avec la radiothérapie - basée sur l'utilisation de taxanes ou de platines peut améliorer de manière significative la survie des patientes, la réussite de ces modalités de traitement est souvent entravée par la survenue de chimiorésistance et/ou radiorésistance ainsi que par une forte cytotoxicité entraînant la mort de cellules saines (582).

Par conséquent, le bénéfice de survie des thérapies conventionnelles est limité, les récurrences après traitement sont fréquentes et le cancer du col de l'utérus a toujours un des plus faibles taux de survie à cinq ans, entre 30 et 70% selon les populations et les stades considérés (617). Le développement d'agents anticancéreux plus efficaces, hautement sélectifs vis-à-vis des cellules cancéreuses et moins toxiques pour les cellules saines, ainsi que des stratégies d'intervention thérapeutique nouvelles sont nécessaires pour améliorer l'efficacité du traitement et réduire les taux de morbidité et de mortalité du cancer du col de l'utérus (461, 582).

Au cours des dernières décennies, les plantes ont reçu une attention particulière en tant que sources d'agents antitumoraux potentiels. Actuellement, la plupart des médicaments anticancéreux modernes tels que la camptothécine, la vincristine, la vinblastine, l'adriamycine, le taxol, l'étoposide et le paclitaxel sont des composés d'origine végétale. Le règne végétal, constituant une pharmacopée quasiment illimitée qui demeure probablement encore largement sous-exploitée, est riche de métabolites secondaires dotés de propriétés antitumorales potentielles (618). Ces métabolites secondaires peuvent agir sur la promotion et la progression tumorale, et peuvent aussi interférer avec la chimiothérapie et la radiothérapie chez les patientes traitées pour un cancer du col de l'utérus (583, 619, 620).

L'isoliquiritigénine (ILG) crédit de multiples actions à l'encontre des cellules cancéreuses du col de l'utérus : un nouvel agent thérapeutique potentiel pour le traitement du cancer du col de l'utérus

Notre travail a consisté en l'exploration des propriétés anticancéreuses potentielles de l'ILG dans des lignées de cellules du cancer du col de l'utérus. Nos objectifs étaient d'une part d'évaluer les effets probables de l'ILG sur la prolifération cellulaire et l'apoptose et d'identifier le cas échéant les déterminants moléculaires impliqués et, d'autre part, d'évaluer l'influence de l'ILG sur certains phénotypes associés à l'invasion et à la métastase *in vitro* et sur la croissance tumorale *in vivo*.

Pour la première partie de l'étude, nous avons délibérément choisi de travailler à partir de quatre lignées cellulaires du cancer du col de l'utérus, divergeant les unes des autres par leur origine histologique, leur statut p53, la présence d'ADN d'HPV ainsi que par leur potentiel métastatique (Tableau 3). Les HPV oncogéniques de type 16 et 18 étant responsables d'approximativement 70% des cas de cancer du col de l'utérus dans le monde (621, 622), les lignées cellulaires humaines de cancer du col de l'utérus Ca Ski et SiHa, positives pour HPV16, et HeLa, positive pour HPV18, constituaient des lignées de choix pour les expérimentations *in vitro*. Tandis que les cellules Ca Ski et SiHa HPV16+ dérivent de carcinomes épidermoïdes, la lignée cellulaire HeLa HPV18+ est issue d'un adénocarcinome. Ces lésions histologiquement distinctes représentent 90% des cas de cancer du col

de l'utérus, ce qui renforce la représentativité de telles lignées vis-à-vis du cancer du col de l'utérus (581).

L'identification des acteurs moléculaires de l'action de l'ILG sur la prolifération cellulaire et l'apoptose ainsi que l'étude des phénotypes associés à l'invasion ont été réalisées dans le modèle cellulaire Ca Ski. À notre connaissance, aucune donnée n'était disponible dans ce modèle représentatif des carcinomes du col utérin les plus fréquents, et hautement métastatique.

Dans les lignées cellulaires testées, l'ILG induit une inhibition de la prolifération cellulaire en provoquant d'une part un arrêt de la progression du cycle cellulaire et, d'autre part, la mort cellulaire par apoptose. En effet, l'ILG induit un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M pour l'ensemble des modèles cellulaires analysés et ce de façon dépendante de la concentration et du temps de traitement. Dans le cas des cellules HeLa, nos données sont en accord avec les données de la littérature (623-625) (Tableau 3).

Le modèle Ca Ski présente non seulement un blocage en phase G2/M à 40 μ M d'ILG, mais aussi un arrêt du cycle en G0/G1 lors d'un traitement à l'ILG à 80 μ M pendant 48 et 72h, effet qui a déjà été démontré à partir de la lignée cellulaire humaine du cancer de poumon A549 et qui a été associé par les auteurs à l'augmentation de l'expression de p21 de manière dépendante de p53 (626). Ces éléments suggèrent que l'ILG peut non seulement induire des réponses variées suivant le type cellulaire mais aussi selon la concentration utilisée possiblement en modulant les différentes voies de signalisation impliquées. Les voies de signalisation par lesquelles l'ILG induit l'arrêt de cycle en phase G0/G1 des cellules Ca Ski à 80 μ M à partir de 24h de traitement ou en phase G2/M des cellules SiHa, HeLa et C-33A sont vraisemblablement multiples. Les déterminants moléculaires distincts qu'elles impliquent restent à identifier. En premier lieu, nous nous intéresserons aux voies de signalisation identifiées à partir du modèle HeLa et décrites ci-après.

Néanmoins, nos analyses concernant le modèle cellulaire Ca Ski suggèrent que l'arrêt de cycle peut être attribué à la protéine p21 dont l'augmentation du taux, tout comme celui de la protéine p53, a été démontrée suite à l'exposition des cellules à l'ILG. La protéine p21 est une cible bien connue du facteur de transcription p53 dont l'expression est fortement induite lors de lésions de l'ADN dans les cellules exprimant une protéine p53 fonctionnelle (627). Ainsi, l'augmentation de l'expression de p21 pourrait être la conséquence d'une augmentation du taux de la protéine p53 et de son activité transcriptionnelle dans les cellules Ca Ski traitées par l'ILG. Bien que p21 ait été initialement décrite comme étant impliquée dans le point de contrôle du cycle cellulaire en G1, il a aussi été démontré que cette protéine régulatrice joue un rôle crucial dans la transition G2/M (628).

Tableau 3 : Activité cytotoxique de l'ILG sur les lignées cellulaires humaines de cancer du col de l'utérus et effets modulateurs sur les phénotypes associés à l'invasion

Lignée cellulaire	Statut HPV	Autres caractéristiques	IC ₅₀ (µM)	Méthode	Temps de traitement (h)	Activités/Effets	Références
HeLa	HPV18 ; 10-50 copies par cellule	adénocarcinome ; p53 sauvage	40	SRB	24	Induction de l'apoptose par augmentation des niveaux de ERO	(625)
			9,8	XTT	48	Induction d'un arrêt de cycle cellulaire en phase G2/M et de l'apoptose	(624)
			58,1-82,6 (70,4)	MTT	72	Induction d'un arrêt de cycle cellulaire en phase G2/M et de l'apoptose	Hirchaud, Hermetet <i>et al.</i> , 2013 ; (623)
Ca Ski	HPV16 ; 100-600 copies par cellule	carcinome épidermoïde métastatique ; p53 sauvage	39,1	MTT	72	Induction d'un arrêt de cycle cellulaire en phase G2/M ou G0/G1 et de l'apoptose ; diminution de l'expression de E6 d'HPV16	Hirchaud, Hermetet <i>et al.</i> , 2013
				Test de migration	8 et 24	Inhibition de la migration cellulaire en condition sub-cytotoxique (10 et 20 µM)	Hermetet, données non publiées
				Zymographie	24	Inhibition de l'activité, l'expression et/ou la sécrétion de MMP-2/-9 en condition sub-cytotoxique (10 et 20 µM)	Hermetet, données non publiées
SiHa	HPV16 ; 1-2 copies par cellule	carcinome épidermoïde ; p53 sauvage	53,8	MTT	72	Induction d'un arrêt de cycle cellulaire en phase G2/M et de l'apoptose	Hirchaud, Hermetet <i>et al.</i> , 2013
C-33A	Négatif	carcinome p53 mutée	32,8	MTT	72	Induction d'un arrêt de cycle cellulaire en phase G2/M et de l'apoptose	Hirchaud, Hermetet <i>et al.</i> , 2013

Méthodes d'analyse de la viabilité cellulaire : test MTT, test XTT, test sulforhodamine B (SRB).

La mort par apoptose induite par l'ILG est confirmée dans les lignées exposées à l'ILG par l'accumulation de cellules présentant de l'ADN fragmenté (Sub-G1), mais aussi une condensation de la chromatine après marquage au DAPI et une exposition des PS sur le feuillet externe de leur membrane plasmique. Ces événements constituent dans leur ensemble des marqueurs canoniques de l'étape d'exécution de l'apoptose, tel que réaffirmé par les recommandations récentes publiées par la NCCD (5).

Dans la littérature, les quelques études *in vitro* portant sur les effets de l'ILG sur le cancer du col de l'utérus ont été menées uniquement sur les cellules HeLa. Dans ce modèle cellulaire, le blocage du cycle cellulaire en phase G2/M a été associé à une augmentation de l'activité d'ATM, un gain de la stabilité de la protéine p53 due à une moindre interaction entre p53 et MDM2, une diminution des cyclines A et B, de la kinase CDC2 et de la phosphatase CDC25C ainsi qu'à une augmentation de la phosphorylation de *Checkpoint kinase2* (CHK2), CDC2 et CDC25C (624). L'ILG augmente le niveau des ERO intracellulaires et le taux d'apoptose des cellules HeLa de manière dose-dépendante, suggérant la mise en œuvre de mécanismes liés au stress oxydatif (625). De plus, l'ILG induit un ensemble d'événements caractéristiques de la voie mitochondriale de signalisation apoptotique comme une perte de la polarisation mitochondriale, une activation des caspases-9, -3 et le clivage de la PARP (625, 629), mais aussi une diminution du niveau des protéines BCL-2 et BCL-X_L associée à une augmentation de la stabilité de p53 (624). Enfin, l'exposition des cellules HeLa à l'ILG déclenche un stress du RE, comme en témoigne l'augmentation de l'expression de la molécule 78 kDa *glucose-regulated protein* (GRP78) et de la phosphorylation de la sous unité α de eIF2 associée à ce processus, qui entraîne ensuite l'apoptose provoquée par l'activation de la caspase-12, spécifiquement associée à cette voie apoptotique (629). Par ailleurs, les mécanismes par lesquels le traitement à l'ILG provoque l'arrêt du cycle cellulaire et la cytotoxicité des cellules HeLa implique aussi l'inhibition de l'activité de la Topoisomérase II, de laquelle résulte un blocage du cycle dans l'étape de transition mitotique métaphase/anaphase, ainsi que des dommages à l'ADN observés par des marqueurs caractéristiques incluant la formation de foyers γ -H2AX et la phosphorylation de ATM et CHK2. L'ensemble de ces altérations contribue à l'effet anti-prolifératif de l'ILG (624, 630).

Afin d'étendre la compréhension des effets de l'ILG à un autre modèle cellulaire de cancer du col de l'utérus, nous nous sommes focalisé sur l'étude des acteurs de la voie apoptotique mitochondriale pour définir les mécanismes par lesquels l'ILG induit la mort des cellules Ca Ski HPV16 positives.

Dans nos conditions expérimentales, la protéine suppresseur de tumeur p53 semble jouer un rôle prépondérant non seulement dans l'inhibition de la prolifération mais aussi dans l'induction de la mort par apoptose des cellules cancéreuses HPV16 positives Ca Ski exposées à l'ILG. Nos résultats montrent que l'ILG induit une augmentation du taux de BAX associée à une diminution du taux de BCL-2 tandis qu'elle ne modifie pas les taux de BCL-X_L et de BAK. La protéine p53 est un élément de régulation au carrefour des voies de survie / mort cellulaires de par ses fonctions multiples, dépendantes ou non de son activité transcriptionnelle, notamment sur les membres de la famille BCL-2. Ainsi, p53 a la capacité d'activer la transcription de divers gènes pro-apoptotiques tels que les protéines BAX, NOXA et PUMA, ou au contraire de réprimer la transcription de gènes anti-apoptotiques tels que la survivine et BCL-2 (631-633). La protéine p53 exerce aussi des fonctions pro-

apoptotiques indépendantes de la transcription. Elle favorise notamment la translocation de BAX et l'oligomérisation de BAX et BAK à la mitochondrie, interagit avec BCL-2 et BCL-X_L et antagonise leur effet anti-apoptotique, et forme un complexe avec la cyclophiline D dans la mitochondrie entraînant la perturbation de la membrane mitochondriale (634).

Dans nos expérimentations, l'apoptose des cellules Ca Ski suite au traitement à l'ILG apparaît étroitement dépendante de la protéine pro-apoptotique BAX. Ainsi, cette dernière pourrait être exprimée fortement, *via* l'activité transcriptionnelle de p53, puis transloquée du cytosol à la MEM pour y former des canaux BAX/BAX, BAX/VDAC ou réguler l'ouverture de PTM. Dans le même temps, la diminution du taux de protéine BCL-2 observée dans les cellules Ca Ski exposées à l'ILG pourrait être le reflet de la diminution de son expression et favoriserait aussi la formation des homodimères BAX/BAX et BAK/BAK. L'ensemble de ces événements est en faveur du relargage de facteurs apoptogènes mitochondriaux. La libération du cytochrome c de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol a d'ailleurs été confirmée dans les cellules Ca Ski exposées à l'ILG et est associée à la chute de $\Delta\psi_m$. Ces événements aboutissent vraisemblablement à la formation de l'apoptosome et à l'activation consécutive des caspases-9 et -3, compte tenu de la démonstration d'un clivage de ces pro-caspases dans les cellules Ca Ski traitées par 80 μ M d'ILG. La phase d'exécution de l'apoptose a aussi été confirmée par le clivage de la PARP, compromettant de fait son action dans la réparation de l'ADN (635). Ces cascades d'événements cellulaires et moléculaires soulignent la mise en œuvre de la voie apoptotique mitochondriale dans les cellules Ca Ski exposées à l'ILG.

Par ailleurs, le clivage de la pro-caspase-8 observé suite au traitement des cellules Ca Ski par l'ILG dénote une activation de récepteurs de mort associée à l'apoptose. Ainsi dans ce modèle la voie extrinsèque de l'apoptose *via* l'activation des récepteurs de mort pourrait être en partie amplifiée par la voie intrinsèque mitochondriale *via* le clivage de la protéine BID, cible de la caspase-8. Ceci est suggéré par la diminution du taux de la protéine BID en fonction de la concentration d'ILG vraisemblablement au profit d'une augmentation de la forme tronquée t-BID.

L'implication de ces deux voies principales de l'apoptose dans la mort induite par l'ILG des cellules Ca Ski confirme les données obtenues par de nombreuses équipes dans d'autres modèles cellulaires dérivés de cancers. En effet, l'ILG induit un effet anti-prolifératif sur les cellules d'hépatocarcinome HepG2 associé à la mort cellulaire programmée dépendante de l'activation des caspases ; ses mécanismes d'action impliquent une voie dépendante de p53 et la surexpression du récepteur de mort Fas, une molécule en aval de la voie de signalisation activée par p53, de son ligand FasL, de BAX et NOXA (636, 637). Chowdhury et collaborateurs ont démontré que l'ILG induit la fragmentation internucléosomale de l'ADN et active les caspases-8, -9 et -3 dans les cellules de

leucémie promyélocytaire humaine HL-60 (638). Enfin, Jung et collaborateurs rapportent que l'ILG provoque l'apoptose des cellules cancéreuses humaines de prostate DU-145 *via* une dépolarisation des membranes mitochondriales et une augmentation de l'expression des protéines FasL, Fas, t-BID, BAX, BAD associées à un clivage des caspases-8, -9, -7 et -3, de PARP et à une libération du cytochrome c et de Smac/DIABLO (639). Dans nos expérimentations, bien que le clivage de la pro-caspase-8 semble être le reflet de l'activation des récepteurs de mort, l'identification de ces derniers et la part de leur implication dans l'engagement de l'apoptose des cellules Ca Ski exposées à l'ILG restent à établir.

De manière intéressante, le taux de transcrits et de protéines E6 diminue de façon drastique suite au traitement par l'ILG. Compte tenu du fait que la protéine E6 d'HPV16 induit la dégradation de p53, notre hypothèse est que l'ILG peut participer, au moins en partie, à la restauration de la fonction cellulaire de p53 *via* l'inhibition de l'expression de E6 d'HPV16, contribuant de fait à lever l'échappement des cellules Ca Ski à l'apoptose. Pour confirmer cette hypothèse, les mécanismes moléculaires par lesquels l'ILG participe à la diminution des taux de transcrits E6 d'HPV16 devront être explorés.

Afin d'identifier les mécanismes conduisant à la diminution de l'expression de E6 d'HPV16, l'étude de l'effet de l'ILG sur l'activité du promoteur des gènes précoces p97 serait intéressante à réaliser. Des travaux préliminaires non publiés n'ont pas mis en évidence de variation des niveaux de méthylation des E2 Binding sites les plus proximaux au promoteur p97 dans des cellules Ca Ski traitées à l'ILG. Nous pouvons donc exclure que l'ILG modifie l'accessibilité de facteurs de transcription à ces séquences proches du promoteur précoce *via* une régulation épigénétique. Sachant qu'il a été démontré que l'ILG possède des propriétés déméthylantes, notamment sur le promoteur du gène *Death-associated protein kinase-1* (DAPK1) dans les cellules cancéreuses HT-29 et HL-60 (640), il serait possible qu'une action indirecte de l'ILG *via* la déméthylation d'un gène cellulaire, qui reste à identifier, puisse ainsi réguler négativement l'expression de E6. Il a récemment été démontré que l'ILG induit une diminution de l'activité de la *DNA methyltransferase 1* (DNMT1) et de son expression conduisant à la déméthylation du promoteur du gène *Wnt inhibitory factor 1* (WIF1) dans les cellules cancéreuses MDA-MB231 (641). De plus, les auteurs ont mis en évidence une diminution de l'expression du facteur de transcription Sp1 suite au traitement par l'ILG. Compte tenu de l'implication de ce facteur dans l'expression des gènes précoces d'HPV16, il est probable qu'une diminution de son expression induite par l'ILG entraîne en conséquence la diminution de l'expression de E6 dans les cellules Ca Ski. Enfin, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'ILG puisse induire la diminution de l'expression de E6 *via* le facteur de transcription *Activator protein-1* (AP-1). En effet, une étude de la littérature a montré que l'ILG inhibe la fixation du facteur de transcription AP-1 à

l'ADN (597), or AP-1 est décrit comme le principal activateur transcriptionnel du promoteur précoce d'HPV (642). Il serait donc intéressant de tester l'activité d'AP-1 dans les cellules Ca Ski traitées par l'ILG.

Si l'arrêt de la progression du cycle et l'apoptose des cellules Ca Ski induite par l'ILG semblent être dépendants de p53, d'autres mécanismes mis en jeu par ce flavonoïde peuvent en être indépendants et aboutir aussi aux mêmes effets comme cela a été décrit dans d'autres types cellulaires. Ainsi, il a été démontré dans des modèles cellulaires dérivés de cancer du poumon et de mélanome murin que l'ILG peut induire une augmentation du niveau d'expression de p21 et de la protéine pro-apoptotique BAX ainsi qu'une diminution de l'expression de BCL-X_L et ce indépendamment de p53 (643-645). Enfin, dans les cellules de carcinome ovarien humaines SKOV-3, l'action de l'ILG implique un stress du RE, comme l'indique l'augmentation de l'expression de molécules associées à ce processus telles que CHOP, GRP78 et *unspliced form of X-box binding protein1* (XBP1U), l'augmentation de la phosphorylation de eIF2 α et le clivage de *activating transcription factor 6 α* (ATF6 α) (646). Les auteurs soulignent que l'activation des caspases-3 et -12 est impliquée dans ce processus et que l'utilisation d'un inhibiteur de la caspase-12 (Z-ATAD) prévient partiellement la formation de ERO et inhibe l'apoptose induite par l'ILG.

Nos expérimentations menées sur les cellules C33-A indiquent que l'ILG induit un arrêt de la progression du cycle en phase G2/M et la mort cellulaire comme le montre la diminution de viabilité cellulaire et la fragmentation de l'ADN, et ce, en dépit de la mutation du gène p53 codant une protéine p53 non fonctionnelle. Ces données suggèrent que l'action de l'ILG sur les cellules dérivées de cancer du col de l'utérus implique aussi des mécanismes indépendants de p53. L'identification des voies de signalisation mises en jeu restent à déterminer, le stress du RE et la production d'ERO seront privilégiés.

À ce jour, les effets anti-prolifératifs et cytotoxiques de l'ILG dans diverses cellules cancéreuses sont reconnus et les mécanismes moléculaires mis en œuvre sont en partie élucidés malgré leur multiplicité et leur complexité. En revanche, l'influence potentielle de l'ILG sur les capacités migratoires et invasives de cellules cancéreuses est quant à elle encore peu connue et les données disponibles se limitent au modèle du cancer du sein et dans une moindre mesure aux modèles de carcinomes rénal et prostatique. À partir de nos travaux préliminaires menés sur les cellules Ca Ski, nous démontrons pour la première fois que l'ILG inhibe la migration et l'activité, l'expression et/ou la sécrétion de MMP-2 et -9. Même si l'étude des effets de l'ILG sur le phénotype invasif des cellules Ca Ski devra être poursuivie, notamment par des tests *in vitro* d'invasion en chambre de Boyden modifiée en présence de Matrigel, nos résultats suggèrent que ce flavonoïde présente un potentiel thérapeutique intéressant dans le traitement des carcinomes du col de l'utérus agressifs. Les

mécanismes par lesquels l'ILG peut inhiber les capacités migratoires et invasives des cellules du cancer du col de l'utérus seront explorés afin de définir les déterminants moléculaires et les voies impliquées, telles que les voies de signalisation p38 MAPK, PI3K/Akt et NF- κ B ou JNK/AP-1 identifiées dans les lignées cellulaires humaines dérivées respectivement de cancer du sein (594, 595) et de la prostate (597).

Internalisation de cellules tumorales apoptotiques par des fibroblastes primaires humains et transfert horizontal d'oncogènes viraux : déterminants cellulaires et moléculaires

Le programme de mort cellulaire par apoptose et la capture subséquente de la cellule mourante sont en charge de l'homéostasie cellulaire au cours du développement, dans des situations physiologiques et pathologiques. La première phase effectrice, d'induction et de mise en œuvre de la mort cellulaire proprement dite, conduit au démantèlement de la cellule. Cette phase initiale est suivie par une phase d'élimination de la cellule mourante, qui débute le plus souvent avant le démantèlement complet de celle-ci, *via* une phagocytose spécialisée (157, 158, 164). Contrairement aux mécanismes régissant la phase effectrice de l'apoptose qui ont fait l'objet de multiples publications, les bases moléculaires de la capture et de la dégradation de la cible apoptotique ainsi que les conséquences sur la physiologie des cellules phagocytaires n'ont été étudiées que récemment. Nommée "*engulfment*" ou encore "efferocytose" par certains auteurs, la capture d'une cellule apoptotique constitue un acte singulier dans le domaine de la phagocytose. Tout d'abord, les "cibles" à capturer sont des cellules du soi, incluant les cellules du soi altérées dans le cas des cellules cancéreuses par exemple, et non des pathogènes. De plus, ce système d'élimination se doit d'être constitutivement actif compte tenu de la genèse continue de corps apoptotiques au sein des organismes pluricellulaires. Enfin, contrairement à la phagocytose de pathogènes, la capture de cibles apoptotiques est associée généralement à une réponse anti-inflammatoire de la part des phagocytes (157, 158, 164).

Considérés comme les phagocytes professionnels de référence, les macrophages jouent un rôle central dans le processus d'efferocytose. Les études visant à caractériser le processus global de capture des cellules apoptotiques se sont focalisées majoritairement sur ce modèle cellulaire (165, 167). Ainsi, les caractéristiques de cette forme de phagocytose ont été principalement déterminées à partir de ce modèle de phagocytes professionnels. Les macrophages expriment un arsenal de molécules de surface impliquées dans la reconnaissance de diverses molécules présentes à la surface de cellules apoptotiques et de molécules adaptatrices qui peuvent, le cas échéant, entraîner la capture des cellules apoptotiques (166). Au cours des dernières décennies, d'autres types cellulaires

ont été clairement identifiés comme pouvant contribuer à l'élimination de cellules mortes, tels que les cellules épithéliales (159, 162, 607), endothéliales (160) et les fibroblastes (161, 162), un ensemble de cellules collectivement nommées "phagocytes non-professionnels". La contribution de ces phagocytes non-professionnels dans la clairance des cellules apoptotiques peut être démontrée par deux exemples sans équivoque : (i) les cellules mortes sont capturées par les cellules avoisinantes dans les organismes pluricellulaires dépourvus de macrophages tels que le ver nématode *C. elegans* (647) et (ii) les souris dépourvues de macrophages se développent normalement (16). Ces deux observations soutiennent fermement l'axiome selon lequel les phagocytes non-professionnels participent à la clairance des cellules apoptotiques lorsque les macrophages sont absents ou lorsque leur capacité phagocytaire est saturée (162, 163, 647). Bien que les phagocytes non-professionnels comme les fibroblastes contribuent à la clairance des cellules apoptotiques, les mécanismes régissant les processus de reconnaissance, de capture ainsi que les mécanismes ultérieurs de maturation des vacuoles intracellulaires contenant les cibles apoptotiques n'ont pas été clairement identifiés.

Un travail du laboratoire a récemment mis en évidence l'internalisation de cellules apoptotiques de carcinome du col de l'utérus HPV18 positives (HeLa) et HPV16 positives (Ca Ski) par des fibroblastes primaires humains (HPFs pour *human primary fibroblasts*) lors d'expérimentations de co-culture *in vitro*. De façon intéressante, il a aussi été démontré que les cellules apoptotiques HPV positives pouvaient assurer le transfert horizontal des oncogènes d'HPV aux HPFs et permettre l'acquisition par les HPFs de propriétés de transformation (421). Dans ce contexte, nos objectifs principaux étaient de caractériser les déterminants cellulaires et moléculaires impliqués dans la capture des cellules cancéreuses apoptotiques par des HPFs, mais aussi dans la maturation consécutive des phagosomes.

Notre travail démontre que les HPFs internalisent les corps apoptotiques issus de cellules tumorales dérivées du cancer du col de l'utérus HeLa et Ca Ski et que cette capture dépend en grande partie du récepteur à 7 domaines transmembranaires BAI1 impliqué dans la reconnaissance des molécules de PS exposées à la surface des cellules apoptotiques. Basées sur l'utilisation de la microscopie confocale et de la cytométrie en flux, nos expérimentations révèlent que le processus d'internalisation est dépendant du cytosquelette d'actine actif et se poursuit par une séquence typique de maturation du phagosome. Ces observations dévoilent de nouvelles facettes de la biologie des HPFs liées au processus d'efferocytose.

Les fibroblastes sont le type cellulaire le plus abondant dans les tissus conjonctifs. Ces cellules mésenchymateuses sont spécialisées dans la sécrétion des macromolécules entrant dans la composition de la MEC et, participe de ce fait, à la structure des tissus biologiques (648, 649). Si les fibroblastes sont principalement connus pour exercer une variété de fonctions dans des processus

physiologiques (*e.g.* sécrétion de composants de la MEC et maintien de l'homéostasie de la MEC en régulant son "*turnover*" par la sécrétion de protéases, régulation de la différenciation épithéliale) ou dans des contextes pathologiques (*e.g.* régulation de l'inflammation, implication dans la cicatrisation des plaies) (648-651), ils peuvent aussi intervenir dans l'élimination des corps apoptotiques (161, 407, 421). Nos travaux de thèse confirment cette dernière fonction et complètent les études antérieures en apportant des précisions sur les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régissent le processus d'efferocytose par les HPFs.

Notre étude révèle que les HPFs sont capables de discriminer précisément les cibles apoptotiques mourantes/en apoptose précoce (EAC pour *Early Apoptotic/Dying Cells*) et les mortes/en apoptose tardive (LAC pour *Late Apoptotic/Dead Cells*). En effet, contrairement aux phagocytes professionnels comme les macrophages (364, 652), une large proportion des HPFs n'internalise pas de cellules apoptotiques intègres et entières mais seulement des fragments subcellulaires apoptotiques. Nos résultats s'accordent avec les données de la littérature indiquant que d'autres phagocytes non-professionnels, tels que des fibroblastes rénaux de hamster et des cellules épithéliales murines, capturent aussi préférentiellement des fragments subcellulaires apoptotiques (162, 607). Il est important de noter que pour ces comparaisons, nos expérimentations de co-culture ont été effectuées sur des périodes de maximum 6h afin de s'affranchir autant que possible des biais liés à l'évolution des cellules mourantes de l'apoptose précoce à tardive. Dans leur ensemble nos résultats suggèrent que les cellules apoptotiques acquièrent tardivement dans le processus de mort des propriétés nécessaires au déclenchement des mécanismes de capture par les HPFs.

Par ailleurs, la capture des LAC par les HPFs apparaît moins rapide et efficace que par les phagocytes professionnels tels que les macrophages dérivés de monocytes humains (M ϕ). Nos données corroborent celles obtenues à partir de fibroblastes de hamster (162), de cellules épithéliales (162, 607) et mésothéliales péritonéales (606) dont le potentiel de capture est aussi inférieur à celui de macrophages. De plus, la séquence d'événements observée sur 11 heures en utilisant la microscopie référencée en position suggère qu'après le premier contact entre le fibroblaste et la LAC, la capture de cette dernière requiert une période de quelques heures de reconnaissance et de transduction de signaux à l'issue de laquelle les HPFs déclenchent le remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire pour engager le processus d'efferocytose. Si ce laps de temps a déjà été décrit spécifiquement pour la capture de cibles apoptotiques par des phagocytes non-professionnels (159, 162), les mécanismes moléculaires qui régissent ce phénomène n'ont pas encore été élucidés à ce jour.

Nos analyses de microscopie confocale révèlent que le processus d'internalisation implique une séquence typique d'événements qui contribue à la formation du phagosome et correspond à la description de Swanson de la phagocytose (344). Médié par un remodelage actif du cytosquelette d'actine, ce processus implique initialement (i) une invagination de la membrane plasmique qui prend la forme d'une coupe/synapse phagocytaire, puis (ii) la formation de pseudopodes membranaires qui enveloppent la cible apoptotique et (iii) se rejoignent finalement à leurs extrémités pour former une vésicule intracellulaire délimitée par une membrane. La capture de cibles apoptotiques par un mécanisme apparenté à la macropinocytose ne peut être exclu compte tenu de l'observation de protrusions membranaires riches en actine et semblables à des "ruffles" à la surface des HPFs (157, 344, 346).

La diminution du taux de capture observée en présence de cytochalasine D a confirmé l'implication d'un mécanisme de capture dépendant de la polymérisation de l'actine. Par ailleurs, l'inhibition partielle de capture de LAC provoquée par le diméthyle amiloride (DMA) suggère qu'un mécanisme apparenté à la macropinocytose, tel que la phagocytose de type "*macropinocytotic mechanism*", pourrait vraisemblablement participer à la clairance des cellules apoptotiques par les HPFs, ce qui est en accord avec les rapports de plusieurs auteurs (157, 170, 197, 364, 367). Par des approches principalement basées sur la microscopie, ces auteurs démontrent que la capture de cellules apoptotiques implique initialement la formation d'un phagosome spacieux, permettant notamment la co-ingestion de marqueurs fluorescents solubles. Ils évoquent alors l'implication d'une phagocytose de type "*macropinocytotic mechanism*", nommée ainsi en référence à la macropinocytose avec laquelle elle partage des caractéristiques communes (cf. Revue de la littérature, paragraphe 2.3.4). Dans certaines de ces études, ces analyses morphologiques ont été confirmées par la démonstration d'une diminution du taux de capture de cellules apoptotiques par des phagocytes professionnels ou amateurs en présence d'amiloride. Cet agent pharmacologique est un inhibiteur des échangeurs Na^+/H^+ qui, comme son homologue le DMA, est connue pour inhiber le processus de macropinocytose sans impact détectable sur les autres voies d'endocytose (170, 346, 605). Sur la base de nos expérimentations de co-culture en présence de DMA, on ne peut exclure que la macropinocytose peut participer à la capture des cellules apoptotiques par les HPFs.

En plus de la phagocytose et de la macropinocytose, l'endocytose, un terme générique qui décrit toutes les formes d'internalisation de la membrane plasmique, comprend aussi l'endocytose dépendante de la cavéoline et de la clathrine, deux mécanismes qui génèrent la formation de petites invaginations de 60 à 200 nm de diamètre. Dans nos expérimentations, la participation de l'endocytose médiée par la clathrine pourrait aussi contribuer à la capture des LAC, comme le démontre la diminution de l'internalisation de LAC observée en présence de chlorpromazine.

Cependant, cet effet pourrait aussi être expliqué par les effets secondaires de cette drogue sur les autres voies d'endocytose. En effet, la chlorpromazine peut interférer avec la formation de phagosomes ou de macropinosomes (653), vraisemblablement à cause de la signalisation croisée entre la clathrine et l'actine (654). Ainsi, dans notre modèle, la phagocytose, vraisemblablement de type "*macropinocytotic mechanism*", et/ou la macropinocytose contribuent à l'élimination de cibles apoptotiques. Comme évoqué par Krysko et collaborateurs, la microscopie électronique serait une approche de choix pour visualiser de manière précise les modifications ultrastructurales des HPFs au cours et après la capture de cellules apoptotiques et permettrait, par l'observation de contact étroit ou non entre les LAC et les HPFs, de capture concomitante ou non de soluté, de confirmer la mise en jeu des mécanismes suggérée par nos approches de microscopie confocale et pharmacologiques. Enfin, l'observation en microscopie confocale de l'internalisation au sein d'une même vacuole d'une cellule apoptotique et de molécules solubles fluorescentes, telles que *Lucifer Yellow* et *horseradish peroxidase*, permettrait de confirmer dans le modèle cellulaire HPFs la mise en œuvre de mécanismes apparentés à la macropinocytose (365).

Concernant les macrophages, il a été montré que la phagocytose, y compris celle de type "*macropinocytotic mechanism*", pouvait participer à la capture de cellules apoptotiques, et ce, de façon dépendante de la PS (157, 365). Nous nous sommes ainsi intéressé à l'identification des molécules impliquées dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par les HPFs et la biogenèse des phagosomes. La première étape de l'élimination des cellules apoptotiques implique la distinction par le phagocyte entre des cellules viables et des cellules mortes. La translocation de lipides membranaires a lieu au cours des premières phases de l'apoptose et induit leur exposition sur le feuillet externe de la membrane plasmique où ils peuvent être reconnus par les phagocytes (191). Dans nos expérimentations, l'utilisation d'annexine V, un inhibiteur de l'efferocytose médiée par les PS, démontre que l'exposition de PS à la membrane plasmique de LAC est un élément crucial pour la reconnaissance des LAC par les HPFs et leur capture consécutive. La population cellulaire EAC est faiblement internalisée par les HPFs, comparativement au LAC, bien que les cellules de ces deux types de cellules apoptotiques présentent une exposition de la PS. De façon intéressante, il a été établi que l'exposition de PS est requise mais non suffisante pour que des cibles cellulaires soient capturées par des macrophages (652, 655, 656). Des études ont démontré par exemple que l'exposition de PS seule sur des cellules vivantes ne déclenche pas systématiquement leur reconnaissance et leur capture consécutive par des macrophages dérivés de monocytes humains ou des macrophages péritonéaux murins (655, 656). Aussi, comme suggéré par Borysenko et collaborateurs, une quantité minimum de molécules de PS exposées pourrait être nécessaire dans notre modèle pour permettre la capture efficace des cellules apoptotiques par les HPFs (195). Aussi,

quand la membrane plasmique des cellules apoptotiques perd son intégrité et se perméabilise (*i.e.* dans les cellules apoptotiques tardives), des molécules supplémentaires sont aptes à façonner une nouvelle combinaison de signaux "*eat-me*" ou "*don't eat-me*" (120) qui pourraient alors favoriser à leur tour la capture optimale des cellules apoptotiques par les HPFs. Nos données démontrent aussi que la capture des cellules apoptotiques est dépendante de Ca^{2+} et/ou Mg^{2+} , puisque ce processus est inhibé suite à la chélation de ces ions bivalents extracellulaires par l'EDTA. Ces éléments confirment en partie les résultats des rares études antérieures aux nôtres portant sur l'internalisation de cellules apoptotiques par des fibroblastes et ayant démontré que la capture de neutrophiles apoptotiques est inhibée en présence d'EDTA ou de liposomes composés de PS (161, 283). Nos résultats indiquent par ailleurs que le taux de capture diminue fortement lors d'expérimentations de co-culture réalisées à 4°C. De manière intéressante, ces deux conditions de co-culture (en présence d'EDTA ou à 4°C) ont été associées à l'inhibition de l'étape de reconnaissance par les macrophages de cellules apoptotiques prévenant ainsi la capture consécutive de celles-ci (657). Les intégrines étant connues pour être inactives à 4°C, l'hypothèse d'un rôle de ces récepteurs d'adhérence cellulaire dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par notre modèle de phagocytes amateurs semble cohérente. Parmi ces récepteurs, il est vraisemblable que ce phénomène implique par exemple les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et/ou $\alpha_v\beta_5$ comme cela a déjà été décrit par d'autres auteurs dans des modèles de fibroblastes (161, 253, 658).

En 2007, TIM-4 et BAI1 ont été initialement identifiés dans les macrophages comme des récepteurs associés à la phagocytose de corps apoptotiques, et ce, par la mise en œuvre de la reconnaissance directe de la PS qui leur donne la capacité d'induire des réponses d'endocytose de type phagocytose (261, 263). De manière intéressante, nos expérimentations démontrent que le récepteur BAI1 est exprimé par les HPFs et les macrophages, contrairement à TIM-4 dont l'expression est limitée aux macrophages. De plus, l'extinction de l'expression de BAI1 dans les HPFs par l'utilisation de siRNA induit une diminution significative des taux de transcrits BAI1 associée à une capacité de capture moindre, comme cela a déjà été décrit dans un modèle d'astrocytes (261). Des études antérieures ont montré que, lorsqu'elle est surexprimée dans les fibroblastes ovariens de hamster chinois LR73, la protéine BAI1 favorise la capture de cibles apoptotiques (261). Toutefois, notre étude est la première à démontrer dans un modèle d'expression endogène, par des tests de perte de fonction (siRNA), que la protéine BAI1 participe à la mise en œuvre du processus de capture de cellules apoptotiques par les HPFs.

Dans leur ensemble, nos résultats mettent en évidence l'implication de la reconnaissance de PS dans l'efferocytose des cellules apoptotiques et le rôle de BAI1 comme récepteur clé dans notre modèle de phagocytes amateurs. Dans nos expérimentations, le remodelage du cytosquelette

d'actine observé au cours de la capture de cellules apoptotiques par microscopie confocale peut être la conséquence d'une activation de la voie ELMO/Dock180/Rac1 instaurée par l'interaction du complexe tripartite du même nom avec le domaine intracellulaire de BAI1 (161). La diminution du taux de capture des cellules apoptotiques, lors de l'utilisation des approches basées sur le masquage des PS et l'extinction de l'expression de BAI1 endogène (siRNA), est significative mais reste partielle. Notre hypothèse est que d'autres cofacteurs ou molécules peuvent participer à la reconnaissance et activer une voie de signalisation nécessaire à la capture des cellules apoptotiques par les HPFs. L'une des molécules potentiellement impliquée pourrait être le récepteur de la vitronectine ($\alpha_v\beta_3$) dont l'expression par les fibroblastes a déjà été rapportée tout comme sa fonction en faveur de la capture de corps apoptotiques (161). Bien que le récepteur de la vitronectine soit défini comme étant une intégrine à même de déclencher la clairance de cellules apoptotiques *via* des interactions avec la TSP (161, 259), il a aussi été rapporté que ce récepteur phagocytaire lie la PS *via* des interactions indirectes impliquant les molécules adaptatrices MFG-E8 (253, 658). Le complexe protéique ainsi formé est capable de lier le complexe de signalisation ELMO/Dock180/Rac1 et d'activer la voie de signalisation correspondante (327). Ainsi, les voies de signalisation déclenchées par BAI1 et le récepteur de la vitronectine semblent intimement liées. Cette redondance apparente soutient l'idée d'un réseau moléculaire complexe rendant l'identification précise des couples ligands/récepteurs mis en jeu dans la reconnaissance et la capture de cibles apoptotiques difficile à mettre en œuvre.

Le matériel cellulaire internalisé par les phagocytes professionnels peut être dégradé suite à la maturation de vacuoles macroendocytaires par la fusion avec des endosomes précoces, tardifs puis des lysosomes (369, 659). Nous avons mis en évidence que la maturation des vacuoles contenant les cellules apoptotiques est associée à des changements dans la composition de leur membrane dont la nature est liée à la dégradation de leur contenu, comme le montre la détection de LAMP-1, un marqueur spécifique des lysosomes. De façon intéressante, nous avons observé une colocalisation entre LAMP-1 et la protéine LC3, une protéine classiquement associée à l'autophagie, au niveau des vacuoles phagocytaires. Florey et collaborateurs ont récemment mis en évidence une activité non-canonique de LC3 associée aux processus macroendocytaires (396, 608). Cette activité non-canonique, aussi dénommée *LC3-associated phagocytosis* (LAP), implique une lipidation directe de la protéine LC3 sur divers compartiments à simple membrane tels que les vacuoles contenant des cellules apoptotiques (397), mais aussi des phagosomes contenant des pathogènes (395), des macropinosomes et des vacuoles entotiques (396, 608). Basés sur l'étude de phagocytes professionnels, les travaux de Martinez et collaborateurs suggèrent que le recrutement direct de LC3 à la membrane des phagosomes favorise la maturation du phagosome et la dégradation subséquente de la cellule apoptotique phagocytée (397). À notre connaissance, nos résultats démontrent pour la

première fois que la LAP est observée dans les phagocytes non-professionnels. Cependant, son implication dans la dégradation des cellules apoptotiques, en particulier dans le contexte du transfert horizontal de gènes, reste à clarifier.

L'identification d'autres éléments impliqués dans la machinerie complexe de la capture de cellules apoptotiques par les HPFs et la caractérisation de leur fonction permettront de compléter ces travaux. La méthode d'analyse quantitative de la capture cellulaire basée sur la cytométrie en flux que nous avons développé lors de nos travaux de thèse sera alors cruciale pour l'identification des mécanismes de capture mis en œuvre par les HPFs. En effet, cette méthode est compatible avec l'utilisation d'approche d'interférence ARN, d'anticorps et de peptides bloquants, ainsi que de cocktail de sucres spécifiques. Elle pourrait permettre d'identifier, au cours de tests fonctionnels de capture, l'importance potentielle d'autres ligands associés aux cellules apoptotiques (*e.g.* CRT, MFG-E8) ou de récepteurs exprimés par les phagocytes [*e.g.* récepteurs de reconnaissance directe (stabiline 2, TIM-1) ou indirecte (TAM) des PS, intégrines, CD91/LRP, récepteurs spécifiques des glucides]. Avant d'envisager de telles études fonctionnelles, une analyse protéomique pourrait être réalisée afin d'identifier les cibles moléculaires exprimées par notre modèle de phagocytes les plus à même d'être impliquées dans le processus d'efferocytose.

De la capture de cellules apoptotiques tumorales HPV+ au THG et à l'acquisition de propriétés de croissance indépendante de l'ancrage

Les corps apoptotiques sont connus pour être phagocytés et l'ADN fragmenté qu'ils contiennent peut alors être transporté dans le noyau des cellules receveuses, s'intégrer dans son génome et être exprimé (410). La transformation par THG a été démontrée pour la première fois par Bergsmedh et collaborateurs dans un modèle de fibroblastes murins déficients en p53 co-cultivés avec des cellules apoptotiques issues de cellules transformées exprimant les oncogènes *c-myc* et *H-ras V¹²* (408). Ce modèle d'étude *princeps* a permis de démontrer que le THG et la transformation (définie comme l'acquisition de capacité de croissance en agar mou et de formation de tumeurs chez l'animal) par transfert d'oncogènes sont régulés par des voies de signalisation impliquant la protéine p53 dans la cellule receveuse. Puis, cette même équipe est parvenue à contourner le mécanisme de contrôle régi par p53 *via* le transfert horizontal de l'oncogène viral SV40LT conjointement aux oncogènes *c-myc* et *H-ras V¹²* à des fibroblastes sauvages murins (409).

En lien étroit avec les travaux antérieurs du laboratoire (421), nos travaux basés sur des expérimentations de co-culture *in vitro* confirment que les cellules apoptotiques dérivées de cancer du col de l'utérus conservent un potentiel oncogénique. Leur co-culture avec des fibroblastes

primaires humains sains confère à ces derniers une capacité de croissance indépendante de l'ancrage. De façon intéressante, les cellules ayant nouvellement acquis cette propriété de cellules transformées abritent des séquences d'oncogènes viraux initialement présentes dans les cellules cancéreuses donneuses. Dans les travaux du laboratoire antérieurs aux nôtres, le lien de causalité entre la capture des cibles apoptotiques et le transfert de gène/l'acquisition de propriétés de transformation n'était jusqu'alors que supposé (421).

L'originalité de notre approche, consistant à isoler dès la fin de la co-culture les fibroblastes ayant capturé des cellules apoptotiques (HPFs PKH26+/PKH67+) des fibroblastes co-cultivés mais non-internalisants (HPFs PKH26+), nous a permis d'établir la dépendance de l'acquisition de la capacité de croissance indépendante de l'ancrage et du transfert des oncogènes viraux à la capture des cellules apoptotiques. Cette dépendance non seulement à la co-culture mais à la capture des cellules apoptotiques confirme de fait leur fonction de vecteur de gènes dans notre modèle de THG comme défini par Holmgren (410). Cette stratégie visant à identifier spécifiquement le devenir des cellules receveuses ayant capturé des cellules apoptotiques pourrait être étendue à des expériences de caractérisation des pouvoirs de prolifération, de sécrétion de molécules (cytokines et MMP), de migration et d'invasion des HPFs.

Si le transfert des oncogènes E6 d'HPV a été clairement identifié, il n'est pas exclu que d'autres oncogènes présents dans les cellules tumorales puissent être impliqués dans la transformation cellulaire, comme E7, dont la présence et l'expression devront aussi être vérifiées dans les fibroblastes ayant capturé des cellules apoptotiques HPV positives, mais aussi les oncogènes cellulaires *c-myc*, *H-Ras* V^{12} et *c-fos*. En effet, il a été montré dans le processus de carcinogenèse classique du col de l'utérus que ces oncogènes cellulaires sont impliqués dans l'immortalisation et la transformation cellulaire en association avec les oncogènes d'HPV et sont indispensables pour surmonter complètement la fonction anti-oncogénique de p53 (660-662).

Nos résultats montrent que les cellules apoptotiques tumorales HPV positives n'engendrent pas seulement le THG et l'acquisition de propriétés caractéristiques de cellules transformées mais pourraient aussi induire la croissance tumorale dans un modèle murin, établissant alors la conservation de la capacité tumorigénique des cellules apoptotiques tumorales HPV positives *in vivo*. Bien que la prudence soit de mise quant à l'interprétation de la croissance tumorale observée après injection en intradermique de cellules apoptotiques HeLa chez les souris *nude*, il est vraisemblable que la signification biologique de cette croissance néoplasique soit associée à une transformation de cellules murines localisées au site de l'injection et potentiellement consécutive au transfert d'oncogènes viraux d'HPV18. Une analyse de la tumeur avec des approches immunohistochimiques et moléculaires (détection de séquences murines, humaines et virales par PCR) permettra (i) de

déterminer si, comme suggéré par notre modèle *in vitro*, les cellules apoptotiques HPV positives peuvent être à l'origine du transfert d'oncogènes dans des cellules murines *in vivo* et de leur transformation consécutive aboutissant au développement de la tumeur, et plus largement, (ii) de valider la pertinence du THG impliquant des cellules apoptotiques cancéreuses *in vivo*. En 2011, Trejo-Becerril et collaborateurs avaient déjà réalisé une tentative de transformation par le biais d'injection en intraveineuse de cellules apoptotiques HeLa dans un modèle de rat Wistar immunocompétent (614). Bien qu'ils aient démontré par PCR la présence des oncogènes E6 et E7 d'HPV18 dans le foie des animaux, ainsi que celles des transcrits de E7, les auteurs n'ont mis en évidence ni altération histologique ni croissance tumorale *in vivo*. Ceci suggère que les modalités d'administration des cellules apoptotiques utilisées dans notre modèle murin *nu/nu* (injection intradermique) semblent adaptées à la démonstration du THG et/ou la transformation subséquente *in vivo*.

Par l'utilisation de différents modèles, d'autres études s'intéressant à la transformation cellulaire induite par le transfert horizontal d'ADN sont parvenues aux mêmes conclusions quant à la capacité de l'ADN tumoral exogène d'induire la transformation cellulaire et/ou la tumorigenèse (pour revue (410)). Cependant, l'internalisation de cellules apoptotiques comme source d'ADN exogène n'est pas le seul mécanisme décrit dans la littérature comme pouvant contribuer à ces effets. Des auteurs affirment que l'ADN circulant, vraisemblablement issu du relargage de matériel génétique par les cellules ou les tissus, peut aussi être responsable de THG (424). En utilisant le surnageant de culture de cellules SW480 dérivées de cancer du colon, Anker et collaborateurs ont montré que la transformation de fibroblastes murins NIH3T3 était associée au transfert de l'oncogène *K-Ras* muté (439). Garcia-Olmo et collaborateurs ont observé la transformation et la tumorigénicité de NIH3T3 transfecté de manière passive avec le plasma de patients atteints de cancer du colon. De plus, les auteurs ont montré que le plasma d'individus sains n'était pas en mesure d'induire de tels effets ; le plasma de patients atteints de cancer du colon n'a pas induit la transformation de cellules souches humaines dérivées de tissus adipeux de patients sains provenant de déchets chirurgicaux (663). En basant leur approche sur les mêmes modèles que les deux études précédemment citées, Trejo-Becerril et collaborateurs ont non seulement confirmé ces résultats mais ont aussi démontré que l'induction de la transformation des cellules receveuses et l'acquisition de capacité tumorigénique pouvaient être annihilées par la déplétion de l'ADN des milieux conditionnés ou des sérums de patients (614). Par ailleurs, les effets observés sur les cellules NIH3T3 n'ont pu l'être sur des fibroblastes primaires humains, démontrant ainsi la difficulté de transformer des cellules primaires humaines par l'intermédiaire d'ADN extracellulaire a contrario des NIH3T3, des fibroblastes embryonnaires murins immortalisés et sujets à la transformation spontanée. Cette étude *in vitro* des

effets de milieux conditionnés a été étendue au milieu de culture de cellules HeLa et a permis de démontrer que ce dernier favorisait la formation de colonies/foyers de cellules NIH3T3ensemencées dans des conditions de dilution limite. Un tiers des colonies formées dans ces conditions de culture présentait des oncogènes E6 et E7 d'HPV18 détectés par PCR. Cependant, la capacité du surnageant de culture de cellules HeLa à induire la transformation cellulaire, vraisemblablement *via* l'ADN extracellulaire, n'a pu être confirmée *in vivo* comme le démontre l'absence de développement tumoral et d'altération histologique dans les organes de rats *nu/nu* ou immunocompétents ayant subi des injections intrapéritonéales quotidiennes de surnageant de culture de cellules HeLa pendant 30 jours. De plus, les auteurs ont démontré que l'ADN exogène provenant de cellules SW480 était capable de faciliter la progression tumorale dans un modèle de carcinogenèse colique chez le rat immunocompétent. En effet, le traitement de rats par le carcinogène chimique 1,2-diméthylhydrazine, associé à l'injection intraveineuse de cellules SW480, entraîne la survenue de tumeurs coliques dont le nombre est environ 5 fois supérieur au nombre de celles détectées chez les rats traités uniquement par le 1,2-diméthylhydrazine. Compte tenu de la détection de séquences de *K-Ras* muté spécifiquement dans les tumeurs associées à l'injection de cellules SW480, les auteurs suggèrent que le transfert d'ADN extracellulaire contribue à la progression tumorale. Bien que ce modèle démontre l'incidence du THG dans la progression cancéreuse *in vivo*, il n'est pas exclu que ce soit la capture des cellules SW480, utilisées comme source d'ADN exogène, qui puisse être à l'origine du THG et participer à la progression des tumeurs suite à leur mort par apoptose (614).

En ligne avec les travaux de Bergsmedh, Holmgren et Ehnfors (pour revue (410)) notre modèle de transfert horizontal d'oncogènes viraux dépendant de la capture de cellules apoptotiques s'oppose à cet autre modèle de THG impliquant, non pas la capture de cellules apoptotiques, mais la capture d'ADN circulant libéré par des cellules vivantes *via* un mécanisme apparenté à la transfection passive d'acides nucléiques (424, 614).

Suggéré par Harald zur Hausen, les HPV-HR sont les agents impliqués dans la transformation des cellules épithéliales du col de l'utérus, mais aussi des cellules épithéliales de l'anus et des voies aérodigestives supérieures. Les oncoprotéines virales E7 et E6 des HPV-HR, exprimées de façon accrue et dérégulée principalement suite à l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte, affectent de nombreux processus cellulaires et conduisent progressivement à l'immortalisation et à la transformation des cellules infectées (462). Le transfert vertical de gènes qualifie la transmission de matériel génétique d'une génération cellulaire à une autre. Dans le cas de cellules transformées, la transmission aux cellules filles du matériel génétique de nature oncogénique est responsable de la conservation du phénotype tumoral et est à l'origine du développement de tumeurs malignes. En marge de la voie classique de la transformation cellulaire

associée aux HPV, l'ensemble de nos résultats tend à démontrer l'existence d'une voie alternative de transformation associée au transfert horizontal d'oncogènes viraux dépendant de la capture de cellules apoptotiques. L'originalité de nos travaux repose sur deux particularités de notre modèle. (i) L'utilisation de cellules donneuses issues de cancer du col de l'utérus et de fibroblastes receveurs primaires humains prouve que l'acquisition de propriétés de transformation par THG est possible entre cellules humaines. (ii) Notre modèle implique des cellules donneuses abritant des séquences d'HPV, un virus à haut risque oncogénique naturellement impliqué dans la tumorigenèse de cellules humaines, notamment les oncogènes E6 d'HPV16 et -18, et des fibroblastes humains, les cellules majoritaires du microenvironnement tumoral. En l'occurrence, notre modèle se rapproche des conditions physiopathologiques d'un microenvironnement tumoral chez l'humain.

Bien qu'il soit admis que le processus d'apoptose est souvent inhibé dans les cancers humains, les cellules tumorales peuvent toutefois activer des mécanismes apoptotiques en réponse aux thérapies anticancéreuses ou à certains stress cellulaires comme par exemple l'hypoxie. En effet, des cellules en apoptose sont histologiquement détectables dans de nombreux cancers, notamment dans le cancer du col utérin (609, 610). Dans ce contexte tumoral, il est vraisemblable que le THG impliquant la capture de cellules apoptotiques puisse s'établir et participer à la progression tumorale (410).

De la Taille et collaborateurs ont notamment démontré *in vitro* que l'ADN fragmenté contenu dans des cellules apoptotiques tumorales dérivées de cancer prostatique peut être internalisé par d'autres cellules tumorales et contribuer à l'acquisition de propriétés de chimiorésistance dans le cas de transfert de gènes de résistances aux drogues (414). Il a aussi été suggéré que le THG entre cellules tumorales puisse expliquer, au moins en partie, l'accumulation d'altérations génétiques contribuant au développement des tumeurs malignes (407, 414). Cependant, à notre connaissance le transfert de matériel génétique entre des cellules tumorales *in vivo* n'a jamais été rapporté dans la littérature, sans doute en raison de la difficulté méthodologique pour déterminer l'origine de l'ADN dans les tumeurs.

Les cancers humains évoluent dans un microenvironnement complexe, le stroma tumoral qui inclut la matrice extracellulaire, les fibroblastes, les cellules endothéliales et inflammatoires. Des interactions dynamiques entre les cellules tumorales et le stroma existent et jouent un rôle important en faveur de la progression tumorale mais aussi dans les phénomènes d'invasion et de dissémination métastatique (664-667). De plus, ces interactions semblent impliquer et altérer les cellules du stroma. De nombreuses études ont non seulement rapporté la présence de mutations et de modifications épigénétiques dans les cellules du stroma associées à des carcinomes humains mais suggèrent en plus qu'elles favorisent probablement la progression du cancer (668-672). Concernant

la nature des altérations génétiques des cellules du stroma, certaines de ces études révèlent qu'elles peuvent être similaires à celles des tumeurs adjacentes évoquant alors la possible implication du THG (669, 672). Par ailleurs, le transfert d'ADN tumoral à des cellules endothéliales induit la formation de vaisseaux fonctionnels *in vivo* (409) suggérant que la communication par THG entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales environnantes favorise l'angiogenèse et participe ainsi à la transition vers un phénotype invasif. Concernant notre modèle, le transfert de séquences d'HPV de cellules épithéliales cancéreuses à des HPFs rend compréhensible la propagation de telles séquences dans les cellules mésenchymateuses environnant la tumeur comme observé par hybridation *in situ* dans des carcinomes indifférenciés du col de l'utérus (422, 423).

Enfin, les traitements par chimio- et/ou radiothérapies, entraînant la mort des cellules cancéreuses, pourraient par conséquent favoriser le THG. Dans ce contexte, le processus de THG pourrait être responsable de récurrences des mois ou des années après une rémission complète (673, 674).

Dans le cas du cancer du col de l'utérus et dans le contexte général de la carcinogenèse, un tel transfert peut aussi fournir une explication supplémentaire à la corrélation positive observée entre le taux d'apoptose intratumorale et plusieurs caractéristiques tumorales de mauvais pronostic comme la taille de la tumeur, le grade de la lésion, le phénotype métastatique (609-611, 675-677) ou à la corrélation négative observée entre le taux d'apoptose intratumorale et le taux de survie des patients (678).

Conclusion générale

Les altérations de l'apoptose jouent un rôle important dans le développement des cancers (29, 30) et peuvent conduire à une résistance aux thérapies (21, 32). Pour ces raisons, de nombreuses approches thérapeutiques visent à réactiver les voies de signalisation de l'apoptose dans les cellules cancéreuses (33-36). Le premier axe de notre travail de thèse a permis de mettre en lumière les propriétés antitumorales de l'ILG *via* une multiplicité d'actions sur des modèles cellulaires de cancer du col de l'utérus *in vitro*, incluant des activités non seulement anti-proliférative et pro-apoptotique, mais aussi anti-migratoire et inhibitrice de l'activité, de l'expression et/ou de la sécrétion de MMP-2 et -9. Nos données révèlent un fort potentiel de l'ILG contre différents types de cellules malignes et ouvrent le champ à de nouvelles modalités de traitement des cancers associés à HPV. Concernant la lignée cellulaire Ca Ski, p53 sauvage et représentative du carcinome du col utérin le plus fréquent, associé à une infection transformante par HPV de type 16, l'apoptose induite par l'ILG semble dépendante de p53 et de la mitochondrie, mais aussi de la voie des récepteurs de mort, comme attesté par l'augmentation des niveaux de protéines p53, la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial, la libération du cytochrome c et le clivage des caspases-9, -8 et -3. Ces effets pourraient être, au moins en partie, la conséquence de la diminution de l'expression de l'oncoprotéine virale E6 d'HPV16 induite par l'ILG entraînant la restauration de l'expression de p53. Par ailleurs, nos travaux démontrent pour la première fois que l'ILG inhibe la migration et l'activité, l'expression et/ou la sécrétion de MMP-2 et -9 du modèle cellulaire Ca Ski. Même si l'étude des effets de l'ILG sur le phénotype invasif des cellules Ca Ski devra être approfondie, nos résultats préliminaires suggèrent que ce flavonoïde présente un potentiel thérapeutique intéressant dans le traitement des carcinomes utérins agressifs. Les espoirs que l'ILG suscite doivent être confirmés par la preuve de son efficacité dans des études pré-cliniques, puis le cas échéant dans des études cliniques avant de trouver sa place en thérapeutique.

La sensibilisation de cellules cancéreuses à l'apoptose étant une approche de choix pour le traitement des cancers (33-36), la seconde partie de notre travail de thèse s'est intéressée au devenir des cellules tumorales apoptotiques HPV positives, plus particulièrement leur capture par des HPFs, un processus contribuant potentiellement au THG (421). Nos résultats obtenus *in vitro* ont permis de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la capture de cellules cancéreuses apoptotiques par des HPFs et dans la maturation consécutive des phagosomes, contribuant de fait à caractériser plus en détail l'efferocytose par des phagocytes non-professionnels, un processus peu décrit dans la littérature. Notre étude s'est principalement focalisée sur la caractérisation des interactions cellule phagocytaire/cellule apoptotique sur les plans morphologique et moléculaire et a nécessité la mise au point d'une méthode basée sur la cytométrie en flux

permettant une analyse quantitative de la capture des cibles apoptotiques par les HPFs. L'imagerie par microscopie confocale et les analyses de cytométrie en flux ont révélé que les HPFs se comportent comme des phagocytes non-professionnels, capables d'internaliser, avec une efficacité et une rapidité moindre comparativement aux phagocytes professionnels tels que des macrophages, des fragments subcellulaires plutôt que des cellules mourantes entières. Cette capture est dépendante du temps, de la température et des ions bivalents ; elle implique un mécanisme de phagocytose, vraisemblablement un type apparenté à la macropinocytose, et/ou de macropinocytose. Les HPFs, des composants majeurs du microenvironnement tumoral, peuvent donc contribuer à l'efferocytose de cellules cancéreuses apoptotiques. Certains déterminants moléculaires permettant la reconnaissance des cellules en apoptose tardive par les HPFs et/ou nécessaires à la biogenèse ou à la maturation des phagosomes ont aussi été identifiés tels que l'exposition de PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique des LAC, un marqueur canonique de l'apoptose dont la reconnaissance par les HPFs implique, au moins en partie, le récepteur BAI1. Après l'internalisation des LAC, la maturation du phagosome semble impliquer le processus de LAP, préalablement décrit dans des phagocytes professionnels, comme le démontre l'identification de LAMP-1 et de LC3-II à la membrane des phagosomes contenant les LAC. Par ailleurs, nos travaux confirment que la capture de cellules cancéreuses apoptotiques par des HPFs est indispensable au processus de THG et à l'acquisition consécutive de propriétés de croissance indépendante de l'ancrage dans notre modèle *in vitro* de co-culture. Au sein d'une tumeur, les cellules apoptotiques pourraient donc agir comme des vecteurs d'oncogènes qu'elles pourraient transférer aux cellules du microenvironnement tumoral après leur capture. La poursuite de ce travail chez l'animal permettra d'évaluer la pertinence de ce processus *in vivo*.

La compréhension toujours plus précise des mécanismes complexes de la carcinogenèse a contribué et contribue encore à l'amélioration constante de l'efficacité des traitements anticancéreux. Le THG associé à la capture de cellules apoptotiques constitue une thématique relativement récente mais prometteuse dans le contexte de la carcinogenèse puisqu'il semble avoir de nombreuses implications dans la progression tumorale. Permettant aux cellules de s'adapter, de survivre à un nouvel environnement et d'acquérir de fait un avantage prolifératif, mais aussi participant à la transformation cellulaire, le THG entre cellules de mammifères se présente comme un mécanisme alternatif de la carcinogenèse.

Références bibliographiques

1. Lockshin RA, William CM. Programmed Cell Death - II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol.* 1964;10:643-9.
2. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
3. Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology.* 1973 Jun;7(3):253-66.
4. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 2015 Jan;22(1):58-73.
5. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012 Jan;19(1):107-20.
6. Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 Jun;16(6):329-44.
7. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):347-54.
8. Lettre G, Hengartner MO. Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Feb;7(2):97-108.
9. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med.* 2009 Oct 15;361(16):1570-83.
10. Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, et al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell.* 2008 Dec 26;135(7):1311-23.
11. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005 Jul;1(2):112-9.
12. Vandenberghe P, Galluzzi L, Vandenberghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Oct;11(10):700-14.
13. Galluzzi L, Kepp O, Krautwald S, Kroemer G, Linkermann A. Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 Nov;35:24-32.
14. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 1994 Feb;124(4):619-26.
15. Overholtzer M, Brugge JS. The cell biology of cell-in-cell structures. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Oct;9(10):796-809.
16. Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki RA, McKercher SR, et al. Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development.* 2000 Dec;127(24):5245-52.
17. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell.* 1999 Jan 22;96(2):245-54.
18. Rathmell JC, Thompson CB. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell.* 2002 Apr;109 Suppl:S97-107.
19. O'Brien V. Viruses and apoptosis. *J Gen Virol.* 1998 Aug;79 (Pt 8):1833-45.
20. Conradt B. Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annu Rev Genet.* 2009;43:493-523.
21. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002 Apr;2(4):277-88.
22. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2002 Oct;2(10):735-47.
23. Waterhouse NJ, Trapani JA. CTL: Caspases Terminate Life, but that's not the whole story. *Tissue Antigens.* 2002 Mar;59(3):175-83.
24. Adrain C, Murphy BM, Martin SJ. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J Biol Chem.* 2005 Feb 11;280(6):4663-73.
25. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995 Mar 10;267(5203):1456-62.
26. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med.* 1999 Apr 6;130(7):591-601.

27. Rieux-Laucat F, Fischer A, Deist FL. Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol.* 2003 Jun;15(3):325-31.
28. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
29. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74.
30. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY).* 2012 May;4(5):330-49.
31. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Dec;7(12):979-87.
32. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb).* 2011 Apr;3(4):279-96.
33. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994 Apr 15;73(8):2013-26.
34. Fulda S. Regulation of cell death in cancer-possible implications for immunotherapy. *Front Oncol.* 2013;3:29.
35. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Jun;9(6):447-64.
36. Kumar M, Kaur V, Kumar S, Kaur S. Phytoconstituents as apoptosis inducing agents: strategy to combat cancer. *Cytotechnology.* 2015 Aug 4.
37. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007 Jul;14(7):1237-43.
38. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Mar;9(3):231-41.
39. Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ.* 2007 Jan;14(1):44-55.
40. Frisch SM. Caspase-8: fly or die. *Cancer Res.* 2008 Jun 15;68(12):4491-3.
41. Portela M, Richardson HE. Death takes a holiday--non-apoptotic role for caspases in cell migration and invasion. *EMBO Rep.* 2013 Feb;14(2):107-8.
42. Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol.* 2008 Feb 11;180(3):451-8.
43. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996 Oct 18;87(2):171.
44. Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* 2004 Dec 1;384(Pt 2):201-32.
45. Fraser A, Evan G. A license to kill. *Cell.* 1996 Jun 14;85(6):781-4.
46. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem.* 2009 Aug 14;284(33):21777-81.
47. Luthi AU, Martin SJ. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2007 Apr;14(4):641-50.
48. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516.
49. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 May 9;304(3):433-5.
50. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003 Nov 24;22(53):8590-607.
51. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):205-19.
52. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol.* 2002 Aug;192(2):131-7.
53. Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, et al. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med.* 1996 Sep 1;184(3):1155-60.

54. Mitchell P, Moyle J. Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. *Nature*. 1965 Dec 18;208(5016):1205-6.
55. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997 Nov 14;91(4):479-89.
56. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 May;8(5):405-13.
57. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999 Feb 4;397(6718):441-6.
58. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001 Mar 29;410(6828):549-54.
59. Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N, Mihara K. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J*. 2005 Apr 6;24(7):1375-86.
60. Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, et al. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem*. 2001 May 11;276(19):16391-8.
61. Norberg E, Gogvadze V, Ott M, Horn M, Uhlen P, Orrenius S, et al. An increase in intracellular Ca²⁺ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. *Cell Death Differ*. 2008 Dec;15(12):1857-64.
62. Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol*. 2006 May;16(5):264-72.
63. Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, et al. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol*. 2002 Sep;9(9):680-4.
64. Cande C, Vahsen N, Kouranti I, Schmitt E, Daugas E, Spahr C, et al. AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene*. 2004 Feb 26;23(8):1514-21.
65. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001 Jul 5;412(6842):95-9.
66. Cote J, Ruiz-Carrillo A. Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science*. 1993 Aug 6;261(5122):765-9.
67. Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem*. 2001 Dec 21;276(51):48404-9.
68. van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, et al. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ*. 2001 Dec;8(12):1136-42.
69. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Jan;15(1):49-63.
70. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007 Feb 26;26(9):1324-37.
71. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1322-6.
72. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1999 Aug 1;13(15):1899-911.
73. Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*. 2002 May;9(5):505-12.
74. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*. 2005 Feb 4;17(3):393-403.
75. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*. 2005 Jun 1;19(11):1294-305.
76. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*. 2007 Feb 9;315(5813):856-9.
77. Fletcher JI, Meusburger S, Hawkins CJ, Riglar DT, Lee EF, Fairlie WD, et al. Apoptosis is triggered when prosurvival Bcl-2 proteins cannot restrain Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Nov 25;105(47):18081-7.
78. Simmons MJ, Fan G, Zong WX, Degenhardt K, White E, Gelinas C. Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist. *Oncogene*. 2008 Feb 28;27(10):1421-8.

79. Simonen M, Keller H, Heim J. The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis. *Eur J Biochem.* 1997 Oct 1;249(1):85-91.
80. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):99-163.
81. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 1999 Jul 15;341 (Pt 2):233-49.
82. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 2006 Sep;7(9):880-5.
83. Gorman AM, Healy SJ, Jager R, Samali A. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther.* 2012 Jun;134(3):306-16.
84. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol.* 2011 Mar;13(3):184-90.
85. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science.* 2003 Apr 4;300(5616):135-9.
86. Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, et al. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol.* 2003 Jul 7;162(1):59-69.
87. Boya P, Cohen I, Zamzami N, Vieira HL, Kroemer G. Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ.* 2002 Apr;9(4):465-7.
88. Le Bras M, Rouy I, Brenner C. The modulation of inter-organelle cross-talk to control apoptosis. *Med Chem.* 2006 Jan;2(1):1-12.
89. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene.* 2008 Oct 27;27(50):6407-18.
90. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* 2001 Feb;21(4):1249-59.
91. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):355-65.
92. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol.* 2015 Jun;15(6):362-74.
93. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, et al. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science.* 1996 Nov 8;274(5289):990-2.
94. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.
95. Mace PD, Riedl SJ. Molecular cell death platforms and assemblies. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Dec;22(6):828-36.
96. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2006 Nov;6(11):813-22.
97. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 2003 Jul 25;114(2):181-90.
98. Varfolomeev E, Wayson SM, Dixit VM, Fairbrother WJ, Vucic D. The inhibitor of apoptosis protein fusion c-IAP2.MALT1 stimulates NF-kappaB activation independently of TRAF1 AND TRAF2. *J Biol Chem.* 2006 Sep 29;281(39):29022-9.
99. Vince JE, Pantaki D, Feltham R, Mace PD, Cordier SM, Schmukle AC, et al. TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (tnf) to efficiently activate nf-kappaB and to prevent tnf-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2009 Dec 18;284(51):35906-15.
100. Silke J, Meier P. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Feb;5(2).
101. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* 2002 Mar;3(3):221-7.
102. Pop C, Oberst A, Drag M, Van Raam BJ, Riedl SJ, Green DR, et al. FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity. *Biochem J.* 2011 Feb 1;433(3):447-57.
103. Khan N, Lawlor KE, Murphy JM, Vince JE. More to life than death: molecular determinants of necroptotic and non-necroptotic RIP3 kinase signaling. *Curr Opin Immunol.* 2014 Feb;26:76-89.
104. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998 Aug 21;94(4):491-501.

105. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998 Aug 21;94(4):481-90.
106. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, et al. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*. 1999 Aug 26;400(6747):886-91.
107. Kaufmann T, Tai L, Ekert PG, Huang DC, Norris F, Lindemann RK, et al. The BH3-only protein bid is dispensable for DNA damage- and replicative stress-induced apoptosis or cell-cycle arrest. *Cell*. 2007 Apr 20;129(2):423-33.
108. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. *Cell*. 2009 Sep 4;138(5):838-54.
109. Read SH, Baliga BC, Ekert PG, Vaux DL, Kumar S. A novel Apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex. *J Cell Biol*. 2002 Dec 9;159(5):739-45.
110. Tinel A, Tschopp J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*. 2004 May 7;304(5672):843-6.
111. Park HH, Logette E, Raunser S, Cuenin S, Walz T, Tschopp J, et al. Death domain assembly mechanism revealed by crystal structure of the oligomeric PIDDosome core complex. *Cell*. 2007 Feb 9;128(3):533-46.
112. Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*. 1993 Apr;67(4):2168-74.
113. Ince IA, Westenberg M, Vlak JM, Demirbag Z, Nalcacioglu R, van Oers MM. Open reading frame 193R of Chilo iridescent virus encodes a functional inhibitor of apoptosis (IAP). *Virology*. 2008 Jun 20;376(1):124-31.
114. Li Q, Liston P, Schokman N, Ho JM, Moyer RW. Amsacta moorei Entomopoxvirus inhibitor of apoptosis suppresses cell death by binding Grim and Hid. *J Virol*. 2005 Mar;79(6):3684-91.
115. Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol*. 1994 Apr;68(4):2521-8.
116. Fesik SW, Shi Y. Structural biology. Controlling the caspases. *Science*. 2001 Nov 16;294(5546):1477-8.
117. Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010 Aug;10(8):561-74.
118. Oberoi-Khanuja TK, Murali A, Rajalingam K. IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration. *Cell Death Dis*. 2013;4:e784.
119. Berthelet J, Dubrez L. Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). *Cells*. 2013;2(1):163-87.
120. Poon IK, Hulett MD, Parish CR. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ*. 2010 Mar;17(3):381-97.
121. Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT, et al. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 21;95(15):8461-6.
122. Widlak P. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim Pol*. 2000;47(4):1037-44.
123. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):96-9.
124. Ura S, Masuyama N, Graves JD, Gotoh Y. Caspase cleavage of MST1 promotes nuclear translocation and chromatin condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;98(18):10148-53.
125. Croft DR, Coleman ML, Li S, Robertson D, Sullivan T, Stewart CL, et al. Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J Cell Biol*. 2005 Jan 17;168(2):245-55.
126. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*. 2001 Apr;3(4):346-52.
127. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*. 2001 Apr;3(4):339-45.
128. Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol*. 1998 Feb 9;140(3):627-36.
129. Mollinedo F, Gajate C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis*. 2003 Oct;8(5):413-50.
130. Brancolini C, Benedetti M, Schneider C. Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO J*. 1995 Nov 1;14(21):5179-90.
131. Stegh AH, Peter ME. Apoptosis and caspases. *Cardiol Clin*. 2001 Feb;19(1):13-29.

132. Byun Y, Chen F, Chang R, Trivedi M, Green KJ, Cryns VL. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ.* 2001 May;8(5):443-50.
133. Nakanishi K, Maruyama M, Shibata T, Morishima N. Identification of a caspase-9 substrate and detection of its cleavage in programmed cell death during mouse development. *J Biol Chem.* 2001 Nov 2;276(44):41237-44.
134. Moss DK, Betin VM, Malesinski SD, Lane JD. A novel role for microtubules in apoptotic chromatin dynamics and cellular fragmentation. *J Cell Sci.* 2006 Jun 1;119(Pt 11):2362-74.
135. Kim W, Kook S, Kim DJ, Teodorof C, Song WK. The 31-kDa caspase-generated cleavage product of p130cas functions as a transcriptional repressor of E2A in apoptotic cells. *J Biol Chem.* 2004 Feb 27;279(9):8333-42.
136. Kook S, Kim DH, Shim SR, Kim W, Chun JS, Song WK. Caspase-dependent cleavage of tensin induces disruption of actin cytoskeleton during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Mar 28;303(1):37-45.
137. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 1995 Nov 1;182(5):1545-56.
138. Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Mar;10(3):221-37.
139. Segawa K, Kurata S, Yanagihashi Y, Brummelkamp TR, Matsuda F, Nagata S. Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science.* 2014 Jun 6;344(6188):1164-8.
140. Balasubramanian K, Schroit AJ. Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:701-34.
141. Vance JE, Steenbergen R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res.* 2005 Jul;44(4):207-34.
142. Sims PJ, Wiedmer T. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost.* 2001 Jul;86(1):266-75.
143. Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, et al. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol.* 2000 Jul;2(7):399-406.
144. Alder-Baerens N, Muller P, Pohl A, Korte T, Hamon Y, Chimini G, et al. Headgroup-specific exposure of phospholipids in ABCA1-expressing cells. *J Biol Chem.* 2005 Jul 15;280(28):26321-9.
145. Williamson P, Halleck MS, Malowitz J, Ng S, Fan X, Krahlung S, et al. Transbilayer phospholipid movements in ABCA1-deficient cells. *PLoS One.* 2007;2(8):e729.
146. Gao Y, Herndon JM, Zhang H, Griffith TS, Ferguson TA. Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1998 Sep 7;188(5):887-96.
147. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998 Feb 15;101(4):890-8.
148. Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity.* 2001 Jun;14(6):715-25.
149. Ariel A, Fredman G, Sun YP, Kantarci A, Van Dyke TE, Luster AD, et al. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat Immunol.* 2006 Nov;7(11):1209-16.
150. deCathelineau AM, Henson PM. The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays Biochem.* 2003;39:105-17.
151. Elliott MR, Ravichandran KS. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol.* 2010 Jun 28;189(7):1059-70.
152. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 1995 Feb;6(1):3-16.
153. Nagata S. Apoptosis and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Oct;1209:10-6.
154. Cvetanovic M, Ucker DS. Innate immune discrimination of apoptotic cells: repression of proinflammatory macrophage transcription is coupled directly to specific recognition. *J Immunol.* 2004 Jan 15;172(2):880-9.
155. Kim S, Elkon KB, Ma X. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity.* 2004 Nov;21(5):643-53.
156. Chung EY, Kim SJ, Ma XJ. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Res.* 2006 Feb;16(2):154-61.

157. Erwig LP, Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 2008 Feb;15(2):243-50.
158. Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS. Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Jan;5(1):a008748.
159. Monks J, Rosner D, Geske FJ, Lehman L, Hanson L, Neville MC, et al. Epithelial cells as phagocytes: apoptotic epithelial cells are engulfed by mammary alveolar epithelial cells and repress inflammatory mediator release. *Cell Death Differ.* 2005 Feb;12(2):107-14.
160. Dini L, Lentini A, Diez GD, Rocha M, Falasca L, Serafino L, et al. Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. *J Cell Sci.* 1995 Mar;108 (Pt 3):967-73.
161. Hall SE, Savill JS, Henson PM, Haslett C. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J Immunol.* 1994 Oct 1;153(7):3218-27.
162. Parnaik R, Raff MC, Scholes J. Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Curr Biol.* 2000 Jul 13;10(14):857-60.
163. Rabinovitch M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* 1995 Mar;5(3):85-7.
164. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):784-8.
165. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell.* 2004 May 7;14(3):277-87.
166. Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol.* 2007 Dec;7(12):964-74.
167. Devitt A, Marshall LJ. The innate immune system and the clearance of apoptotic cells. *J Leukoc Biol.* 2011 Sep;90(3):447-57.
168. Franc NC, White K, Ezekowitz RA. Phagocytosis and development: back to the future. *Curr Opin Immunol.* 1999 Feb;11(1):47-52.
169. Gregory CD. CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2000 Feb;12(1):27-34.
170. Hoffmann PR, deCathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL, et al. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol.* 2001 Nov 12;155(4):649-59.
171. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature.* 2009 Sep 10;461(7261):282-6.
172. Nishiura H, Shibuya Y, Yamamoto T. S19 ribosomal protein cross-linked dimer causes monocyte-predominant infiltration by means of molecular mimicry to complement C5a. *Lab Invest.* 1998 Dec;78(12):1615-23.
173. Hou Y, Plett PA, Ingram DA, Rajashekhar G, Orschell CM, Yoder MC, et al. Endothelial-monocyte-activating polypeptide II induces migration of endothelial progenitor cells via the chemokine receptor CXCR3. *Exp Hematol.* 2006 Aug;34(8):1125-32.
174. Truman LA, Ford CA, Pasikowska M, Pound JD, Wilkinson SJ, Dumitriu IE, et al. CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood.* 2008 Dec 15;112(13):5026-36.
175. Chalaris A, Rabe B, Paliga K, Lange H, Laskay T, Fielding CA, et al. Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood.* 2007 Sep 15;110(6):1748-55.
176. Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, et al. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell.* 2003 Jun 13;113(6):717-30.
177. Peter C, Waibel M, Radu CG, Yang LV, Witte ON, Schulze-Osthoff K, et al. Migration to apoptotic "find-me" signals is mediated via the phagocyte receptor G2A. *J Biol Chem.* 2008 Feb 29;283(9):5296-305.
178. Gude DR, Alvarez SE, Paugh SW, Mitra P, Yu J, Griffiths R, et al. Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *FASEB J.* 2008 Aug;22(8):2629-38.
179. Segundo C, Medina F, Rodriguez C, Martinez-Palencia R, Leyva-Cobian F, Brieva JA. Surface molecule loss and bleb formation by human germinal center B cells undergoing apoptosis: role of apoptotic blebs in monocyte chemotaxis. *Blood.* 1999 Aug 1;94(3):1012-20.
180. Torr EE, Gardner DH, Thomas L, Goodall DM, Bielemeier A, Willetts R, et al. Apoptotic cell-derived ICAM-3 promotes both macrophage chemoattraction to and tethering of apoptotic cells. *Cell Death Differ.* 2012 Apr;19(4):671-9.

181. Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell*. 2010 Mar 5;140(5):619-30.
182. Ravichandran KS. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity*. 2011 Oct 28;35(4):445-55.
183. Bournazou I, Pound JD, Duffin R, Bournazos S, Melville LA, Brown SB, et al. Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *J Clin Invest*. 2009 Jan;119(1):20-32.
184. Grimsley C, Ravichandran KS. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol*. 2003 Dec;13(12):648-56.
185. Brown S, Heinisch I, Ross E, Shaw K, Buckley CD, Savill J. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature*. 2002 Jul 11;418(6894):200-3.
186. Barclay AN, Van den Berg TK. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:25-50.
187. Khandelwal S, van Rooijen N, Saxena RK. Reduced expression of CD47 during murine red blood cell (RBC) senescence and its role in RBC clearance from the circulation. *Transfusion*. 2007 Sep;47(9):1725-32.
188. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*. 2005 Oct 21;123(2):321-34.
189. Lv Z, Bian Z, Shi L, Niu S, Ha B, Tremblay A, et al. Loss of Cell Surface CD47 Clustering Formation and Binding Avidity to SIRPalpha Facilitate Apoptotic Cell Clearance by Macrophages. *J Immunol*. 2015 Jul 15;195(2):661-71.
190. Crocker PR, Varki A. Sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol*. 2001 Jun;22(6):337-42.
191. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*. 1992 Apr 1;148(7):2207-16.
192. Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*. 1998 Jul;5(7):551-62.
193. Krahling S, Callahan MK, Williamson P, Schlegel RA. Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Cell Death Differ*. 1999 Feb;6(2):183-9.
194. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):1071-7.
195. Borisenko GG, Matsura T, Liu SX, Tyurin VA, Jianfei J, Serinkan FB, et al. Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells--existence of a threshold. *Arch Biochem Biophys*. 2003 May 1;413(1):41-52.
196. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 2007 Jan;13(1):54-61.
197. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med*. 2001 Sep 17;194(6):781-95.
198. Donnelly S, Roake W, Brown S, Young P, Naik H, Wordsworth P, et al. Impaired recognition of apoptotic neutrophils by the C1q/calreticulin and CD91 pathway in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006 May;54(5):1543-56.
199. Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, et al. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell*. 2003 Apr;4(4):587-98.
200. Gregory CD, Devitt A, Moffatt O. Roles of ICAM-3 and CD14 in the recognition and phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. *Biochem Soc Trans*. 1998 Nov;26(4):644-9.
201. Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*. 1998 Apr 2;392(6675):505-9.
202. Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, Henson PM. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol*. 1998 Dec 1;161(11):6250-7.
203. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:593-623.
204. Schlegel RA, Krahling S, Callahan MK, Williamson P. CD14 is a component of multiple recognition systems used by macrophages to phagocytose apoptotic lymphocytes. *Cell Death Differ*. 1999 Jun;6(6):583-92.

205. Radic M, Marion T, Monestier M. Nucleosomes are exposed at the cell surface in apoptosis. *J Immunol.* 2004 Jun 1;172(11):6692-700.
206. Leffler J, Herbert AP, Norstrom E, Schmidt CQ, Barlow PN, Blom AM, et al. Annexin-II, DNA, and histones serve as factor H ligands on the surface of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 2010 Feb 5;285(6):3766-76.
207. Furnrohr BG, Groer GJ, Sehnert B, Herrmann M, Voll RE. Interaction of histones with phospholipids--implications for the exposure of histones on apoptotic cells. *Autoimmunity.* 2007 Jun;40(4):322-6.
208. Azuma Y, Taniguchi A, Matsumoto K. Decrease in cell surface sialic acid in etoposide-treated Jurkat cells and the role of cell surface sialidase. *Glycoconj J.* 2000 May;17(5):301-6.
209. Meesmann HM, Fehr EM, Kierschke S, Herrmann M, Bilyy R, Heyder P, et al. Decrease of sialic acid residues as an eat-me signal on the surface of apoptotic lymphocytes. *J Cell Sci.* 2010 Oct 1;123(Pt 19):3347-56.
210. Duvall E, Wyllie AH, Morris RG. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology.* 1985 Oct;56(2):351-8.
211. Hart SP, Ross JA, Ross K, Haslett C, Dransfield I. Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes. *Cell Death Differ.* 2000 May;7(5):493-503.
212. Franz S, Herrmann K, Furnrohr BG, Sheriff A, Frey B, Gaipl US, et al. After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. *Cell Death Differ.* 2007 Apr;14(4):733-42.
213. Platt N, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S. Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 29;93(22):12456-60.
214. Gordon S. Macrophage-restricted molecules: role in differentiation and activation. *Immunol Lett.* 1999 Jan;65(1-2):5-8.
215. Oka K, Sawamura T, Kikuta K, Itokawa S, Kume N, Kita T, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Aug 4;95(16):9535-40.
216. Ramprasad MP, Fischer W, Witztum JL, Sambrano GR, Quehenberger O, Steinberg D. The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Oct 10;92(21):9580-4.
217. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1993 Jun 5;268(16):11811-6.
218. Greenberg ME, Sun M, Zhang R, Febbraio M, Silverstein R, Hazen SL. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med.* 2006 Nov 27;203(12):2613-25.
219. Ezekowitz RA, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med.* 1990 Dec 1;172(6):1785-94.
220. Dini L, Autuori F, Lentini A, Oliverio S, Piacentini M. The clearance of apoptotic cells in the liver is mediated by the asialoglycoprotein receptor. *FEBS Lett.* 1992 Jan 20;296(2):174-8.
221. Moynault A, Luciani MF, Chimini G. ABC1, the mammalian homologue of the engulfment gene *ced-7*, is required during phagocytosis of both necrotic and apoptotic cells. *Biochem Soc Trans.* 1998 Nov;26(4):629-35.
222. Verneret M, Tacnet-Delorme P, Osman R, Awad R, Grichine A, Kleman JP, et al. Relative contribution of c1q and apoptotic cell-surface calreticulin to macrophage phagocytosis. *J Innate Immun.* 2014;6(4):426-34.
223. Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehwet B, Gaboriaud C, et al. C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. *J Immunol.* 2008 Feb 15;180(4):2329-38.
224. Xu W, Berger SP, Trouw LA, de Boer HC, Schlagwein N, Mutsaers C, et al. Properdin binds to late apoptotic and necrotic cells independently of C3b and regulates alternative pathway complement activation. *J Immunol.* 2008 Jun 1;180(11):7613-21.
225. Marnell L, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clin Immunol.* 2005 Nov;117(2):104-11.
226. Gillmore JD, Hutchinson WL, Herbert J, Bybee A, Mitchell DA, Hasserjian RP, et al. Autoimmunity and glomerulonephritis in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene: SAP deficiency or strain combination? *Immunology.* 2004 Jun;112(2):255-64.
227. Rovere P, Peri G, Fazzini F, Bottazzi B, Doni A, Bondanza A, et al. The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood.* 2000 Dec 15;96(13):4300-6.

228. Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB. C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med*. 2000 Nov 6;192(9):1353-64.
229. Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, Witztum JL. C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 1;99(20):13043-8.
230. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. *J Exp Med*. 1999 Aug 16;190(4):585-90.
231. Bharadwaj D, Mold C, Markham E, Du Clos TW. Serum amyloid P component binds to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol*. 2001 Jun 1;166(11):6735-41.
232. Lu J, Marnell LL, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, Sun PD. Structural recognition and functional activation of FcgammaR by innate pentraxins. *Nature*. 2008 Dec 18;456(7224):989-92.
233. Schagat TL, Wofford JA, Wright JR. Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J Immunol*. 2001 Feb 15;166(4):2727-33.
234. Palaniyar N, Nadesalingam J, Clark H, Shih MJ, Dodds AW, Reid KB. Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin. *J Biol Chem*. 2004 Jul 30;279(31):32728-36.
235. Palaniyar N, Clark H, Nadesalingam J, Shih MJ, Hawgood S, Reid KB. Innate immune collectin surfactant protein D enhances the clearance of DNA by macrophages and minimizes anti-DNA antibody generation. *J Immunol*. 2005 Jun 1;174(11):7352-8.
236. Gil M, McCormack FX, Levine AM. Surfactant protein A modulates cell surface expression of CR3 on alveolar macrophages and enhances CR3-mediated phagocytosis. *J Biol Chem*. 2009 Mar 20;284(12):7495-504.
237. Honore C, Hummelshoj T, Hansen BE, Madsen HO, Eggleton P, Garred P. The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. *Arthritis Rheum*. 2007 May;56(5):1598-607.
238. Jensen ML, Honore C, Hummelshoj T, Hansen BE, Madsen HO, Garred P. Ficolin-2 recognizes DNA and participates in the clearance of dying host cells. *Mol Immunol*. 2007 Feb;44(5):856-65.
239. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol*. 2003 Nov;40(7):423-9.
240. Ghiran I, Barbashov SF, Klickstein LB, Tas SW, Jensenius JC, Nicholson-Weller A. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J Exp Med*. 2000 Dec 18;192(12):1797-808.
241. Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE, et al. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell*. 2003 Oct 3;115(1):13-23.
242. Kuraya M, Ming Z, Liu X, Matsushita M, Fujita T. Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. *Immunobiology*. 2005;209(9):689-97.
243. Korb LC, Ahearn JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol*. 1997 May 15;158(10):4525-8.
244. Klickstein LB, Barbashov SF, Liu T, Jack RM, Nicholson-Weller A. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity*. 1997 Sep;7(3):345-55.
245. Duus K, Hansen EW, Tacnet P, Frachet P, Arlaud GJ, Thielens NM, et al. Direct interaction between CD91 and C1q. *FEBS J*. 2010 Sep;277(17):3526-37.
246. Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Lunardi T, Arlaud GJ, Thielens NM, Frachet P. The lectin-like activity of human C1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition. *FEBS Lett*. 2008 Sep 3;582(20):3111-6.
247. Biro A, Ling WL, Arlaud GJ. Complement protein C1q recognizes enzymatically modified low-density lipoprotein through unesterified fatty acids generated by cholesterol esterase. *Biochemistry*. 2010 Mar 16;49(10):2167-76.
248. Arlaud GJ, Biro A, Ling WL. Enzymatically modified low-density lipoprotein is recognized by c1q and activates the classical complement pathway. *J Lipids*. 2011;2011:376092.
249. Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Verneret M, Gaboriaud C, Houen G, Duus K, et al. Investigations on the C1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition. *J Mol Biol*. 2011 Apr 29;408(2):277-90.
250. Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med*. 1998 Dec 21;188(12):2313-20.

251. Stuart LM, Takahashi K, Shi L, Savill J, Ezekowitz RA. Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. *J Immunol.* 2005 Mar 15;174(6):3220-6.
252. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature.* 1990 Jan 11;343(6254):170-3.
253. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature.* 2002 May 9;417(6885):182-7.
254. Nakano T, Ishimoto Y, Kishino J, Umeda M, Inoue K, Nagata K, et al. Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem.* 1997 Nov 21;272(47):29411-4.
255. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RB, Schouten A, Simmelink MJ, et al. Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J.* 1999 Oct 1;18(19):5166-74.
256. Balasubramanian K, Chandra J, Schroit AJ. Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition. *J Biol Chem.* 1997 Dec 5;272(49):31113-7.
257. Maiti SN, Balasubramanian K, Ramoth JA, Schroit AJ. Beta-2-glycoprotein 1-dependent macrophage uptake of apoptotic cells. Binding to lipoprotein receptor-related protein receptor family members. *J Biol Chem.* 2008 Feb 15;283(7):3761-6.
258. Savill J, Hogg N, Haslett C. Macrophage vitronectin receptor, CD36, and thrombospondin cooperate in recognition of neutrophils undergoing programmed cell death. *Chest.* 1991 Mar;99(3 Suppl):6S-7S.
259. Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest.* 1992 Oct;90(4):1513-22.
260. Gayen Betal S, Setty BN. Phosphatidylserine-positive erythrocytes bind to immobilized and soluble thrombospondin-1 via its heparin-binding domain. *Transl Res.* 2008 Oct;152(4):165-77.
261. Park D, Tosello-Trampont AC, Elliott MR, Lu M, Haney LB, Ma Z, et al. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature.* 2007 Nov 15;450(7168):430-4.
262. Mori K, Kanemura Y, Fujikawa H, Nakano A, Ikemoto H, Ozaki I, et al. Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) is expressed in human cerebral neuronal cells. *Neurosci Res.* 2002 May;43(1):69-74.
263. Kobayashi N, Karisola P, Pena-Cruz V, Dorfman DM, Jinushi M, Umetsu SE, et al. TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity.* 2007 Dec;27(6):927-40.
264. Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature.* 2007 Nov 15;450(7168):435-9.
265. Santiago C, Ballesteros A, Tami C, Martinez-Munoz L, Kaplan GG, Casasnovas JM. Structures of T Cell immunoglobulin mucin receptors 1 and 2 reveal mechanisms for regulation of immune responses by the TIM receptor family. *Immunity.* 2007 Mar;26(3):299-310.
266. Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Hashiguchi M, Azuma M, et al. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood.* 2009 Apr 16;113(16):3821-30.
267. Shakhov AN, Rybtsov S, Tumanov AV, Shulenin S, Dean M, Kuprash DV, et al. SMUCKLER/TIM4 is a distinct member of TIM family expressed by stromal cells of secondary lymphoid tissues and associated with lymphotoxin signaling. *Eur J Immunol.* 2004 Feb;34(2):494-503.
268. Miyake Y, Asano K, Kaise H, Uemura M, Nakayama M, Tanaka M. Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *J Clin Invest.* 2007 Aug;117(8):2268-78.
269. Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest.* 2008 May;118(5):1657-68.
270. Umetsu SE, Lee WL, McIntire JJ, Downey L, Sanjanwala B, Akbari O, et al. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat Immunol.* 2005 May;6(5):447-54.
271. Ichimura T, Mou S. Kidney injury molecule-1 in acute kidney injury and renal repair: a review. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* 2008 May;6(5):533-8.
272. Park D, Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS. The phosphatidylserine receptor TIM-4 does not mediate direct signaling. *Curr Biol.* 2009 Feb 24;19(4):346-51.
273. Park SY, Jung MY, Kim HJ, Lee SJ, Kim SY, Lee BH, et al. Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ.* 2008 Jan;15(1):192-201.
274. Park SY, Kim SY, Jung MY, Bae DJ, Kim IS. Epidermal growth factor-like domain repeat of stabilin-2 recognizes phosphatidylserine during cell corpse clearance. *Mol Cell Biol.* 2008 Sep;28(17):5288-98.

275. Harris EN, Weigel JA, Weigel PH. The human hyaluronan receptor for endocytosis (HARE/Stabilin-2) is a systemic clearance receptor for heparin. *J Biol Chem.* 2008 Jun 20;283(25):17341-50.
276. Nonaka H, Tanaka M, Suzuki K, Miyajima A. Development of murine hepatic sinusoidal endothelial cells characterized by the expression of hyaluronan receptors. *Dev Dyn.* 2007 Aug;236(8):2258-67.
277. He M, Kubo H, Morimoto K, Fujino N, Suzuki T, Takahashi T, et al. Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO Rep.* 2011 Apr;12(4):358-64.
278. Armstrong A, Ravichandran KS. Phosphatidylserine receptors: what is the new RAGE? *EMBO Rep.* 2011 Apr;12(4):287-8.
279. Choi SC, Simhadri VR, Tian L, Gil-Krzewska A, Krzewski K, Borrego F, et al. Cutting edge: mouse CD300f (CMRF-35-like molecule-1) recognizes outer membrane-exposed phosphatidylserine and can promote phagocytosis. *J Immunol.* 2011 Oct 1;187(7):3483-7.
280. Tian L, Choi SC, Murakami Y, Allen J, Morse HC, 3rd, Qi CF, et al. p85alpha recruitment by the CD300f phosphatidylserine receptor mediates apoptotic cell clearance required for autoimmunity suppression. *Nat Commun.* 2014;5:3146.
281. Clark GJ, Ju X, Tate C, Hart DN. The CD300 family of molecules are evolutionarily significant regulators of leukocyte functions. *Trends Immunol.* 2009 May;30(5):209-17.
282. Borrego F. The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system. *Blood.* 2013 Mar 14;121(11):1951-60.
283. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature.* 2000 May 4;405(6782):85-90.
284. Bose J, Gruber AD, Helming L, Schiebe S, Wegener I, Hafner M, et al. The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J Biol.* 2004;3(4):15.
285. Bratton DL, Henson PM. Apoptotic cell recognition: will the real phosphatidylserine receptor(s) please stand up? *Curr Biol.* 2008 Jan 22;18(2):R76-9.
286. Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK. JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science.* 2007 Oct 19;318(5849):444-7.
287. Devitt A, Parker KG, Ogden CA, Oldreive C, Clay MF, Melville LA, et al. Persistence of apoptotic cells without autoimmune disease or inflammation in CD14^{-/-} mice. *J Cell Biol.* 2004 Dec 20;167(6):1161-70.
288. Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, Hoffmann PR, Brown KK, Botto M, et al. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol.* 2002 Oct 1;169(7):3978-86.
289. Henson PM, Hume DA. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol.* 2006 May;27(5):244-50.
290. Gregory CD, Brown SB. Apoptosis: eating sensibly. *Nat Cell Biol.* 2005 Dec;7(12):1161-3.
291. Matzinger P. An innate sense of danger. *Semin Immunol.* 1998 Oct;10(5):399-415.
292. Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, et al. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev.* 2007 Dec;220:60-81.
293. Eue I, Pietz B, Storck J, Klempt M, Sorg C. Transendothelial migration of 27E10⁺ human monocytes. *Int Immunol.* 2000 Nov;12(11):1593-604.
294. Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2007 Dec;220:35-46.
295. Tsan MF, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol.* 2009 Jun;85(6):905-10.
296. Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, et al. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med.* 2012 Jun;18(6):911-7.
297. Shi Y, Mucsi AD, Ng G. Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. *Immunol Rev.* 2010 Jan;233(1):203-17.
298. Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Meister S, Munoz L, Heyder P, De Marchis F, et al. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med.* 2008 Dec 22;205(13):3007-18.

299. Blume KE, Soeroes S, Waibel M, Keppeler H, Wesselborg S, Herrmann M, et al. Cell surface externalization of annexin A1 as a failsafe mechanism preventing inflammatory responses during secondary necrosis. *J Immunol.* 2009 Dec 15;183(12):8138-47.
300. Blume KE, Soeroes S, Keppeler H, Stevanovic S, Kretschmer D, Rautenberg M, et al. Cleavage of annexin A1 by ADAM10 during secondary necrosis generates a monocytic "find-me" signal. *J Immunol.* 2012 Jan 1;188(1):135-45.
301. Gaipf US, Kuenkele S, Voll RE, Beyer TD, Kolowos W, Heyder P, et al. Complement binding is an early feature of necrotic and a rather late event during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 2001 Apr;8(4):327-34.
302. Brouckaert G, Kalai M, Krysko DV, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu MN, et al. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol Biol Cell.* 2004 Mar;15(3):1089-100.
303. Bottcher A, Gaipf US, Furnrohr BG, Herrmann M, Girkontaite I, Kalden JR, et al. Involvement of phosphatidylserine, alphavbeta3, CD14, CD36, and complement C1q in the phagocytosis of primary necrotic lymphocytes by macrophages. *Arthritis Rheum.* 2006 Mar;54(3):927-38.
304. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martinez D, Hernanz-Falcon P, et al. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature.* 2009 Apr 16;458(7240):899-903.
305. Ahrens S, Zelenay S, Sancho D, Hanc P, Kjaer S, Feest C, et al. F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity.* 2012 Apr 20;36(4):635-45.
306. Zhang JG, Czabotar PE, Policheni AN, Caminschi I, Wan SS, Kitsoulis S, et al. The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity.* 2012 Apr 20;36(4):646-57.
307. Kinchen JM, Ravichandran KS. Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells. *Nature.* 2010 Apr 1;464(7289):778-82.
308. Kinchen JM. A model to die for: signaling to apoptotic cell removal in worm, fly and mouse. *Apoptosis.* 2010 Sep;15(9):998-1006.
309. Ridley AJ. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 2001 Aug;114(Pt 15):2713-22.
310. Tosello-Tramont AC, Nakada-Tsukui K, Ravichandran KS. Engulfment of apoptotic cells is negatively regulated by Rho-mediated signaling. *J Biol Chem.* 2003 Dec 12;278(50):49911-9.
311. Nakaya M, Tanaka M, Okabe Y, Hanayama R, Nagata S. Opposite effects of rho family GTPases on engulfment of apoptotic cells by macrophages. *J Biol Chem.* 2006 Mar 31;281(13):8836-42.
312. Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jun;4(6):446-56.
313. Rohatgi R, Ho HY, Kirschner MW. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol.* 2000 Sep 18;150(6):1299-310.
314. Pruyne D, Evangelista M, Yang C, Bi E, Zigmund S, Bretscher A, et al. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science.* 2002 Jul 26;297(5581):612-5.
315. Freeman SA, Grinstein S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev.* 2014 Nov;262(1):193-215.
316. Wu YC, Horvitz HR. *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature.* 1998 Apr 2;392(6675):501-4.
317. Reddien PW, Horvitz HR. CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol.* 2000 Mar;2(3):131-6.
318. Gumienny TL, Brugnera E, Tosello-Tramont AC, Kinchen JM, Haney LB, Nishiwaki K, et al. CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell.* 2001 Oct 5;107(1):27-41.
319. Zhou Z, Caron E, Hartwig E, Hall A, Horvitz HR. The *C. elegans* PH domain protein CED-12 regulates cytoskeletal reorganization via a Rho/Rac GTPase signaling pathway. *Dev Cell.* 2001 Oct;1(4):477-89.
320. Brugnera E, Haney L, Grimsley C, Lu M, Walk SF, Tosello-Tramont AC, et al. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol.* 2002 Aug;4(8):574-82.
321. Lu M, Kinchen JM, Rossman KL, Grimsley C, Hall M, Sondek J, et al. A Steric-inhibition model for regulation of nucleotide exchange via the Dock180 family of GEFs. *Curr Biol.* 2005 Feb 22;15(4):371-7.
322. Lu M, Kinchen JM, Rossman KL, Grimsley C, deBakker C, Brugnera E, et al. PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Aug;11(8):756-62.

323. Gumienny TL, Hengartner MO. How the worm removes corpses: the nematode *C. elegans* as a model system to study engulfment. *Cell Death Differ.* 2001 Jun;8(6):564-8.
324. Tosello-Tramont AC, Kinchen JM, Brugnera E, Haney LB, Hengartner MO, Ravichandran KS. Identification of two signaling submodules within the CrkII/ELMO/Dock180 pathway regulating engulfment of apoptotic cells. *Cell Death Differ.* 2007 May;14(5):963-72.
325. deBakker CD, Haney LB, Kinchen JM, Grimsley C, Lu M, Klingele D, et al. Phagocytosis of apoptotic cells is regulated by a UNC-73/TRIO-MIG-2/RhoG signaling module and armadillo repeats of CED-12/ELMO. *Curr Biol.* 2004 Dec 29;14(24):2208-16.
326. Cote JF, Motoyama AB, Bush JA, Vuori K. A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P₃-binding domain is necessary for DOCK180 signalling. *Nat Cell Biol.* 2005 Aug;7(8):797-807.
327. Albert ML, Kim JI, Birge RB. α v β 5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol.* 2000 Dec;2(12):899-905.
328. Akakura S, Singh S, Spataro M, Akakura R, Kim JI, Albert ML, et al. The opsonin MFG-E8 is a ligand for the α v β 5 integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res.* 2004 Jan 15;292(2):403-16.
329. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, et al. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science.* 2004 May 21;304(5674):1147-50.
330. Wu Y, Singh S, Georgescu MM, Birge RB. A role for Mer tyrosine kinase in α v β 5 integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J Cell Sci.* 2005 Feb 1;118(Pt 3):539-53.
331. Martinez J. Prix Fixe: Efferocytosis as a Four-Course Meal. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015 Aug 26.
332. Liu QA, Hengartner MO. Candidate adaptor protein CED-6 promotes the engulfment of apoptotic cells in *C. elegans*. *Cell.* 1998 Jun 12;93(6):961-72.
333. Wu YC, Horvitz HR. The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell.* 1998 Jun 12;93(6):951-60.
334. Zhou Z, Hartwig E, Horvitz HR. CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell.* 2001 Jan 12;104(1):43-56.
335. Su HP, Nakada-Tsukui K, Tosello-Tramont AC, Li Y, Bu G, Henson PM, et al. Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J Biol Chem.* 2002 Apr 5;277(14):11772-9.
336. Manaka J, Kuraishi T, Shiratsuchi A, Nakai Y, Higashida H, Henson P, et al. Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J Biol Chem.* 2004 Nov 12;279(46):48466-76.
337. Kinchen JM, Cabello J, Klingele D, Wong K, Feichtinger R, Schnabel H, et al. Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*. *Nature.* 2005 Mar 3;434(7029):93-9.
338. Kuraishi T, Nakagawa Y, Nagaosa K, Hashimoto Y, Ishimoto T, Moki T, et al. Pretaporter, a *Drosophila* protein serving as a ligand for Draper in the phagocytosis of apoptotic cells. *EMBO J.* 2009 Dec 16;28(24):3868-78.
339. Park SY, Kang KB, Thapa N, Kim SY, Lee SJ, Kim IS. Requirement of adaptor protein GULP during stabilin-2-mediated cell corpse engulfment. *J Biol Chem.* 2008 Apr 18;283(16):10593-600.
340. Kiss RS, Elliott MR, Ma Z, Marcel YL, Ravichandran KS. Apoptotic cells induce a phosphatidylserine-dependent homeostatic response from phagocytes. *Curr Biol.* 2006 Nov 21;16(22):2252-8.
341. Kiss RS, Ma Z, Nakada-Tsukui K, Brugnera E, Vassiliou G, McBride HM, et al. The lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP) adapter protein GULP mediates trafficking of the LRP ligand prosaposin, leading to sphingolipid and free cholesterol accumulation in late endosomes and impaired efflux. *J Biol Chem.* 2006 Apr 28;281(17):12081-92.
342. Landry YD, Denis M, Nandi S, Bell S, Vaughan AM, Zha X. ATP-binding cassette transporter A1 expression disrupts raft membrane microdomains through its ATPase-related functions. *J Biol Chem.* 2006 Nov 24;281(47):36091-101.
343. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:857-902.
344. Swanson JA. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Aug;9(8):639-49.
345. Kerr MC, Teasdale RD. Defining macropinocytosis. *Traffic.* 2009 Apr;10(4):364-71.
346. Swanson JA, Watts C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 1995 Nov;5(11):424-8.
347. Mercer J, Helenius A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol.* 2009 May;11(5):510-20.

348. West MA, Bretscher MS, Watts C. Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol.* 1989 Dec;109(6 Pt 1):2731-9.
349. Koivusalo M, Welch C, Hayashi H, Scott CC, Kim M, Alexander T, et al. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J Cell Biol.* 2010 Feb 22;188(4):547-63.
350. Brodsky FM, Chen CY, Kneuhl C, Towler MC, Wakeham DE. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:517-68.
351. Fujimoto LM, Roth R, Heuser JE, Schmid SL. Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic.* 2000 Feb;1(2):161-71.
352. Qualmann B, Kessels MM, Kelly RB. Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 2000 Sep 4;150(5):F111-6.
353. Mallet WG, Maxfield FR. Endocytosis. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 2000;30:109-25.
354. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 2003 Mar 6;422(6927):37-44.
355. Nabi IR, Le PU. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol.* 2003 May 26;161(4):673-7.
356. Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:61-98.
357. Griffin FM, Jr., Griffin JA, Leider JE, Silverstein SC. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J Exp Med.* 1975 Nov 1;142(5):1263-82.
358. Griffin FM, Jr., Griffin JA, Silverstein SC. Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes. *J Exp Med.* 1976 Sep 1;144(3):788-809.
359. Swanson JA, Baer SC. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* 1995 Mar;5(3):89-93.
360. Kaplan G, Bertheussen K. The morphology of echinoid phagocytes and mouse peritoneal macrophages during phagocytosis in vitro. *Scand J Immunol.* 1977;6(12):1289-96.
361. Allen LA, Aderem A. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med.* 1996 Aug 1;184(2):627-37.
362. Fiorentini C, Falzano L, Fabbri A, Stringaro A, Logozzi M, Travaglione S, et al. Activation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor 1 induces macropinocytosis and scavenging activity in epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 2001 Jul;12(7):2061-73.
363. Jersmann HP, Dransfield I, Hart SP. Fetuin/alpha2-HS glycoprotein enhances phagocytosis of apoptotic cells and macropinocytosis by human macrophages. *Clin Sci (Lond).* 2003 Sep;105(3):273-8.
364. Xu W, Roos A, Schlagwein N, Woltman AM, Daha MR, van Kooten C. IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood.* 2006 Jun 15;107(12):4930-7.
365. Krysko DV, D'Herde K, Vandenabeele P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis.* 2006 Oct;11(10):1709-26.
366. Krysko DV, Brouckaert G, Kalai M, Vandenabeele P, D'Herde K. Mechanisms of internalization of apoptotic and necrotic L929 cells by a macrophage cell line studied by electron microscopy. *J Morphol.* 2003 Dec;258(3):336-45.
367. Krysko DV, Denecker G, Festjens N, Gabriels S, Parthoens E, D'Herde K, et al. Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ.* 2006 Dec;13(12):2011-22.
368. Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J.* 2002 Sep 15;366(Pt 3):689-704.
369. Kinchen JM, Ravichandran KS. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Oct;9(10):781-95.
370. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Aug;10(8):513-25.
371. Ravichandran KS. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J Exp Med.* 2010 Aug 30;207(9):1807-17.
372. Yu X, Odera S, Chuang CH, Lu N, Zhou Z. C. elegans Dynamin mediates the signaling of phagocytic receptor CED-1 for the engulfment and degradation of apoptotic cells. *Dev Cell.* 2006 Jun;10(6):743-57.
373. Kitano M, Nakaya M, Nakamura T, Nagata S, Matsuda M. Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature.* 2008 May 8;453(7192):241-5.

374. Vieira OV, Botelho RJ, Rameh L, Brachmann SM, Matsuo T, Davidson HW, et al. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J Cell Biol.* 2001 Oct 1;155(1):19-25.
375. Zou W, Lu Q, Zhao D, Li W, Mapes J, Xie Y, et al. *Caenorhabditis elegans* myotubularin MTM-1 negatively regulates the engulfment of apoptotic cells. *PLoS Genet.* 2009 Oct;5(10):e1000679.
376. Nordmann M, Cabrera M, Perz A, Brocker C, Ostrowicz C, Engelbrecht-Vandre S, et al. The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Curr Biol.* 2010 Sep 28;20(18):1654-9.
377. Wurmser AE, Sato TK, Emr SD. New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol.* 2000 Oct 30;151(3):551-62.
378. Poteryaev D, Datta S, Ackema K, Zerial M, Spang A. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell.* 2010 Apr 30;141(3):497-508.
379. Lukacs GL, Rotstein OD, Grinstein S. Determinants of the phagosomal pH in macrophages. In situ assessment of vacuolar H(+)-ATPase activity, counterion conductance, and H+ "leak". *J Biol Chem.* 1991 Dec 25;266(36):24540-8.
380. Cantalupo G, Alifano P, Roberti V, Bruni CB, Bucci C. Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *EMBO J.* 2001 Feb 15;20(4):683-93.
381. Johansson M, Rocha N, Zwart W, Jordens I, Janssen L, Kuijl C, et al. Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betaIII spectrin. *J Cell Biol.* 2007 Feb 12;176(4):459-71.
382. Harrison RE, Bucci C, Vieira OV, Schroer TA, Grinstein S. Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol.* 2003 Sep;23(18):6494-506.
383. Vieira OV, Bucci C, Harrison RE, Trimble WS, Lanzetti L, Gruenberg J, et al. Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol.* 2003 Apr;23(7):2501-14.
384. Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saftig P, Grinstein S. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J.* 2007 Jan 24;26(2):313-24.
385. Griffiths G, Hoflack B, Simons K, Mellman I, Kornfeld S. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell.* 1988 Feb 12;52(3):329-41.
386. Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG, Gruenberg J. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature.* 1998 Mar 12;392(6672):193-7.
387. Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, Gould R, Bryant NJ, Gaullier JM, et al. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* 2000 Sep 1;19(17):4577-88.
388. Gordon AH, Hart PD, Young MR. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature.* 1980 Jul 3;286(5768):79-80.
389. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol.* 2008 May;4(5):278-86.
390. DeCoursey TE. Voltage-gated proton channels find their dream job managing the respiratory burst in phagocytes. *Physiology (Bethesda).* 2010 Feb;25(1):27-40.
391. Turk B, Dolenc I, Turk V, Bieth JG. Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry.* 1993 Jan 12;32(1):375-80.
392. Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Mar 7;1477(1-2):98-111.
393. He B, Lu N, Zhou Z. Cellular and nuclear degradation during apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Dec;21(6):900-12.
394. Botelho RJ, Grinstein S. Phagocytosis. *Curr Biol.* 2011 Jul 26;21(14):R533-8.
395. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature.* 2007 Dec 20;450(7173):1253-7.
396. Florey O, Kim SE, Sandoval CP, Haynes CM, Overholtzer M. Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat Cell Biol.* 2011 Nov;13(11):1335-43.
397. Martinez J, Almendinger J, Oberst A, Ness R, Dillon CP, Fitzgerald P, et al. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Oct 18;108(42):17396-401.
398. Lee HK, Mattei LM, Steinberg BE, Alberts P, Lee YH, Chervonsky A, et al. In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity.* 2010 Feb 26;32(2):227-39.

399. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 2014 Jan;24(1):24-41.
400. Kim JY, Zhao H, Martinez J, Doggett TA, Kolesnikov AV, Tang PH, et al. Noncanonical autophagy promotes the visual cycle. *Cell.* 2013 Jul 18;154(2):365-76.
401. Martinez J, Malireddi RK, Lu Q, Cunha LD, Pelletier S, Gingras S, et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat Cell Biol.* 2015 Jul;17(7):893-906.
402. Florey O, Gammoh N, Kim SE, Jiang X, Overholtzer M. V-ATPase and osmotic imbalances activate endolysosomal LC3 lipidation. *Autophagy.* 2015;11(1):88-99.
403. Boyle KB, Randow F. Rubicon swaps autophagy for LAP. *Nat Cell Biol.* 2015 Jul;17(7):843-5.
404. Henault J, Martinez J, Riggs JM, Tian J, Mehta P, Clarke L, et al. Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes. *Immunity.* 2012 Dec 14;37(6):986-97.
405. Ma J, Becker C, Lowell CA, Underhill DM. Dectin-1-triggered recruitment of light chain 3 protein to phagosomes facilitates major histocompatibility complex class II presentation of fungal-derived antigens. *J Biol Chem.* 2012 Oct 5;287(41):34149-56.
406. Romao S, Gasser N, Becker AC, Guhl B, Bajagic M, Vanoaica D, et al. Autophagy proteins stabilize pathogen-containing phagosomes for prolonged MHC II antigen processing. *J Cell Biol.* 2013 Dec 9;203(5):757-66.
407. Holmgren L, Szeles A, Rajnavolgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood.* 1999 Jun 1;93(11):3956-63.
408. Bergsmeth A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, et al. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 May 22;98(11):6407-11.
409. Ehnfors J, Kost-Alimova M, Persson NL, Bergsmeth A, Castro J, Levchenko-Tegnebratt T, et al. Horizontal transfer of tumor DNA to endothelial cells in vivo. *Cell Death Differ.* 2009 May;16(5):749-57.
410. Holmgren L. Horizontal gene transfer: you are what you eat. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 May 21;396(1):147-51.
411. Smets BF, Barkay T. Horizontal gene transfer: perspectives at a crossroads of scientific disciplines. *Nat Rev Microbiol.* 2005 Sep;3(9):675-8.
412. Soucy SM, Huang J, Gogarten JP. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat Rev Genet.* 2015 Aug;16(8):472-82.
413. Spetz AL, Patterson BK, Lore K, Andersson J, Holmgren L. Functional gene transfer of HIV DNA by an HIV receptor-independent mechanism. *J Immunol.* 1999 Jul 15;163(2):736-42.
414. de la Taille A, Chen MW, Burchardt M, Chopin DK, Buttyan R. Apoptotic conversion: evidence for exchange of genetic information between prostate cancer cells mediated by apoptosis. *Cancer Res.* 1999 Nov 1;59(21):5461-3.
415. Bergsmeth A, Szeles A, Spetz AL, Holmgren L. Loss of the p21(Cip1/Waf1) cyclin kinase inhibitor results in propagation of horizontally transferred DNA. *Cancer Res.* 2002 Jan 15;62(2):575-9.
416. Bergsmeth A, Ehnfors J, Kawane K, Motoyama N, Nagata S, Holmgren L. DNase II and the Chk2 DNA damage pathway form a genetic barrier blocking replication of horizontally transferred DNA. *Mol Cancer Res.* 2006 Mar;4(3):187-95.
417. Holmgren L, Bergsmeth A, Spetz AL. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Vox Sang.* 2002 Aug;83 Suppl 1:305-6.
418. Yan B, Wang H, Li F, Li CY. Regulation of mammalian horizontal gene transfer by apoptotic DNA fragmentation. *Br J Cancer.* 2006 Dec 18;95(12):1696-700.
419. Bisset LR, Boni J, Lutz H, Schupbach J. Lack of evidence for PERV expression after apoptosis-mediated horizontal gene transfer between porcine and human cells. *Xenotransplantation.* 2007 Jan;14(1):13-24.
420. Burghoff S, Ding Z, Godecke S, Assmann A, Wirrwar A, Buchholz D, et al. Horizontal gene transfer from human endothelial cells to rat cardiomyocytes after intracoronary transplantation. *Cardiovasc Res.* 2008 Feb 1;77(3):534-43.
421. Gaiffe E, Pretet JL, Launay S, Jacquin E, Saunier M, Hetzel G, et al. Apoptotic HPV positive cancer cells exhibit transforming properties. *PLoS One.* 2012;7(5):e36766.
422. Unger ER, Vernon SD, Hewan-Lowe KO, Lee DR, Thoms WW, Reeves WC. An unusual cervical carcinoma showing exception to epitheliotropism of human papillomavirus. *Hum Pathol.* 1999 Apr;30(4):483-5.
423. Grayson W, Taylor LF, Cooper K. Adenoid basal carcinoma of the uterine cervix: detection of integrated human papillomavirus in a rare tumor of putative "reserve cell" origin. *Int J Gynecol Pathol.* 1997 Oct;16(4):307-12.

424. Gahan PB, Stroun M. The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochem Funct.* 2010 Oct;28(7):529-38.
425. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948 Feb;142(3-4):241-3.
426. Stroun M, Anker P, Auderset G. Natural release of nucleic acids from bacteria into plant cells. *Nature.* 1970 Aug 8;227(5258):607-8.
427. Stroun M, Anker P. Nucleic acids spontaneously released by living frog auricles. *Biochem J.* 1972 Jul;128(3):100P-1P.
428. Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res.* 1975 Sep;35(9):2375-82.
429. Pelc SR. Turnover of DNA and function. *Nature.* 1968 Jul 13;219(5150):162-3.
430. Adams DH. The problem of cytoplasmic DNA: its extrusion/uptake by cultured cells and its possible role in cell-cell information transfer. *Int J Biochem.* 1985;17(11):1133-41.
431. Stroun M, Anker P, Charles P, Ledoux L. Translocation of DNA of bacterial origin in *Lycopersicum esculentum* by ultracentrifugation in caesium chloride gradient. *Nature.* 1967 Aug 26;215(5104):975-6.
432. Mitra I, Khare NK, Raghuram GV, Chaubal R, Khambatti F, Gupta D, et al. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. *J Biosci.* 2015 Mar;40(1):91-111.
433. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(1):65-73.
434. Anker P, Jachertz D, Stroun M, Brogger R, Lederrey C, Henri J, et al. The role of extracellular DNA in the transfer of information from T to B human lymphocytes in the course of an immune response. *J Immunogenet.* 1980 Dec;7(6):475-81.
435. Fahmy OG, Fahmy DJ. Induction of mutations by deoxyribonucleic acid in *Drosophila melanogaster*. *Nature.* 1961 Aug 19;191:776-9.
436. Fox AS, Yoon SB, Gelbart WM. DNA-induced transformation in *Drosophila*: genetic analysis of transformed stocks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971 Feb;68(2):342-6.
437. Gahan PB, Wyndaele R, Mantell S, Boggetti B. Evidence that direct DNA uptake through cut shoots leads to genetic transformation of *Solanum aviculare* Forst. *Cell Biochem Funct.* 2003 Mar;21(1):11-7.
438. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology.* 1989;46(5):318-22.
439. Anker P, Lyautey J, Lefort F, Lederrey C, Stroun M. [Transformation of NIH/3T3 cells and SW 480 cells displaying K-ras mutation]. *C R Acad Sci III.* 1994 Oct;317(10):869-74.
440. Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Jr., Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1981 Jul 6;645(1):63-70.
441. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987 Jul 5;262(19):9412-20.
442. Dvorak HF, Quay SC, Orenstein NS, Dvorak AM, Hahn P, Bitzer AM, et al. Tumor shedding and coagulation. *Science.* 1981 May 22;212(4497):923-4.
443. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Aug;21(4):575-81.
444. Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009 Aug;9(8):581-93.
445. Booth AM, Fang Y, Fallon JK, Yang JM, Hildreth JE, Gould SJ. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol.* 2006 Mar 13;172(6):923-35.
446. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia.* 2006 Sep;20(9):1487-95.
447. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):654-9.
448. Harding CV, Heuser JE, Stahl PD. Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol.* 2013 Feb 18;200(4):367-71.
449. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Thery C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic.* 2011 Dec;12(12):1659-68.

450. Chaput N, Thery C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol.* 2011 Sep;33(5):419-40.
451. Rak J. Microparticles in cancer. *Seminars in thrombosis and hemostasis.* 2010 Nov;36(8):888-906.
452. Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* 2011 Jun 1;71(11):3792-801.
453. Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res.* 2011 Mar 1;17(5):959-64.
454. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics.* 2009 Jun;6(3):267-83.
455. Keller S, Ridinger J, Rupp AK, Janssen JW, Altevogt P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med.* 2011;9:86.
456. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun.* 2011;2:180.
457. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology.* 2013 Oct;445(1-2):2-10.
458. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):12-9.
459. Pretet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Charlot JF, Bouhour D, Kantelip B, et al. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. *Int J Cancer.* 2008 Jan 15;122(2):428-32.
460. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer.* 2011 Feb 15;128(4):927-35.
461. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
462. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002 May;2(5):342-50.
463. Durst M, Croce CM, Gissmann L, Schwarz E, Huebner K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Feb;84(4):1070-4.
464. Bhattacharjee B, Sengupta S. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology.* 2006 Oct 25;354(2):280-5.
465. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993 Apr;9(4):138-41.
466. Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe.* 2014 Mar 12;15(3):266-82.
467. Gage JR, Meyers C, Wettstein FO. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol.* 1990 Feb;64(2):723-30.
468. McLaughlin-Drubin ME, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology.* 2009 Feb 20;384(2):335-44.
469. Jones DL, Thompson DA, Munger K. Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology.* 1997 Dec 8;239(1):97-107.
470. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 1996 Oct 15;56(20):4620-4.
471. Huh K, Zhou X, Hayakawa H, Cho JY, Libermann TA, Jin J, et al. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol.* 2007 Sep;81(18):9737-47.
472. Hwang SG, Lee D, Kim J, Seo T, Choe J. Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J Biol Chem.* 2002 Jan 25;277(4):2923-30.
473. Brehm A, Miska E, Reid J, Bannister A, Kouzarides T. The cell cycle-regulating transcription factors E2F-RB. *Br J Cancer.* 1999 Jul;80 Suppl 1:38-41.
474. Longworth MS, Wilson R, Laimins LA. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J.* 2005 May 18;24(10):1821-30.
475. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997 Aug 15;11(16):2090-100.

476. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*. 1996 Dec 5;13(11):2323-30.
477. Wang YW, Chang HS, Lin CH, Yu WC. HPV-18 E7 conjugates to c-Myc and mediates its transcriptional activity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(2):402-12.
478. McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res*. 2009 Aug;143(2):195-208.
479. Bernat A, Avvakumov N, Mymryk JS, Banks L. Interaction between the HPV E7 oncoprotein and the transcriptional coactivator p300. *Oncogene*. 2003 Sep 11;22(39):7871-81.
480. Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16Ink4. *Cancer Res*. 1994 Nov 15;54(22):5816-20.
481. Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 29;97(18):10002-7.
482. Nguyen CL, Eichwald C, Nibert ML, Munger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component gamma-tubulin. *J Virol*. 2007 Dec;81(24):13533-43.
483. Nguyen CL, Munger K. Human papillomavirus E7 protein deregulates mitosis via an association with nuclear mitotic apparatus protein 1. *J Virol*. 2009 Feb;83(4):1700-7.
484. Fischer M, Quaas M, Wintsche A, Muller GA, Engeland K. Polo-like kinase 4 transcription is activated via CRE and NRF1 elements, repressed by DREAM through CDE/CHR sites and deregulated by HPV E7 protein. *Nucleic Acids Res*. 2013 Sep 25.
485. Duensing S, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res*. 2002 Dec 1;62(23):7075-82.
486. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010 Aug;10(8):550-60.
487. Fan X, Liu Y, Heilman SA, Chen JJ. Human papillomavirus E7 induces rereplication in response to DNA damage. *J Virol*. 2013 Jan;87(2):1200-10.
488. Spardy N, Covella K, Cha E, Hoskins EE, Wells SI, Duensing A, et al. Human papillomavirus 16 E7 oncoprotein attenuates DNA damage checkpoint control by increasing the proteolytic turnover of claspin. *Cancer Res*. 2009 Sep 1;69(17):7022-9.
489. Liu X, Roberts J, Dakic A, Zhang Y, Schlegel R. HPV E7 contributes to the telomerase activity of immortalized and tumorigenic cells and augments E6-induced hTERT promoter function. *Virology*. 2008 Jun 5;375(2):611-23.
490. Miller J, Dakic A, Chen R, Palechor-Ceron N, Dai Y, Kallakury B, et al. HPV16 E7 protein and hTERT proteins defective for telomere maintenance cooperate to immortalize human keratinocytes. *PLoS Pathog*. 2013 Apr;9(4):e1003284.
491. Barnard P, McMillan NA. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology*. 1999 Jul 5;259(2):305-13.
492. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem*. 2000 Mar 10;275(10):6764-9.
493. Li H, Zhan T, Li C, Liu M, Wang QK. Repression of MHC class I transcription by HPV16E7 through interaction with a putative RXRbeta motif and NF-kappaB cytoplasmic sequestration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 16;388(2):383-8.
494. Rodolico V, Arancio W, Amato MC, Aragona F, Cappello F, Di Fede O, et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha expression is increased in infected positive HPV16 DNA oral squamous cell carcinoma and positively associated with HPV16 E7 oncoprotein. *Infect Agent Cancer*. 2011;6(1):18.
495. Nakamura M, Bodily JM, Beglin M, Kyo S, Inoue M, Laimins LA. Hypoxia-specific stabilization of HIF-1alpha by human papillomaviruses. *Virology*. 2009 May 10;387(2):442-8.
496. Bodily JM, Mehta KP, Laimins LA. Human papillomavirus E7 enhances hypoxia-inducible factor 1-mediated transcription by inhibiting binding of histone deacetylases. *Cancer Res*. 2011 Feb 1;71(3):1187-95.
497. Tang X, Zhang Q, Nishitani J, Brown J, Shi S, Le AD. Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 alpha protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 2007 May 1;13(9):2568-76.

498. Walker J, Smiley LC, Ingram D, Roman A. Expression of human papillomavirus type 16 E7 is sufficient to significantly increase expression of angiogenic factors but is not sufficient to induce endothelial cell migration. *Virology*. 2011 Feb 20;410(2):283-90.
499. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci*. 2010 Feb;101(2):293-9.
500. Hellner K, Mar J, Fang F, Quackenbush J, Munger K. HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. *Virology*. 2009 Aug 15;391(1):57-63.
501. Rey O, Lee S, Park NH. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein represses transcription of human fibronectin. *J Virol*. 2000 May;74(10):4912-8.
502. Smola-Hess S, Pahne J, Mauch C, Zigrino P, Smola H, Pfister HJ. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in papillomavirus-positive cells: role of the human papillomavirus (HPV) 16 and HPV8 E7 gene products. *J Gen Virol*. 2005 May;86(Pt 5):1291-6.
503. Huh KW, DeMasi J, Ogawa H, Nakatani Y, Howley PM, Munger K. Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 9;102(32):11492-7.
504. DeMasi J, Chao MC, Kumar AS, Howley PM. Bovine papillomavirus E7 oncoprotein inhibits anoikis. *J Virol*. 2007 Sep;81(17):9419-25.
505. Zwerschke W, Mannhardt B, Massimi P, Nauenburg S, Pim D, Nickel W, et al. Allosteric activation of acid alpha-glucosidase by the human papillomavirus E7 protein. *J Biol Chem*. 2000 Mar 31;275(13):9534-41.
506. Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Durr P, Eigenbrodt E. Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex. *Biochem J*. 2001 May 15;356(Pt 1):247-56.
507. Zwerschke W, Mazurek S, Massimi P, Banks L, Eigenbrodt E, Jansen-Durr P. Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Feb 16;96(4):1291-6.
508. Zhou X, Munger K. Expression of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces an autophagy-related process and sensitizes normal human keratinocytes to cell death in response to growth factor deprivation. *Virology*. 2009 Mar 1;385(1):192-7.
509. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*. 2005 Oct;115(10):2679-88.
510. Tomaic V, Pim D, Banks L. The stability of the human papillomavirus E6 oncoprotein is E6AP dependent. *Virology*. 2009 Oct 10;393(1):7-10.
511. Vos RM, Altmutter J, White EA, Howley PM. The ubiquitin-specific peptidase USP15 regulates human papillomavirus type 16 E6 protein stability. *J Virol*. 2009 Sep;83(17):8885-92.
512. Kehmeier E, Ruhl H, Volland B, Stoppler MC, Androphy E, Stoppler H. Cellular steady-state levels of "high risk" but not "low risk" human papillomavirus (HPV) E6 proteins are increased by inhibition of proteasome-dependent degradation independent of their p53- and E6AP-binding capabilities. *Virology*. 2002 Jul 20;299(1):72-87.
513. Masson M, Hindelang C, Sibling AP, Schwalbach G, Trave G, Weiss E. Preferential nuclear localization of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein in cervical carcinoma cells. *J Gen Virol*. 2003 Aug;84(Pt 8):2099-104.
514. Chen JJ, Hong Y, Rustamzadeh E, Baleja JD, Androphy EJ. Identification of an alpha helical motif sufficient for association with papillomavirus E6. *J Biol Chem*. 1998 May 29;273(22):13537-44.
515. Zanier K, Charbonnier S, Sidi AO, McEwen AG, Ferrario MG, Poussin-Courmontagne P, et al. Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins. *Science*. 2013 Feb 8;339(6120):694-8.
516. Thomas M, Narayan N, Pim D, Tomaic V, Massimi P, Nagasaka K, et al. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene*. 2008 Nov 24;27(55):7018-30.
517. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J*. 1991 Dec;10(13):4129-35.
518. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993 Nov 5;75(3):495-505.
519. Bernard X, Robinson P, Nomine Y, Masson M, Charbonnier S, Ramirez-Ramos JR, et al. Proteasomal degradation of p53 by human papillomavirus E6 oncoprotein relies on the structural integrity of p53 core domain. *PLoS One*. 2011;6(10):e25981.

520. Crook T, Tidy JA, Vousden KH. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell*. 1991 Nov 1;67(3):547-56.
521. Li X, Coffino P. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol*. 1996 Jul;70(7):4509-16.
522. Shamanin VA, Androphy EJ. Immortalization of human mammary epithelial cells is associated with inactivation of the p14ARF-p53 pathway. *Mol Cell Biol*. 2004 Mar;24(5):2144-52.
523. Mantovani F, Banks L. Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical tumour derived cell lines. *Oncogene*. 1999 Jun 3;18(22):3309-15.
524. Lechner MS, Laimins LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol*. 1994 Jul;68(7):4262-73.
525. Thomas M, Massimi P, Jenkins J, Banks L. HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene*. 1995 Jan 19;10(2):261-8.
526. Patel D, Huang SM, Baglia LA, McCance DJ. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J*. 1999 Sep 15;18(18):5061-72.
527. Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, O'Connor MJ. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol*. 1999 Aug;73(8):6209-19.
528. Kumar A, Zhao Y, Meng G, Zeng M, Srinivasan S, Delmolino LM, et al. Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol*. 2002 Aug;22(16):5801-12.
529. Jha S, Vande Pol S, Banerjee NS, Dutta AB, Chow LT, Dutta A. Destabilization of TIP60 by human papillomavirus E6 results in attenuation of TIP60-dependent transcriptional regulation and apoptotic pathway. *Mol Cell*. 2010 Jun 11;38(5):700-11.
530. Spangle JM, Munger K. The HPV16 E6 oncoprotein causes prolonged receptor protein tyrosine kinase signaling and enhances internalization of phosphorylated receptor species. *PLoS Pathog*. 2013 Mar;9(3):e1003237.
531. Singh L, Gao Q, Kumar A, Gotoh T, Wazer DE, Band H, et al. The high-risk human papillomavirus type 16 E6 counters the GAP function of E6TP1 toward small Rap G proteins. *J Virol*. 2003 Jan;77(2):1614-20.
532. Lu Z, Hu X, Li Y, Zheng L, Zhou Y, Jiang H, et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferes with insulin signaling pathway by binding to tuberin. *J Biol Chem*. 2004 Aug 20;279(34):35664-70.
533. Degenhardt YY, Silverstein SJ. Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins. *J Virol*. 2001 Jan;75(1):151-60.
534. Accardi R, Rubino R, Scalise M, Gheit T, Shahzad N, Thomas M, et al. E6 and E7 from human papillomavirus type 16 cooperate to target the PDZ protein Na/H exchange regulatory factor 1. *J Virol*. 2011 Aug;85(16):8208-16.
535. Wang S, Pang T, Gao M, Kang H, Ding W, Sun X, et al. HPV E6 induces eIF4E transcription to promote the proliferation and migration of cervical cancer. *FEBS Lett*. 2013 Mar 18;587(6):690-7.
536. Spangle JM, Ghosh-Choudhury N, Munger K. Activation of cap-dependent translation by mucosal human papillomavirus E6 proteins is dependent on the integrity of the LXXLL binding motif. *J Virol*. 2012 Jul;86(14):7466-72.
537. Jia Y, Polunovsky V, Bitterman PB, Wagner CR. Cap-dependent translation initiation factor eIF4E: an emerging anticancer drug target. *Med Res Rev*. 2012 Jul;32(4):786-814.
538. Passalaris TM, Benanti JA, Gewin L, Kiyono T, Galloway DA. The G(2) checkpoint is maintained by redundant pathways. *Mol Cell Biol*. 1999 Sep;19(9):5872-81.
539. Kuhne C, Banks L. E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *J Biol Chem*. 1998 Dec 18;273(51):34302-9.
540. Srivenugopal KS, Ali-Osman F. The DNA repair protein, O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is a proteolytic target for the E6 human papillomavirus oncoprotein. *Oncogene*. 2002 Aug 29;21(38):5940-5.
541. Iftner T, Elbel M, Schopp B, Hiller T, Loizou JI, Caldecott KW, et al. Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *EMBO J*. 2002 Sep 2;21(17):4741-8.
542. McMurray HR, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J Virol*. 2003 Sep;77(18):9852-61.
543. Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev*. 2004 Sep 15;18(18):2269-82.

544. James MA, Lee JH, Klingelhutz AJ. HPV16-E6 associated hTERT promoter acetylation is E6AP dependent, increased in later passage cells and enhanced by loss of p300. *Int J Cancer*. 2006 Oct 15;119(8):1878-85.
545. Liu X, Dakic A, Chen R, Disbrow GL, Zhang Y, Dai Y, et al. Cell-restricted immortalization by human papillomavirus correlates with telomerase activation and engagement of the hTERT promoter by Myc. *J Virol*. 2008 Dec;82(23):11568-76.
546. Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol*. 2001 Jun;75(12):5559-66.
547. Katzenellenbogen RA, Vliet-Gregg P, Xu M, Galloway DA. Cytoplasmic poly(A) binding proteins regulate telomerase activity and cell growth in human papillomavirus type 16 E6-expressing keratinocytes. *J Virol*. 2010 Dec;84(24):12934-44.
548. Liu X, Dakic A, Zhang Y, Dai Y, Chen R, Schlegel R. HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 3;106(44):18780-5.
549. Beglin M, Melar-New M, Laimins L. Human papillomaviruses and the interferon response. *J Interferon Cytokine Res*. 2009 Sep;29(9):629-35.
550. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*. 1998 Jul 1;12(13):2061-72.
551. Hebnner C, Beglin M, Laimins LA. Human papillomavirus E6 proteins mediate resistance to interferon-induced growth arrest through inhibition of p53 acetylation. *J Virol*. 2007 Dec;81(23):12740-7.
552. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci*. 2007 Oct;98(10):1505-11.
553. Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene*. 1998 Dec 10;17(23):2943-54.
554. Leverrier S, Bergamaschi D, Ghali L, Ola A, Warnes G, Akgul B, et al. Role of HPV E6 proteins in preventing UVB-induced release of pro-apoptotic factors from the mitochondria. *Apoptosis*. 2007 Mar;12(3):549-60.
555. Du J, Chen GG, Vlantis AC, Chan PK, Tsang RK, van Hasselt CA. Resistance to apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression. *Cancer Lett*. 2004 Mar 8;205(1):81-8.
556. Pan H, Griep AE. Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev*. 1995 Sep 1;9(17):2157-69.
557. Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2002 Jun 14;277(24):21730-9.
558. Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem*. 2004 Jun 11;279(24):25729-44.
559. Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ*. 2006 Nov;13(11):1915-26.
560. Yuan H, Fu F, Zhuo J, Wang W, Nishitani J, An DS, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. *Oncogene*. 2005 Jul 28;24(32):5069-78.
561. Borbely AA, Murvai M, Konya J, Beck Z, Gergely L, Li F, et al. Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J Gen Virol*. 2006 Feb;87(Pt 2):287-94.
562. James MA, Lee JH, Klingelhutz AJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *J Virol*. 2006 Jun;80(11):5301-7.
563. Lopez-Ocejo O, Vilorio-Petit A, Bequet-Romero M, Mukhopadhyay D, Rak J, Kerbel RS. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene*. 2000 Sep 21;19(40):4611-20.
564. Clere N, Bermont L, Fauconnet S, Lascombe I, Saunier M, Vettoretti L, et al. The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces Vascular Endothelial Growth Factor 121 (VEGF121) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. *Exp Cell Res*. 2007 Sep 10;313(15):3239-50.
565. Ben Khalifa Y, Teissier S, Tan MK, Phan QT, Daynac M, Wong WQ, et al. The human papillomavirus E6 oncogene represses a cell adhesion pathway and disrupts focal adhesion through degradation of TAp63beta upon transformation. *PLoS Pathog*. 2011 Sep;7(9):e1002256.
566. Tong X, Howley PM. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 29;94(9):4412-7.
567. Degenhardt YY, Silverstein S. Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the e6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation. *J Virol*. 2001 Dec;75(23):11791-802.

568. Du M, Fan X, Hong E, Chen JJ. Interaction of oncogenic papillomavirus E6 proteins with fibulin-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Aug 30;296(4):962-9.
569. McCormack SJ, Brazinski SE, Moore JL, Jr., Werness BA, Goldstein DJ. Activation of the focal adhesion kinase signal transduction pathway in cervical carcinoma cell lines and human genital epithelial cells immortalized with human papillomavirus type 18. *Oncogene*. 1997 Jul 17;15(3):265-74.
570. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*. 2009 Feb 20;384(2):324-34.
571. Nguyen ML, Nguyen MM, Lee D, Griep AE, Lambert PF. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J Virol*. 2003 Jun;77(12):6957-64.
572. Duffy CL, Phillips SL, Klingelhutz AJ. Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology*. 2003 Sep 15;314(1):196-205.
573. D'Costa ZJ, Jolly C, Androphy EJ, Mercer A, Matthews CM, Hibma MH. Transcriptional repression of E-cadherin by human papillomavirus type 16 E6. *PLoS One*. 2012;7(11):e48954.
574. Gilles C, Polette M, Piette J, Birembaut P, Foidart JM. Epithelial-to-mesenchymal transition in HPV-33-transfected cervical keratinocytes is associated with increased invasiveness and expression of gelatinase A. *Int J Cancer*. 1994 Dec 1;59(5):661-6.
575. Watson RA, Thomas M, Banks L, Roberts S. Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes. *J Cell Sci*. 2003 Dec 15;116(Pt 24):4925-34.
576. Au Yeung CL, Tsang TY, Yau PL, Kwok TT. Human papillomavirus type 16 E6 induces cervical cancer cell migration through the p53/microRNA-23b/urokinase-type plasminogen activator pathway. *Oncogene*. 2011 May 26;30(21):2401-10.
577. Cardeal LB, Boccardo E, Termini L, Rabachini T, Andreoli MA, di Loreto C, et al. HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. *PLoS One*. 2012;7(3):e33585.
578. Leon-Gonzalez AJ, Acero N, Munoz-Mingarro D, Navarro I, Martin-Cordero C. Chalcones as Promising Lead Compounds on Cancer Therapy. *Curr Med Chem*. 2015 Jul 29.
579. Yamamoto S, Aizu E, Jiang H, Nakadate T, Kiyoto I, Wang JC, et al. The potent anti-tumor-promoting agent isoliquiritigenin. *Carcinogenesis*. 1991 Feb;12(2):317-23.
580. Peng F, Du Q, Peng C, Wang N, Tang H, Xie X, et al. A Review: The Pharmacology of Isoliquiritigenin. *Phytother Res*. 2015 Jul;29(7):969-77.
581. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 10;26(35):5802-12.
582. Zagouri F, Sergentanis TN, Chrysikos D, Filipits M, Bartsch R. Molecularly targeted therapies in cervical cancer. A systematic review. *Gynecol Oncol*. 2012 Aug;126(2):291-303.
583. Clere N, Faure S, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Anticancer properties of flavonoids: roles in various stages of carcinogenesis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2011 Apr 1;9(2):62-77.
584. Wang YC, Yang YS. Simultaneous quantification of flavonoids and triterpenoids in licorice using HPLC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 May 1;850(1-2):392-9.
585. Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytother Res*. 2008 Jun;22(6):709-24.
586. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 1999 Dec 13;18(53):7621-36.
587. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992 Mar 19;356(6366):215-21.
588. Oren M, Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Feb;2(2):a001107.
589. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):307-10.
590. Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res*. 1999 Apr 1;59(7):1391-9.
591. Meek DW. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem J*. 2015 Aug 1;469(3):325-46.
592. Goodwin EC, Yang E, Lee CJ, Lee HW, DiMaio D, Hwang ES. Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 26;97(20):10978-83.

593. Geiger T, Geiger B. Towards elucidation of functional molecular signatures of the adhesive-migratory phenotype of malignant cells. *Semin Cancer Biol.* 2010 Jun;20(3):146-52.
594. Wang KL, Hsia SM, Chan CJ, Chang FY, Huang CY, Bau DT, et al. Inhibitory effects of isoliquiritigenin on the migration and invasion of human breast cancer cells. *Expert Opin Ther Targets.* 2013 Apr;17(4):337-49.
595. Zheng H, Li Y, Wang Y, Zhao H, Zhang J, Chai H, et al. Downregulation of COX-2 and CYP 4A signaling by isoliquiritigenin inhibits human breast cancer metastasis through preventing anoikis resistance, migration and invasion. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014 Oct 1;280(1):10-20.
596. Yamazaki S, Morita T, Endo H, Hamamoto T, Baba M, Joichi Y, et al. Isoliquiritigenin suppresses pulmonary metastasis of mouse renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2002 Sep 8;183(1):23-30.
597. Kwon GT, Cho HJ, Chung WY, Park KK, Moon A, Park JH. Isoliquiritigenin inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased JNK/AP-1 signaling. *J Nutr Biochem.* 2009 Sep;20(9):663-76.
598. Hulkower KI, Herber RL. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics.* 2011;3(1):107-24.
599. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem.* 1980 Feb;102(1):196-202.
600. Pernodet N, Hermetet F, Adami P, Vejux A, Descotes F, Borg C, et al. High expression of QSOX1 reduces tumorigenesis, and is associated with a better outcome for breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2012;14(5):R136.
601. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 2011 Jan;278(1):16-27.
602. Chen X, Wu Y, Jiang Y, Zhou Y, Wang Y, Yao Y, et al. Isoliquiritigenin inhibits the growth of multiple myeloma via blocking IL-6 signaling. *J Mol Med (Berl).* 2012 Nov;90(11):1311-9.
603. Li Y, Zhao H, Wang Y, Zheng H, Yu W, Chai H, et al. Isoliquiritigenin induces growth inhibition and apoptosis through downregulating arachidonic acid metabolic network and the deactivation of PI3K/Akt in human breast cancer. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013 Oct 1;272(1):37-48.
604. Zhang XY, Qiao H, Ni JM, Shi YB, Qiang Y. Preparation of isoliquiritigenin-loaded nanostructured lipid carrier and the in vivo evaluation in tumor-bearing mice. *Eur J Pharm Sci.* 2013 Jun 14;49(3):411-22.
605. Ivanov AI. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol.* 2008;440:15-33.
606. Wagner BJ, Lindau D, Ripper D, Stierhof YD, Glatzle J, Witte M, et al. Phagocytosis of dying tumor cells by human peritoneal mesothelial cells. *J Cell Sci.* 2011 May 15;124(Pt 10):1644-54.
607. Patel VA, Lee DJ, Feng L, Antoni A, Lieberthal W, Schwartz JH, et al. Recognition of apoptotic cells by epithelial cells: conserved versus tissue-specific signaling responses. *J Biol Chem.* 2010 Jan 15;285(3):1829-40.
608. Florey O, Overholtzer M. Autophagy proteins in macroendocytic engulfment. *Trends Cell Biol.* 2012 Jul;22(7):374-80.
609. Isacson C, Kesis TD, Hedrick L, Cho KR. Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type. *Cancer Res.* 1996 Feb 15;56(4):669-74.
610. Tsang RW, Fyles AW, Li Y, Rajaraman MM, Chapman W, Pintilie M, et al. Tumor proliferation and apoptosis in human uterine cervix carcinoma I: correlations between variables. *Radiother Oncol.* 1999 Jan;50(1):85-92.
611. Tsang RW, Wong CS, Fyles AW, Levin W, Manchul LA, Milosevic M, et al. Tumour proliferation and apoptosis in human uterine cervix carcinoma II: correlations with clinical outcome. *Radiother Oncol.* 1999 Jan;50(1):93-101.
612. Colburn NH, Bruegge WF, Bates JR, Gray RH, Rossen JD, Kelsey WH, et al. Correlation of anchorage-independent growth with tumorigenicity of chemically transformed mouse epidermal cells. *Cancer Res.* 1978 Mar;38(3):624-34.
613. Borowicz S, Van Scoyk M, Avsarala S, Karuppusamy Rathinam MK, Tauler J, Bikkavilli RK, et al. The soft agar colony formation assay. *J Vis Exp.* 2014(92):e51998.
614. Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Anker P, Herrera-Goepfert R, Medina-Velazquez LA, et al. Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model. *PLoS One.* 2012;7(12):e52754.
615. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
616. Schiller JT, Castellsague X, Garland SM. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. *Vaccine.* 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F123-38.

617. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*. 2015 Mar 14;385(9972):977-1010.
618. Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer*. 2002 Feb;2(2):143-8.
619. Deorukhkar A, Krishnan S, Sethi G, Aggarwal BB. Back to basics: how natural products can provide the basis for new therapeutics. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007 Nov;16(11):1753-73.
620. Di Domenico F, Foppoli C, Coccia R, Perluigi M. Antioxidants in cervical cancer: chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochim Biophys Acta*. 2012 May;1822(5):737-47.
621. Garland SM. Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. *Pathology*. 2002 Jun;34(3):213-24.
622. Pretet JL, Jacquard AC, Saunier M, Clavel C, Dachez R, Gondry J, et al. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade squamous intraepithelial lesions in France and comparison with CIN2/3 and invasive cervical cancer: the EDiTH III study. *Gynecol Oncol*. 2008 Aug;110(2):179-84.
623. Li F, Awale S, Tezuka Y, Kadota S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorg Med Chem*. 2008 May 15;16(10):5434-40.
624. Hsu YL, Chia CC, Chen PJ, Huang SE, Huang SC, Kuo PL. Shallot and licorice constituent isoliquiritigenin arrests cell cycle progression and induces apoptosis through the induction of ATM/p53 and initiation of the mitochondrial system in human cervical carcinoma HeLa cells. *Mol Nutr Food Res*. 2009 Jul;53(7):826-35.
625. Yuan X, Zhang B, Chen N, Chen XY, Liu LL, Zheng QS, et al. Isoliquiritigenin treatment induces apoptosis by increasing intracellular ROS levels in HeLa cells. *J Asian Nat Prod Res*. 2012;14(8):789-98.
626. Hsu YL, Kuo PL, Chiang LC, Lin CC. Isoliquiritigenin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004 Jul;31(7):414-8.
627. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*. 1994 Mar 1;54(5):1169-74.
628. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. 1998 Nov 20;282(5393):1497-501.
629. Yuan X, Zhang B, Gan L, Wang ZH, Yu BC, Liu LL, et al. Involvement of the mitochondrion-dependent and the endoplasmic reticulum stress-signaling pathways in isoliquiritigenin-induced apoptosis of HeLa cell. *Biomed Environ Sci*. 2013 Apr;26(4):268-76.
630. Park I, Park KK, Park JH, Chung WY. Isoliquiritigenin induces G2 and M phase arrest by inducing DNA damage and by inhibiting the metaphase/anaphase transition. *Cancer Lett*. 2009 May 18;277(2):174-81.
631. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem*. 2002 Feb 1;277(5):3247-57.
632. Hemann MT, Lowe SW. The p53-Bcl-2 connection. *Cell Death Differ*. 2006 Aug;13(8):1256-9.
633. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med*. 2010 Feb;9(45):145-52.
634. Wolff S, Erster S, Palacios G, Moll UM. p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. *Cell Res*. 2008 Jul;18(7):733-44.
635. Green DR, Amarante-Mendes GP. The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death. *Results Probl Cell Differ*. 1998;24:45-61.
636. Hsu YL, Kuo PL, Lin CC. Isoliquiritigenin induces apoptosis and cell cycle arrest through p53-dependent pathway in Hep G2 cells. *Life Sci*. 2005 Jun 3;77(3):279-92.
637. Hsu YL, Kuo PL, Lin LT, Lin CC. Isoliquiritigenin inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human hepatoma cells. *Planta Med*. 2005 Feb;71(2):130-4.
638. Chowdhury SA, Kishino K, Satoh R, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, et al. Tumor-specificity and apoptosis-inducing activity of stilbenes and flavonoids. *Anticancer Res*. 2005 May-Jun;25(3B):2055-63.
639. Jung JI, Lim SS, Choi HJ, Cho HJ, Shin HK, Kim EJ, et al. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem*. 2006 Oct;17(10):689-96.
640. Zorko BA, Perez LB, De Blanco EJ. Effects of ILTG on DAPK1 promoter methylation in colon and leukemia cancer cell lines. *Anticancer Res*. 2010 Oct;30(10):3945-50.

641. Wang N, Wang Z, Wang Y, Xie X, Shen J, Peng C, et al. Dietary compound isoliquiritigenin prevents mammary carcinogenesis by inhibiting breast cancer stem cells through WIF1 demethylation. *Oncotarget*. 2015 Apr 30;6(12):9854-76.
642. Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology*. 2009 Feb 20;384(2):375-9.
643. Ii T, Satomi Y, Katoh D, Shimada J, Baba M, Okuyama T, et al. Induction of cell cycle arrest and p21(CIP1/WAF1) expression in human lung cancer cells by isoliquiritigenin. *Cancer Lett*. 2004 Apr 15;207(1):27-35.
644. Russo T, Zambrano N, Esposito F, Ammendola R, Cimino F, Fiscella M, et al. A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. *J Biol Chem*. 1995 Dec 8;270(49):29386-91.
645. Iwashita K, Kobori M, Yamaki K, Tsushida T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000 Sep;64(9):1813-20.
646. Yuan X, Yu B, Wang Y, Jiang J, Liu L, Zhao H, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in isoliquiritigenin-induced SKOV-3 cell apoptosis. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2013 May;8(2):191-9.
647. Gregory CD, Devitt A. The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? *Immunology*. 2004 Sep;113(1):1-14.
648. Parsonage G, Filer AD, Haworth O, Nash GB, Rainger GE, Salmon M, et al. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol*. 2005 Mar;26(3):150-6.
649. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 May;3(5):349-63.
650. Chiarugi P. Cancer-associated fibroblasts and macrophages: Friendly conspirators for malignancy. *Oncoimmunology*. 2013 Sep 1;2(9):e25563.
651. Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts. *J Wound Care*. 2013 Aug;22(8):407-8, 10-12.
652. Cocco RE, Ucker DS. Distinct modes of macrophage recognition for apoptotic and necrotic cells are not specified exclusively by phosphatidylserine exposure. *Mol Biol Cell*. 2001 Apr;12(4):919-30.
653. Dutta D, Donaldson JG. Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cell Logist*. 2012 Oct 1;2(4):203-8.
654. Shen Q, He B, Lu N, Conradt B, Grant BD, Zhou Z. Phagocytic receptor signaling regulates clathrin and epsin-mediated cytoskeletal remodeling during apoptotic cell engulfment in *C. elegans*. *Development*. 2013 Aug;140(15):3230-43.
655. Devitt A, Pierce S, Oldreive C, Shingler WH, Gregory CD. CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: the role of phosphatidylserine. *Cell Death Differ*. 2003 Mar;10(3):371-82.
656. Segawa K, Suzuki J, Nagata S. Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 29;108(48):19246-51.
657. Dransfield I, Zagorska A, Lew ED, Michail K, Lemke G. Mer receptor tyrosine kinase mediates both tethering and phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1646.
658. Borisenko GG, Iverson SL, Ahlberg S, Kagan VE, Fadeel B. Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8) binds to oxidized phosphatidylserine: implications for macrophage clearance of apoptotic cells. *Cell Death Differ*. 2004 Aug;11(8):943-5.
659. Fairn GD, Grinstein S. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol*. 2012 Aug;33(8):397-405.
660. DiPaolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V, Doniger J. Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. *Oncogene*. 1989 Apr;4(4):395-9.
661. Slagle BL, Kaufman RH, Reeves WC, Icenogle JP. Expression of ras, c-myc, and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer*. 1998 Oct 1;83(7):1401-8.
662. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*. 2004 Jun 1;64(11):3878-84.
663. Garcia-Olmo DC, Dominguez C, Garcia-Arranz M, Anker P, Stroun M, Garcia-Verdugo JM, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res*. 2010 Jan 15;70(2):560-7.
664. Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*. 2010 May 1;316(8):1324-31.

665. Yang W, Han W, Ye S, Liu D, Wu J, Liu H, et al. Fibroblast activation protein- α promotes ovarian cancer cell proliferation and invasion via extracellular and intracellular signaling mechanisms. *Exp Mol Pathol*. 2013 Aug;95(1):105-10.
666. Goubran HA, Kotb RR, Stakiw J, Emara ME, Burnouf T. Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment. *Cancer Growth Metastasis*. 2014;7:9-18.
667. Bhome R, Bullock MD, Al Saihati HA, Goh RW, Primrose JN, Sayan AE, et al. A top-down view of the tumor microenvironment: structure, cells and signaling. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:33.
668. Hu M, Yao J, Cai L, Bachman KE, van den Brule F, Velculescu V, et al. Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet*. 2005 Aug;37(8):899-905.
669. Moinfar F, Man YG, Arnould L, Bratthauer GL, Ratschek M, Tavassoli FA. Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer Res*. 2000 May 1;60(9):2562-6.
670. Tuhkanen H, Anttila M, Kosma VM, Yla-Herttua S, Heinonen S, Kuronen A, et al. Genetic alterations in the peritumoral stromal cells of malignant and borderline epithelial ovarian tumors as indicated by allelic imbalance on chromosome 3p. *Int J Cancer*. 2004 Mar 20;109(2):247-52.
671. Paterson RF, Ulbright TM, MacLennan GT, Zhang S, Pan CX, Sweeney CJ, et al. Molecular genetic alterations in the laser-capture-microdissected stroma adjacent to bladder carcinoma. *Cancer*. 2003 Nov 1;98(9):1830-6.
672. Wernert N, Locherbach C, Wellmann A, Behrens P, Hugel A. Presence of genetic alterations in microdissected stroma of human colon and breast cancers. *Anticancer Res*. 2001 Jul-Aug;21(4A):2259-64.
673. Sommers GM, Grigsby PW, Perez CA, Camel HM, Kao MS, Galakatos AE, et al. Outcome of recurrent cervical carcinoma following definitive irradiation. *Gynecol Oncol*. 1989 Nov;35(2):150-5.
674. Elit L, Fyles AW, Devries MC, Oliver TK, Fung-Kee-Fung M. Follow-up for women after treatment for cervical cancer: a systematic review. *Gynecol Oncol*. 2009 Sep;114(3):528-35.
675. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):485-95.
676. Naresh KN, Lakshminarayanan K, Pai SA, Borges AM. Apoptosis index is a predictor of metastatic phenotype in patients with early stage squamous carcinoma of the tongue: a hypothesis to support this paradoxical association. *Cancer*. 2001 Feb 1;91(3):578-84.
677. Leoncini L, Del Vecchio MT, Megha T, Barbini P, Galieni P, Pileri S, et al. Correlations between apoptotic and proliferative indices in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol*. 1993 Mar;142(3):755-63.
678. Levine EL, Renehan A, Gossiel R, Davidson SE, Roberts SA, Chadwick C, et al. Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother Oncol*. 1995 Oct;37(1):1-9.

Annexes

1. Publication 3

High expression of QSOX1 reduces tumorigenesis, and is associated with a better outcome for breast cancer patients

Pernodet N, Hermetet E, Adami P, Vejux A, Descotes F, Borg C, Adams M, Pallandre JR, Viennet G, Esnard F, Jouvenot M and Despouy G

Breast Cancer Research 2012, **14**:R136

RESEARCH ARTICLE

Open Access

High expression of QSOX1 reduces tumorigenesis, and is associated with a better outcome for breast cancer patients

Nicolas Pernodet¹, François Hermetet¹, Pascale Adami¹, Anne Vejux^{1,2}, Françoise Descotes³, Christophe Borg⁴, Marjorie Adams³, Jean-René Pallandre⁴, Gabriel Viennet¹, Frédéric Esnard⁵, Michèle Jouvenot¹ and Gilles Despouy^{1*}

Abstract

Introduction: The gene quiescin/sulfhydryl oxidase 1, *QSOX1*, encodes an enzyme directed to the secretory pathway and excreted into the extracellular space. *QSOX1* participates in the folding and stability of proteins and thus could regulate the biological activity of its substrates in the secretory pathway and/or outside the cell. The involvement of *QSOX1* in oncogenesis has been studied primarily in terms of its differential expression in systemic studies. *QSOX1* is overexpressed in prostate cancers and in pancreatic adenocarcinoma. In contrast, *QSOX1* gene expression is repressed in endothelial tumors. In the present study, we investigated the role of *QSOX1* in breast cancer.

Methods: We analyzed *QSOX1* mRNA expression in a cohort of 217 invasive ductal carcinomas of the breast. Moreover, we investigated *QSOX1*'s potential role in regulating tumor growth and metastasis using cellular models in which we overexpressed or extinguished *QSOX1* and xenograft experiments.

Results: We showed that the *QSOX1* expression level is inversely correlated to the aggressiveness of breast tumors. Our results show that *QSOX1* leads to a decrease in cell proliferation, clonogenic capacities and promotes adhesion to the extracellular matrix. *QSOX1* also reduces the invasive potential of cells by reducing cell migration and decreases the activity of the matrix metalloproteinase, MMP-2, involved in these mechanisms. Moreover, *in vivo* experiments show that *QSOX1* drastically reduces the tumor development.

Conclusions: Together, these results suggest that *QSOX1* could be posited as a new biomarker of good prognosis in breast cancer and demonstrate that *QSOX1* inhibits human breast cancer tumorigenesis.

Introduction

The Quiescin Sulfhydryl Oxidase 1 (*QSOX1*) gene was identified by our group in primary culture of guinea pig endometrial glandular epithelial cells [1]. The human gene is located on chromosome 1 (1q24) and encodes two major isoforms by alternative RNA splicing: *QSOX1S* (66 kDa) and *QSOX1L* (82 kDa) [2]. The short transcript appears to be ubiquitous, whereas the expression of the longer form seems to be tissue specific [3]. The longer form of the *QSOX1* protein retains a potential transmembrane segment that could allow for

anchorage to the membrane. The *QSOX1* N-terminus contains a sequence targeting the nascent protein to the endoplasmic reticulum. Moreover, no signal for permanent retention in the endoplasmic reticulum (KDEL sequence) was identified, suggesting an extracellular destination [4]. In addition, *QSOX1* proteins have been detected in the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus and the secretion vesicles [5]. These proteins can also be found in culture supernatant and in extracellular spaces, confirming that they are secreted [1].

QSOX1 is the product of an ancient fusion between thioredoxin domains and Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) -binding module, ERV/ALR. A first CXXC motif is located in N-terminus and can act as a reducer or an oxidant. The other CXXC motif is located in a FAD

* Correspondence: gilles.despouy@univ-fcomte.fr

¹Université de Franche-Comté, EA3922 « Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central », IFR133, U.F.R. Sciences et Techniques, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France
Full list of author information is available at the end of the article

domain within C-terminus [6]. The QSOX1 protein belongs to a family of FAD sulfhydryl oxidases and catalyzes the oxidation of thiols to disulfides. *In vitro*, enzymatic studies on avian QSOX1 have demonstrated that this enzyme is able to both catalyze disulfide bridges of a large array of monothiol substrates (such as glutathione) and reduce proteins and peptides [7,8]. Moreover, it seems that QSOX1 is not a disulfide isomerase but instead assists the Protein Disulfide Isomerase (PDI) by establishing disulfide links in mature proteins [9,10].

Previous reports showed that serum depletion-induced quiescence, as well as cell contact inhibition, led to a QSOX1 mRNA accumulation in guinea pig endometrial glandular epithelial cells [1] and in human lung fibroblasts [3]. These experimental data suggest that QSOX1 could be involved in the negative control of the cell cycle. Furthermore, in our laboratory it was demonstrated that over-expression of guinea pig QSOX1-S in MCF-7 cells decreased the cellular proliferation and protected cells against oxidative stress [11]. It is now known that cellular damage due to an accumulation of Reactive Oxygen Species (ROS) leads to tumorigenesis [12,13]. By the reducing activity of its first CXXC motif, QSOX1 could prevent tumorigenesis by down-regulating ROS levels in cells.

Another study suggested that QSOX1 could take part in the cell anchorage mechanism. Indeed, increased mRNA levels have been detected in human lung fibroblast when cell/plate or cell/cell adhesion was disturbed by a mechanical or chemical action [14].

Several systemic studies have demonstrated an alteration of QSOX1 expression in cancer cell models. In fact, one study demonstrated the presence of peptide fragments of QSOX1 at highly significant rates in plasma from patients suffering from pancreatic cancer [15]. Moreover, very recently, it was reported that QSOX1 could promote invasion of pancreatic tumor cell lines by activating matrix metalloproteinase [16]. In another, a correlation was observed between the overexpression of QSOX1 and the initiation of prostate tumor growth [17]. On the other hand, QSOX1 expression is repressed by epigenetic regulation, especially by histone deacetylation in a cell model of endothelial tumors. Moreover, this down-regulation seems to be necessary for angiogenesis, an essential phenomenon for metastasis development [18]. These data suggest an involvement of QSOX1 in the mechanisms of carcinogenesis.

In the present study, QSOX1 mRNA expression was investigated in a retrospective cohort of 217 invasive ductal carcinomas (IDC) of the breast. The impact of the QSOX1 expression on characteristic phenotypes of breast cancer cells and tumor growth was subsequently determined.

Materials and methods

Clinical analysis

Patients and tumor characteristics (Table 1)

The study included a retrospective cohort of 217 patients with invasive ductal carcinomas of the breast. This cohort was derived from the population described previously [19]. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR) were assayed in cytosol using the radioligand reference method [20]. PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-1) was measured in Triton extract by the enzyme-linked immunoassay (PAI-1, Imubind #821, American Diagnostica, Stamford, CT, USA) as elsewhere described [21]. Studies involving human primary breast tumors were performed according to the principles embodied in the Declaration of Helsinki. Tissue biopsies were obtained as part of surgical treatments for the hormone receptor content determination. Remaining samples were included anonymously in this study. Ethical approval and consent were not required due to the routine nature of the procedure.

Reverse Transcriptase Quantitative PCR (RT-qPCR) analysis

Detailed information on RNA extraction and RTqPCR has been previously described [19]. The QSOX1 primers used were: forward, 5'-GGAAGCTT CTGGAAGTCGTG-3' and reverse, 5'-CAAAAGACCAGGCTCAGAGG-3' for amplification of a 211 bp fragment (GenBank NM_002826). The QSOX1 target concentration was expressed relative to the concentration of the GAPDH housekeeping gene [19].

Statistical analysis

The median follow-up at the time of analysis was 54 months (range: 2 to 109). Patients were followed up for metastasis relapse (nodal or distant metastasis and local recurrence were relapse). Analysis of the distribution of QSOX1 RNA expression in relation to usual prognostic parameters was performed using the Mann-Whitney or Kruskal Wallis test. Metastasis free survival probabilities were estimated using Kaplan Meier estimators and were compared using the log-rank test. These analyses were performed with the SPSS software version 17.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

Experimental analysis

Reagents and antibodies

Cell culture reagents were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Miscellaneous reagents were purchased from Sigma Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Specific inhibitor of matrix metalloproteinase (MMP)2 was purchased from Millipore (Molsheim, France). The following antibodies were used: for Western blotting, polyclonal anti-rat QSOX1 [4] diluted at 1:7,500, for immunohistochemistry, polyclonal anti-human QSOX1 (Proteintech Group, Inc., Chicago, IL, USA) diluted at 1:100, polyclonal anti-MMP-2 (Cell Signaling

Technology, Danvers, MA, USA) diluted at 1:2,000, polyclonal anti-actin (Sigma Aldrich) diluted at 1:5,000 and polyclonal anti-rabbit (P.A.R.I.S, Compiègne, France) diluted at 1:10,000.

Cell culture

Cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium) supplemented with 2 mM L-Glutamine, 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 5% fetal calf serum (FCS) and kept in a humidified 5% CO₂ water saturated atmosphere. Cell viability was estimated by counting Trypan blue excluding cells.

Plasmid construction, small-hairpinRNA (shRNA) experiments and transfection

The pcDNA3.1-QSOX1S plasmid was constructed by cloning the coding sequence of QSOX1-S splice variant 2 (AF361868) between the EcoRV and BamHI sites of pcDNATM3.1/Hygro⁽⁻⁾ (Invitrogen). MCF-7 cells were transfected with the pcDNA3.1 and the pcDNA3.1-QSOX1S expression plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Then, cells were selected with 200 µg/ml Hygromycin B (PAA, Les Mureaux, France).

shRNA vectors from the Mission human shRNA hQSOX1 clone sets (Sigma Aldrich) were used: shQSOX1-1 (TRCN0000064183), shQSOX1-2 (TRCN0000064185), and appropriate control vector: shC (SHGLYNM_001004128). Lipofectamine LTX (Invitrogen) was used to stably transfect MDA-MB 231 cells, according to the manufacturer's recommendations. Clones were selected with 1 µg/ml Puromycin (Sigma Aldrich).

QSOX1 mRNA detection and level analysis

Total RNAs were extracted as previously described [11]. RTqPCR was performed with the Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), using the SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Target (endogenous and plasmid encoded QSOX1 mRNA) and endogenous control (H3.3 like histone H3B-2 (*H3B-2*)) amplifications exhibited 100 ± 5% efficiency (R² >99% for the standard curve); *QSOX1* primer sequences were: hQSOXE+Ts1: 5'-GCCACCCTCAACTTCCT-CAAG-3', hQSOXE+Trev1: 5'-ACCCAGCTGCAGGG AAGTC-3'; *H3B-2* primer sequences were: HisI: 5'-GCT AGCTGGATGTCTTTTGG-3', HisN: 5'-GTGGTAAAG-CACCCAGGAA-3'). Each sample was analyzed in triplicate and then differences in the expression of each gene were quantified using the ΔΔCt approach using endogenous control.

Immunoblotting

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transfer of proteins onto PVDF membranes (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) were performed using standard protocols. The antibodies were used at the previously indicated dilution. Immunoreactive bands were detected using goat

horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary anti-rabbit antibodies (1:10,000 in antibody blocking buffer) and ECL Plus reagent (GE Healthcare Life Sciences, Saclay, France), according to the manufacturer's protocol.

Blots were stripped by incubation in stripping buffer (62.5 mM Tris, pH 6.7, 100 mM β-mercaptoethanol and 2% SDS) for 30 minutes at 50°C, blocked again in TBST buffer containing 5% non-fat milk and then probed a second time with polyclonal anti-actin.

Immunohistochemistry (IHC)

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks from patients whom underwent surgical resection for invasive ductal carcinoma and normal breast tissue were sectioned at 5 µm thickness using water flotation for tissue section transfer and dried overnight at room temperature. The slides were de-waxed, rehydrated and subjected to heat induced epitope retrieval using a proprietary citrate based retrieval solution for 40 minutes. Endogenous peroxidases were blocked. QSOX1 detection was performed as described in Antwi *et al.* [15]. QSOX1 location analysis was performed by Dr. Viennet, a board-certified pathologist.

Cell-Matrix Adhesion Assay

Cells were incubated at 37°C for 60 minutes at a density of 4 × 10⁵ cells/well in serum-free DMEM on non-coated well plates (three wells/cell line: one well to control the number of seeded cells and the two others for technical duplicates). After washing, adherent cells were collected and pelleted down. Then, cells were counted with Maltose cell. Results were expressed as the ratio between plate adhering cells and total seeded cells and reported as mean ± SD of triplicate determinations.

Colony formation assay

Cells were plated in six-well tissue culture plates at a density of 50 cells/cm². After 28 days, colonies were fixed with ethanol and stained with 2% crystal violet, washed with water to remove the excess dye, and imaged by a scanner. Quantitative changes in clonogenicity were determined by counting the colonies, using Bio-Rad *Vision-Capt* software.

Anchorage independent cell proliferation

Cells were seeded at a density of 6 × 10⁴ cells per 35-mm cell culture dish in 0.3% agar. After 28 days, the top agar cell layers were covered with culture medium containing 5% FCS. Images from four representative fields of each well were taken and analyzed.

Cell migration and invasion assay

For the migration assay, 10⁵ cells were suspended in 300 µL serum-free medium and added into the upper chamber of the Boyden modified chamberTM (SPL Life Sciences, Pocheon-si, Korea). For the invasion assay, 10⁵ cells in 200 µL serum-free medium, in the presence or absence of 10 µM of a MMP-2 specific inhibitor, *cis*-9-Octadecenoyl-N-hydroxylamide (OA-Hy) [22,23], were

added into the upper chamber. Five hours before cell seeding, 50 μ L of extra cellular matrix (ECM) gel (1 mg/ml) were added to the upper chamber. Thereafter, the cells were incubated 24 h for migration or invasion assay. The cells on the upper surface were removed using a cotton bud. The remaining invading cells were fixed, stained with 2% crystal violet and the images from four representative fields of view (FOV) of each membrane were taken. The invasive cells in the lower chamber were counted.

Zymography assay

The gelatinase activity of MMPs in the serum-free media was analyzed by gelatin-zymography. A total of 10^5 cells suspended in 250 μ l were plated onto a 24-well plate. The serum-free medium was collected after 12 h of incubation for MCF-7 cells and 24 h for MDA-MB-231 cells. HT-1080 conditioned media was used as positive control. The proteins from the conditioned media were 100-fold concentrated by acetone precipitation and solubilized in Laemmli Buffer (without β -mercaptoethanol). Then, proteins were separated by SDS PAGE electrophoresis using 10% (w/v) acrylamide gels containing 1% (w/v) gelatin at 20 mA. Gels were rinsed in Triton X-100 (2.5%, v/w) and incubated in 50 mM Tris-HCl, 150 mM CaCl₂ and 5 μ M ZnCl₂ (pH 8.0) at 37°C for 16 h. Gels were stained with 0.25% (w/v) Coomassie brilliant blue. Digested areas appeared clear on a blue background, indicating the location of active MMPs.

Xenograft experiments

CIEA NOG mice were obtained from Taconic (Germantown, NY, USA) and maintained in the UMR1098 animal facility (agreement number #C25-056-7). Approval for animal experimentation and care was received from the Services Vétérinaires de la Santé et de la Protection Animale delivered by the Ministère de l'Agriculture, Paris, France and experimental procedures were approved by a local ethic committee.

A total of 2×10^6 cells of different cell lines (MDA-MB-231 shC and MDA-MB-231 shQSOX1-1) resuspended in 100 μ L of PBS per mouse were inoculated subcutaneously in NOG mice ($n = 5$ per group) and tumor growth was monitored biweekly in each group. Tumor volume was calculated by the formula $V = \frac{1}{2} a \times b^2$, where a is the longest tumor axis and b is the shortest tumor axis. When tumors reached 1 cm in diameter, mice were sacrificed and each tumor was fixed in formol and photographed. During the sacrifice, photos have been taken in order to keep proof of where tumors developed.

Results

QSOX1 localization in normal and in breast cancer tissues

IHC experiments were performed on sections of normal mammary gland and invasive ductal carcinoma (IDC). Results in Figure 1 show a QSOX1 expression in human

normal breast tissue: QSOX1 is localized at the level of milk ducts and channels of the ductulo-lobular units (Figure 1A); the labelling is perinuclear and at the apex of the constituent cells of these histological structures (Figure 1B), suggesting a localization in different compartments of the secretory pathway. In the tissues from IDC, a diffuse cytoplasmic labelling of QSOX1 was observed in tumor cells (Figure 1C, D). In non-cancerous cells from IDC tissues section, QSOX1 labelling appeared as a punctate perinuclear and apical staining in the ductulo-lobular units (Figure 1E), as observed in normal mammary glands. A lack of labelling was noted in stromal cells and adipocytes, whether observing sections from normal or pathological tissue (Figure 1A, C).

QSOX1 mRNA expression in breast cancer

We investigated QSOX1 mRNA expression in a cohort of 217 invasive ductal carcinomas of the breast. The mean QSOX1 value measured by RTqPCR was 3.56 and the median was 2.84 (range: 0.25 to 19.89). Table 1 shows the median value of QSOX1 in relation to tumor characteristics that are usually linked to the prognosis. Indeed, the median QSOX1 expression value was significantly lower in the patients with pejorative prognostic factors: premenopausal status, SBR grade III, negative ER or PgR, and/or high PAI1 level (Figure 2A, Kruskal Wallis test, P -value <0.001).

The Kaplan Meier curves were constructed after segmentation into two groups on the basis of the QSOX1 expression cut-off equal to the upper threshold of the first tertile. This cut-off, that is, 2.11, allowed the discrimination between high and low QSOX1 status. It was observed that high values of QSOX1 expression were related to a good prognosis (Figure 2B, P -value = 0.007).

Expression of hQSOX1 in breast cancer cell lines

Coppock and coworkers have previously observed, by Northern blotting, that QSOX1 is expressed at a low level in MCF-7 and MDA-MB-453 cells and at a high rate in MDA-MB-231 breast cancer cell lines [3]. First, we analyzed expression of the *QSOX1* gene by RTqPCR in these cell lines. Our results indicate that the relative fold of QSOX1 expression in MDA-MB-231 and MCF-7 cells was 253.5 ± 1 (mean \pm SD) and 4.2 ± 0.5 , respectively compared to MDA-MB-453 cells (Figure 3A). These results were confirmed at the protein level. In fact, QSOX1S expression is very weak in MDA-MB-453 and MCF-7 cells and high in MDA-MB-231 cell lines (Figure 3B).

To investigate the function of hQSOX1S in the breast cancer cell line, we established stably transfected monoclonal MCF-7 cells overexpressing hQSOX1S (MCF-7 QSOX1S-1 and MCF-7 QSOX1S-2 lines). We then measured the level of QSOX1S expression in MCF-7 Control (MCF-7 C) and MCF-7 QSOX1S-1 and MCF-7

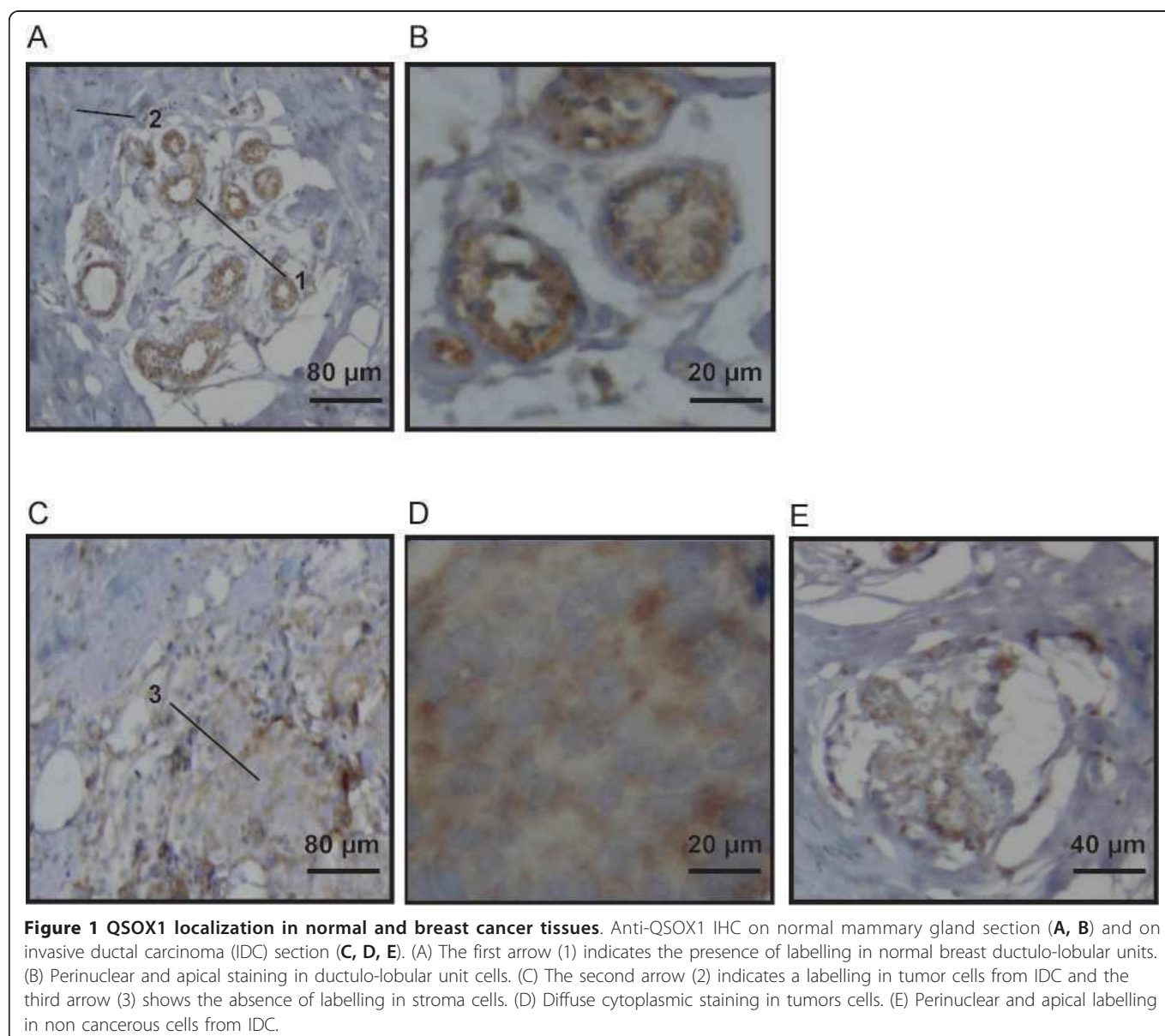


Figure 1 QSOX1 localization in normal and breast cancer tissues. Anti-QSOX1 IHC on normal mammary gland section (A, B) and on invasive ductal carcinoma (IDC) section (C, D, E). (A) The first arrow (1) indicates the presence of labelling in normal breast ductulo-lobular units. (B) Perinuclear and apical staining in ductulo-lobular unit cells. (C) The second arrow (2) indicates a labelling in tumor cells from IDC and the third arrow (3) shows the absence of labelling in stroma cells. (D) Diffuse cytoplasmic staining in tumors cells. (E) Perinuclear and apical labelling in non cancerous cells from IDC.

QSOX1S-2 lines under standard culture conditions. The relative fold of QSOX1 expression was determined by RTqPCR. MCF-7 QSOX1S-1 and MCF-7 QSOX1S-2 lines showed an increase of $186\% \pm 11$ (mean \pm SD) and $180\% \pm 11$, respectively, compared to MCF-7 C cells (Figure 3C). QSOX1 overexpression was also assessed at the protein level. The signal corresponding to hQSOX1S was strongly increased in MCF-7 QSOX1S-1 and MCF-7 QSOX1S-2 lines as compared to MCF7 C (Figure 3D).

Our second approach to studying the function of QSOX1 consisted of silencing QSOX1 expression. A series of RNA interference experiments using shRNA vectors were then performed in MDA-MB-231 cells. After RTqPCR analysis, two shRNA QSOX1 vectors (shQSOX1-1 and shQSOX1-2), inducing $55\% \pm 4$ (mean \pm SD) and $92\% \pm 1$ decreases of the QSOX1 expression,

respectively, were selected (Figure 3E). Results obtained by Western blotting showed a decrease in the signal corresponding to QSOX1S in the knock-down cell lines compared to the control (Figure 3F). MDA-MB-231 shQSOX1-2 harbors a higher extinction of the protein than MDA-MB-231 shQSOX1-1, as observed at the mRNA level.

QSOX1 decreased cell proliferation and colony formation

Cancer is characterized by an enhancement of cell proliferation. To determine the involvement of QSOX1 in cell proliferation, 10^4 cells were initially seeded and then the live cell number was measured. MCF-7 QSOX1S-1 and MCF-7 QSOX1S-2 proliferated less than MCF-7 C. Indeed, after five days of culture, living cell number increased 3.6-fold for MCF-7 C, 1.9 for MCF-7

Table 1 QSOX1 mRNA expression in relation to the usual prognostic factors in 217 breast IDC

Characteristics		n	%	median	P-value
Menopausal status	Pre	71	32.7	2.56	0.003
	Post	146	67.3	3.31	
Tumor size (mm)	<20	90	41.5	3.08	0.229
	≥20	120	55.3	2.62	
	ND	7	3.2	3.38	
Lymph node status	pN0	101	46.5	3.18	0.444
	pN+	116	53.5	2.64	
SBR Grade	I	30	13.8	4.25	<0.001
	II	115	53.0	3.14	
	III	58	26.7	1.74	
	ND	14	6.5	2.42	
ER status	Positive	179	82.5	3.17	<0.001
	Negative	38	17.5	1.51	
PgR status	Positive	169	77.9	3.17	<0.001
	Negative	48	22.1	1.97	
PAI-1 status*	Low	153	70.5	3.18	<0.001
	High	44	20.3	1.46	
	ND	20	9.2	2.77	

P-values correspond to Mann-Whitney test or Kruskal Wallis test. ER, estrogen receptor; ND, Not Determined; PgR, Progesteron receptor; SBR, Scarff Bloom Richardson. *Low: ≤75% quartile; High: >75% quartile.

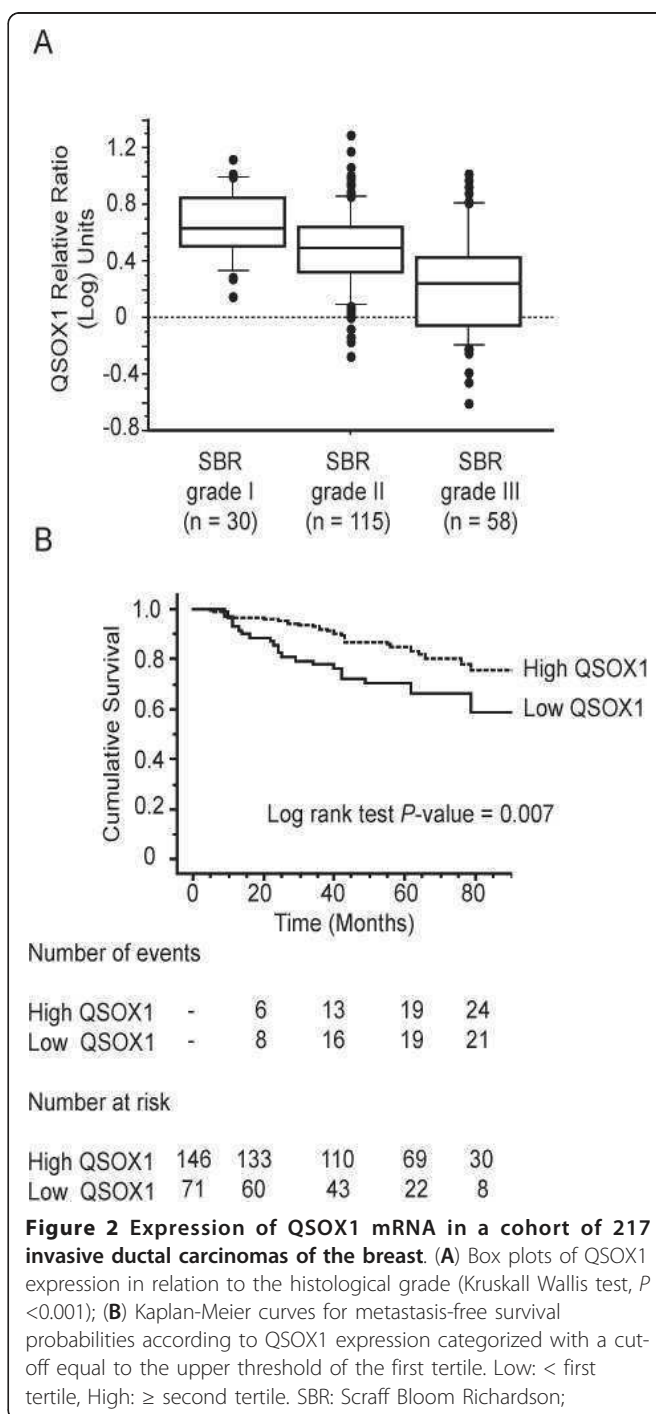
QSOX1S-1 and 1.8 for MCF-7 QSOX1S-2 (Figure 4A). After one week of culture, the number of MDA-MB-231 shQSOX1-1 or shQSOX1-2 living cells was strongly increased compared to MDA-MB-231 shC (Figure 4B). In fact, the living cell number increased 19.6-fold for MDA-MB-231 shC, 34.3-fold for MDA-MB-231 shQSOX1-1 and 39.8-fold for MDA-MB-231 shQSOX1-2.

While over-expression of hQSOX1S reduced cell growth by about two-fold compared to control, knock down of QSOX1 increased cell growth by about two-fold.

The enhancement of clonogenic capacities is a specific characteristic to cancer cells. In order to evaluate the survival, proliferation capacities and self-renewal of our cell models, we performed clonogenicity tests [24]. After 21 days of standard culture conditions, QSOX1 overexpression led to 3.2-fold and 3-fold decreases of MCF-7 QSOX1S-1 and MCF-7 QSOX1S-2 colonies, respectively, compared to MCF-7 C (Figure 4C). In contrast, QSOX1 down expression enhanced the number of new colonies by 1.7- and 2-fold compared to MDA-MB-231 control cells (Figure 4D).

Inhibition of colony formation was correlated with the overexpression of QSOX1S while an enhancement of newly-formed clones was associated with QSOX1 knock down.

Another mechanism of tumor aggressiveness is the anchorage independent cell growth [25]. As such, we studied the role of QSOX1 on anchorage-independent



growth. MCF-7 or MDA-MB-231 cell lines were plated in soft agar and incubated for two weeks before determining the size and number of colonies. The number of colonies decreased by $62.1\% \pm 7.2$ (means \pm SD) for QSOX1-1 and $64.4\% \pm 10.3$ for QSOX1S-2 compared to the control (Figure 4E). Inversely, there was an enhancement of $158\% \pm 14.5$ and $270\% \pm 8.5$ colony number compared to shC for shQSOX1-1 and shQSOX1-2, respectively (Figure 4F). QSOX1 seems to play a role in the negative control of cell growth, anchorage

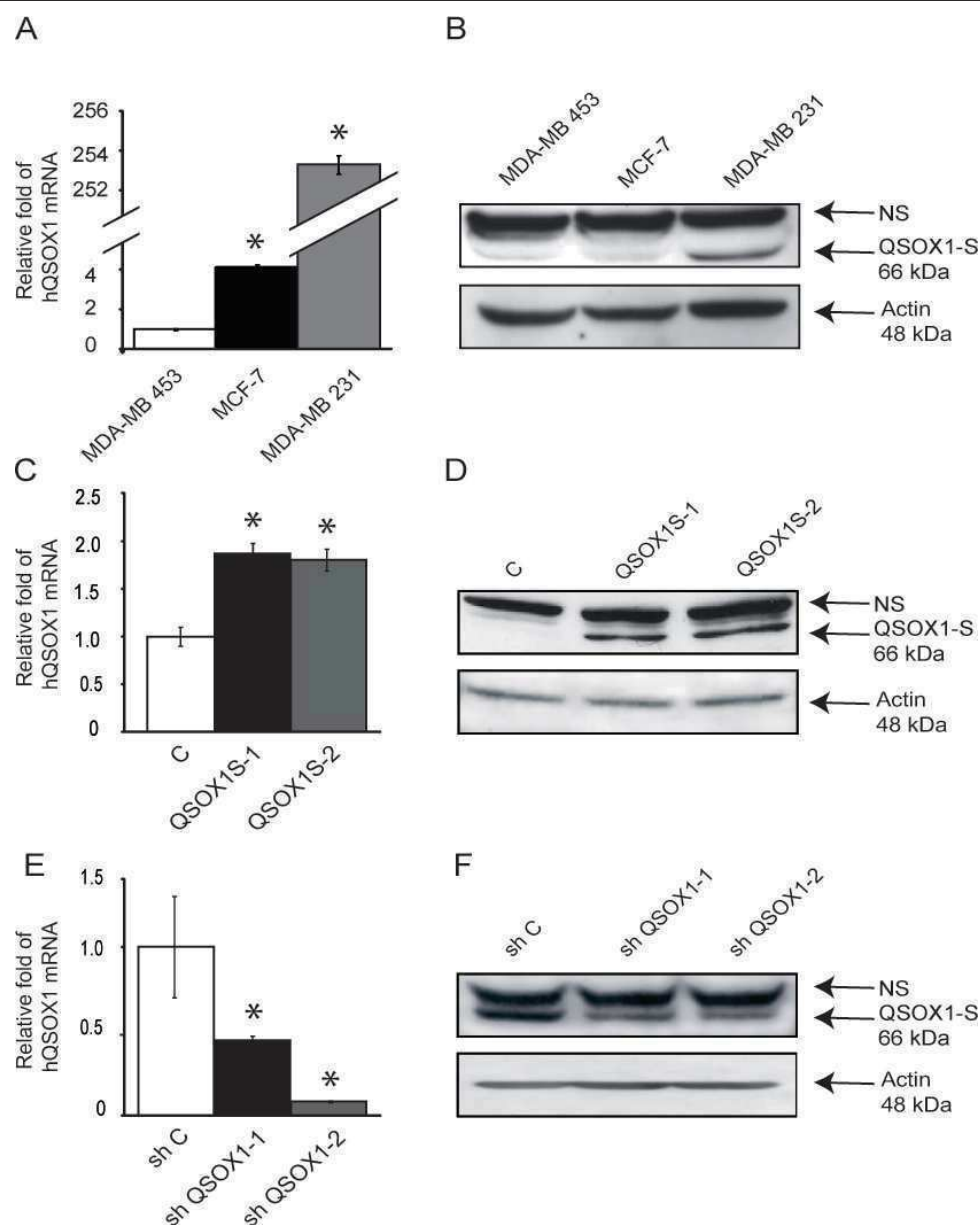


Figure 3 Analysis of QSOX1 expression in breast cancer cell lines. (A, C, E) After reverse transcription, relative QSOX1 mRNA expressions were determined by qPCR (C: MCF-7; E: MDA-MB-231). H3B-2 mRNA was used for normalization. Data are means \pm S.D. of three independent experiments. * $P < 0.05$, compared to control (Wilcoxon test). (B, D, F) Western blot analysis of QSOX1 expression. Total proteins (50 μ g) were separated on SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (D: MCF-7; F: MDA-MB-231). Proteins were detected using anti-QSOX1 and anti-actin antibodies. NS, Non Specific.

independent cell proliferation and in the capacity to form new colonies.

QSOX1 increased cell/matrix adhesion

Loss of cell adhesion to the matrix is often associated with tumor aggressiveness. We then tested cell adhesion to extracellular matrix by determining the number of adherent cells and cells remaining in the supernatant one hour after seeding. Figure 5 indicates the ratio between adherent cells and total seeded cells. Overexpression of QSOX1-S in MCF-7 cells led to a higher

number of adherent cells, compared to MCF-7 C, one hour after seeding: $76\% \pm 2$ (means \pm SD), $93\% \pm 3$ and $28\% \pm 4$ of adherent cells in MCF-7 hQSOX1S-1, MCF-7 hQSOX1-2 and MCF-7 control, respectively (Figure 5A). Conversely, numbers of MDA-MB-231 shQSOX1-1 and shQSOX1-2 adherent cells were lower, compared to control: $52.4\% \pm 1$, $44\% \pm 7$ and $81.5\% \pm 1$ of adherent, MDA-MB-231 shQSOX1-1, shQSOX1-2 cells, and shC respectively (Figure 5B). Interestingly, 24 h after seeding, no difference between the numbers of adherent cells in overexpressing or knock down models compared to

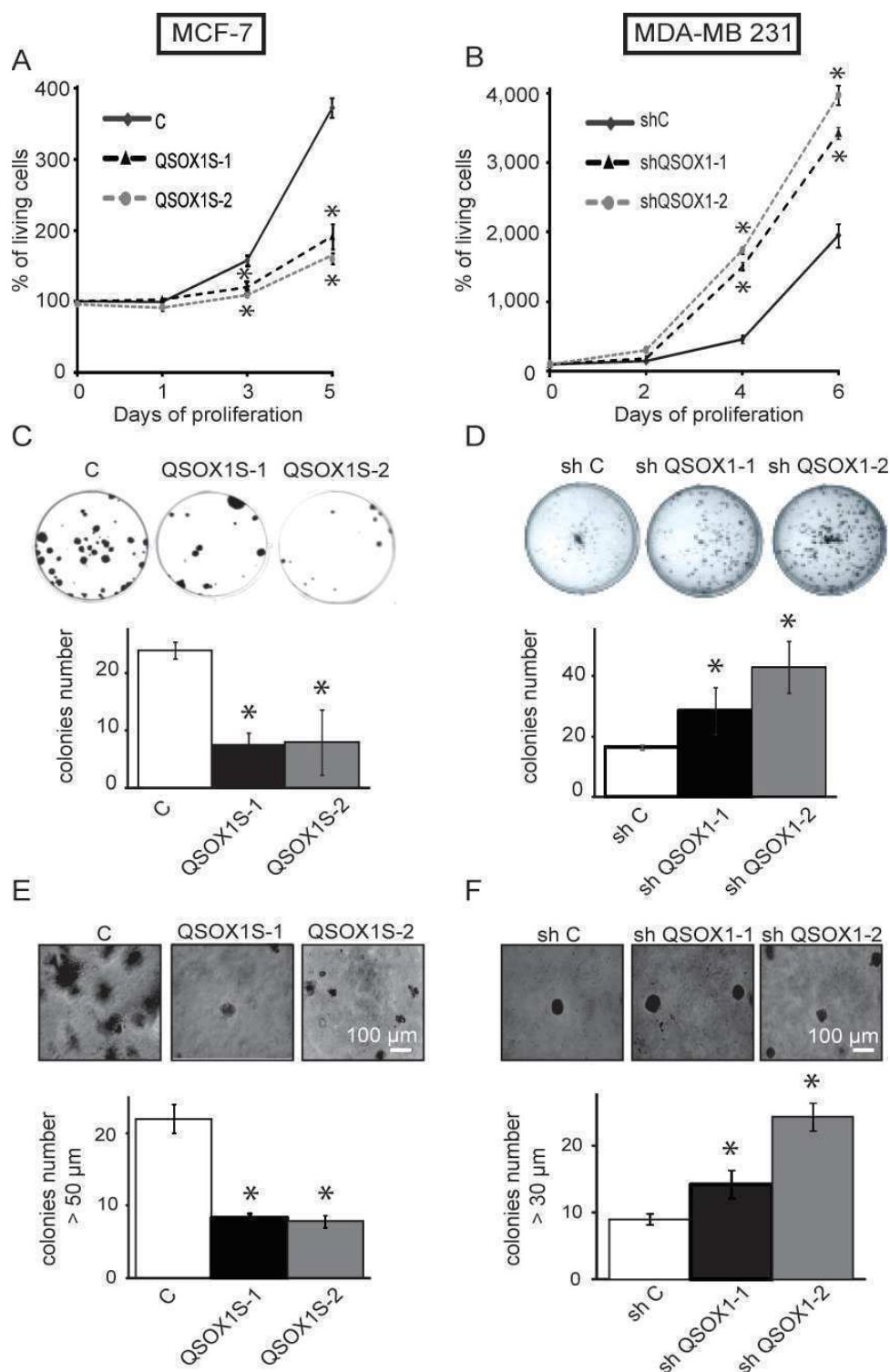


Figure 4 Effect of QSOX1 on cell proliferation and colony formation. (A, B) Cells were plated at 5,000 cells/cm². Cell viability was estimated by counting Trypan blue excluding cells. Data are expressed relative to the living cell number at day 0. Values are expressed as mean ± SD for three experiments. (C, D) For a colony formation assay, 500 cells were plated and 28 days later, cells were fixed and stained with 2% crystal violet. Quantitative changes were evaluated by counting using *Vision Capt* software. (E, F) Colony assays in soft agar were done to evaluate the effects of QSOX1 on anchorage independent cell proliferation. Cells were embedded in 0.3% agar and the agar cell layers were covered with 1 ml medium containing 5% FCS. After 28 days of growth, the colonies were photographed. Pictures of colonies were superposed with a Malassez cell picture in order to determine colony size. Results indicated number and colony size from four representative fields of each well. * $P < 0.05$, compared to control (Wilcoxon test). These experiments are representative of three separate assays.

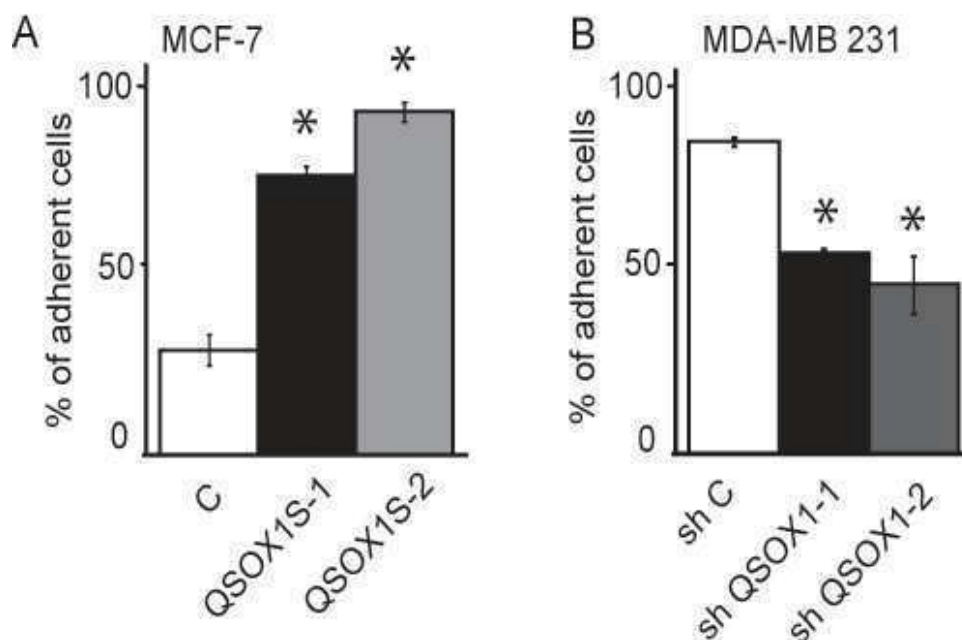


Figure 5 Effect of QSOX1 cell/matrix adhesion. MCF-7 (A) or MDA-MB-231 (B) cells were incubated at 37°C for 60 minutes at a density of 4×10^5 cells/well in serum-free DMEM. One hour later, adherent cell numbers were determined by counting Trypan blue excluding cells. Results were expressed as the ratio between cells adhered on the plate and total seeded cells and reported as the mean \pm S.D. of triplicate determinations. * $P < 0.05$, compared to control (Wilcoxon test). This experiment is representative of three separate assays.

their respective controls was observed (data not shown). These results suggested that QSOX1 could increase the speed of adhesion of cells to the extracellular matrix.

QSOX1 decreased invasion

Since invasion is one of the key steps in tumor and metastasis development [26], it was studied with the modified “Boyden chamber” technique in the presence of Matrigel [27]. One day after seeding, 32 ± 3.1 (means \pm SD) MCF-7 C cells were detected on the membrane’s inferior face whereas only 7 ± 2 MCF-7 hQSOX1S-1 cells and 9 ± 3 MCF-7 hQSOX1S-2 cells were counted (Figure 6A). As regards the MDA-MB-231 model, only 4 ± 0.6 shC cells invaded the lower chamber compared to 19 ± 3 shQSOX1-1 cells and 25 ± 3 shQSOX1-2 cells through the membrane (Figure 6B). Thus, overexpression of QSOX1 in MCF-7 cells decreased cell invasion, whereas QSOX1 knock-down in MDA-MB-231 increased this cellular process. We also observed that invading cells with high QSOX1 expression were rounded, whereas those with low QSOX1 expression presented a stellate morphology (Figure 6A, B).

As degradation of the extracellular matrix by matrix metallo proteinases (MMPs) is characteristic of the invasion process [28], we studied the activity and secretion of MMP-2 and MMP-9, enzymes involved in the mechanism of invasion [29], by a zymography test and western blotting. Results in Figure 6C show the presence of pro and active MMP-2 in the MCF-7 C culture medium and

an important decrease of intensity of the two bands in the MCF-7 QSOX1S-1 and MCF-7 QSOX1S-2 culture media (Figure 6CZ_Y). Conversely, the bands corresponding to the pro and active MMP-2 were more intense in MDA-MB-231 shQSOX1-1 and shQSOX1-2 than in the control (Figure 6DZ_Y). These results suggest that QSOX1 decreased both pro and active MMP-2 level in extracellular medium and thus the rate of MMP-2 activity. It is noteworthy to mention that MMP-9 activity was less intense in our models but the same activity variations as for MMP-2 were observed (data not shown). To determine if MMP-2 activity variations were due to a modulation of MMP-2 activation or to an increase in their expression or secretion, we analyzed the presence of this protein in the different culture media. As shown in Western blotting, Figure 6C, MMP-2 protein was detected in MCF-7 C conditioned medium extract but not in that of MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2. Moreover, a very low level of MMP-2 was detected in MDA-MB-231 shC culture medium (Figure 6DW_B) whereas it was greatly increased in those of MDA-MB-231 shQSOX1-1 and MDA-MB-231 shQSOX1-2. Quantification of MMP-2 mRNA by RTqPCR was performed but neither the overexpression or knock-down of QSOX1 influenced MMP-2 mRNA level (data not shown). Thus, QSOX1 could attenuate MMP-2 extracellular activity by probably acting on its stability and/or its secretion.

In order to examine if the observed differences in invasion assays were associated with a modulated activity of

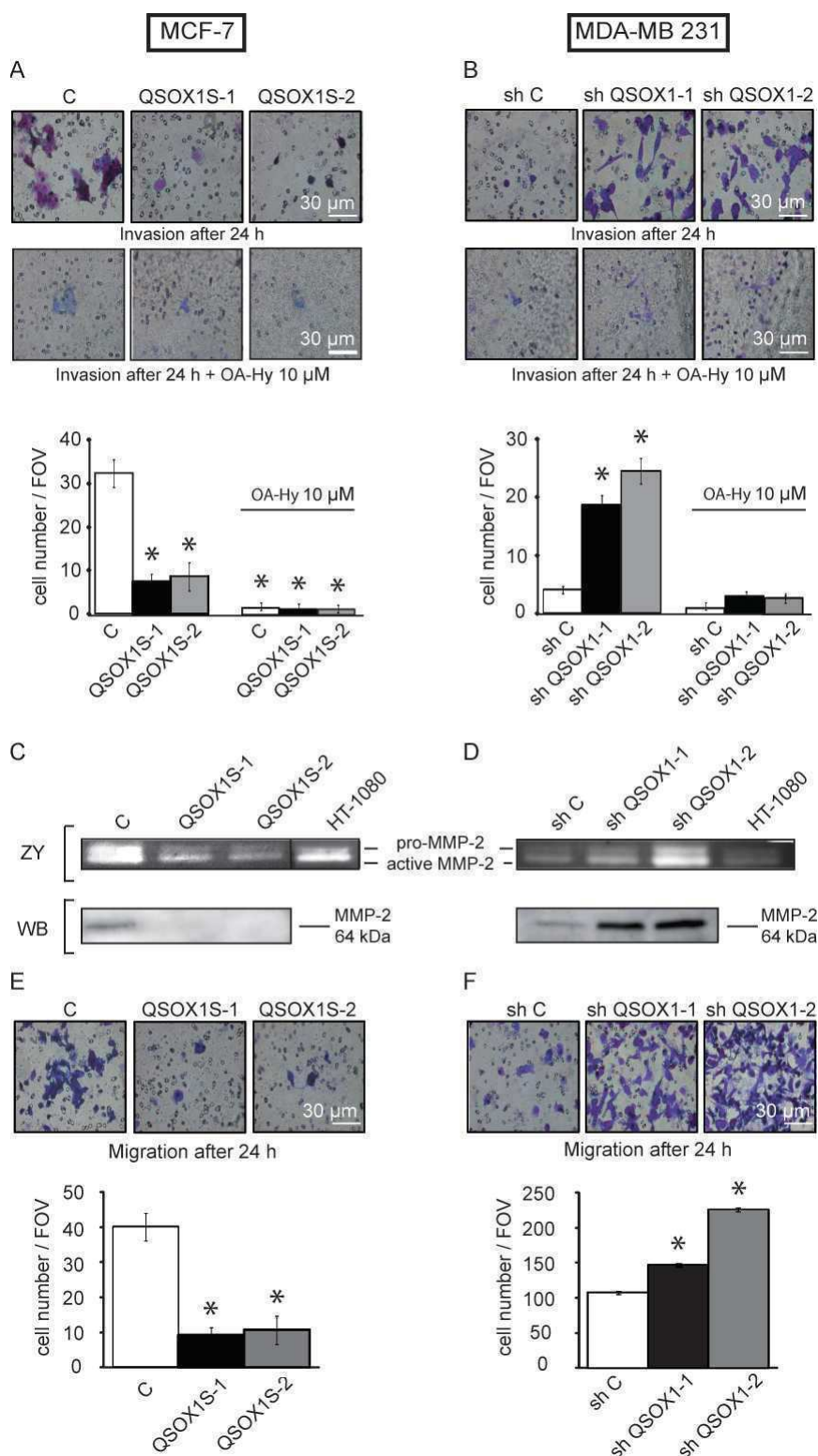


Figure 6 Effect of QSOX1 on invasiveness. (A, B) Cells were seeded on polycarbonate filter coated with Matrigel, in the presence/or not of a specific inhibitor of MMP-2 (OA-Hy) at 10 μ M and incubated for 24 h and analyzed as described in Materials and Methods. Inserts were stained with 2% crystal violet and photographed. * $P < 0.05$, compared to control (Wilcoxon test). (C, D)_{ZY} Gelatin Zymography of matrix-metalloproteinase in conditioned medium. Cells were seeded and the media were collected after 24 h and 12 h of serum starvation for the MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines respectively. Conditioned medium from HT-1080 cell line was used as positive control. Vertical line has been inserted to indicate a repositioned gel lane. (C, D)_{WB} Blotting identification of MMP-2 in protein extracts from conditioned culture medium. (E, F) Cells were seeded on polycarbonate filters coated without ECM and incubated for 24 h and analyzed as described in (A). * $P < 0.05$, compared to control (Wilcoxon test). These experiments are representative of three separate assays.

MMP-2, we performed invasion assays in the presence of a specific inhibitor of MMP-2. One day after seeding, 1.5 ± 0.6 (means \pm SD) MCF-7 C cells were detected on the membrane's inferior face and, as MCF-7 C, only 1.25 ± 0.5 MCF-7 hQSOX1S-1 cells and 1.25 ± 0.5 MCF-7 hQSOX1S-2 cells were counted (Figure 6A). With respect to the knock-down model, 1.3 ± 0.6 shC cells invaded the lower chamber and 3.7 ± 0.6 shQSOX1-1 cells and 3.3 ± 0.6 shQSOX1-2 cells passed through the membrane (Figure 6B). Inhibition of MMP-2 results in a loss of all differences in variations of invasion between different cancer cell models. These results show that QSOX1 down-regulates invasion, probably in part by negatively regulating MMP-2 activity.

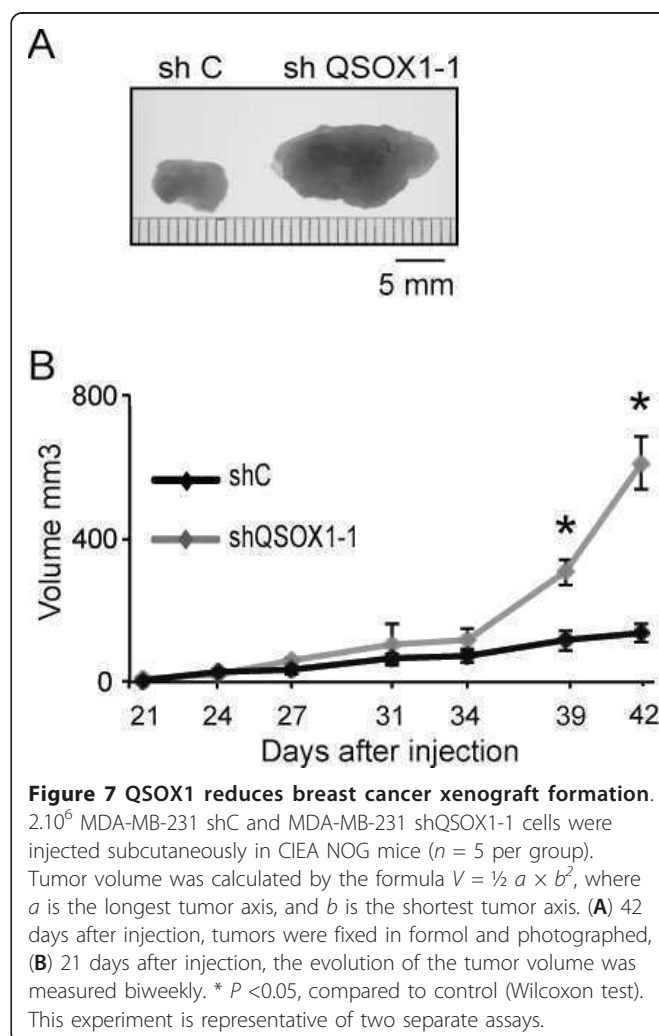
Since the capacity of cells to migrate through a physiological membrane is also a component of invasion, cell migration was studied using the modified "Boyden Chamber". Cells were seeded in a Boyden chamber lacking the Matrigel layer and cells able to cross the membrane were counted 24 h later. Cell number was 40 ± 6 (means \pm SD) for MCF-7 C, and 9 ± 3 and 11 ± 4 for MCF-7 hQSOX1S-1 and MCF-7 hQSOX1S-2, respectively (Figure 6E). In our knock-down model, there were only 108 ± 2 shC cells that passed through the membrane, whereas 147 ± 1 shQSOX1-1 cells and 226 ± 3 shQSOX1-2 cells were counted. QSOX1 knock-down in MDA-MB-231 cells increases the cellular motility (Figure 6F). Interestingly, the extent of the phenotypes observed in our knock-down models was inversely related to QSOX1 expression levels. Thus, it appears that QSOX1 also reduced cell migration.

QSOX1 suppressed tumor development *in vivo*

Tumorigenic properties of the QSOX1 knock-down models were analyzed in CIEA NOG mice. Tumor size was monitored for two months after inoculation. Results showed that decreased expression of QSOX1 led to a strong enhancement of the size (Figure 7A) and growth of the tumors (Figure 7B). In fact, 42 days after inoculation, the mean volume of MDA-MB-231 shQSOX1-1 tumors was 2.65 times higher than the mean volume of tumors obtained in the CIEA NOG control mice. Thus, *in vivo*, QSOX1 drastically reduced tumor growth. In addition, during the excision of tumors produced from the cell line MDA-MB-231 shC, we observed that tumors had developed just under the skin of animals while tumors from the MDA-MB-231 shQSOX1-1 cell line had developed in the subjacent muscle tissue (Additional file 1). This suggests that QSOX1 could be unfavorable for tumor invasion.

Discussion

In this study, we provide, for the first time, an insight into the QSOX1 expression level in breast tumors



and into its role in breast cancer cells and tumor development.

Even if the enzymatic function of QSOX1 is well described in the literature, its biological function is not clearly established. In fact, QSOX1 expression is differentially modulated in some cancers. It turns out that QSOX1 is overexpressed during the early stages of prostate cancer, and in pancreatic tumor cells [15-17]. However, it has also been shown that QSOX1 is down-regulated in an endothelial cancer cell model [18]. As such, we decided to investigate the QSOX1 expression in normal and cancerous human breast tissues.

Prior to our study, it was not previously reported where QSOX1 was expressed in breast tissues. IHC results showed that the protein was expressed in the endomembranous system in epithelial cells, but not in stroma cells and in adipocytes. Results were consistent with the fact that QSOX1 is a protein specifically expressed in epithelial cells and secreted [1,30]. The differential localization of QSOX1 in normal and cancer cells could be due to post-translational modifications and/or a differential regulation of the expression of

QSOX1 isoforms. The signal surrounding tumor cells could also be due to an epithelial cell depolarization, causing a loss of punctuate labeling and the appearance of a diffuse staining. Moreover, QSOX1 is expressed in pancreatic tumor cells and not in non-cancerous peripheral cells [16]. Together, these results indicate that QSOX1 is not constitutively expressed in different tissues, suggesting that the cellular role for this protein may also be tissue-dependent.

As QSOX1 was expressed in breast cancer tissues, we assessed if its expression level could be correlated to the outcome of breast cancer patients. Thus, we studied the QSOX1 mRNA expression in a retrospective cohort of 217 invasive ductal carcinomas of the breast. It appears that breast tumors presenting good prognostic criteria, such as low histological grade and steroid receptor-positive status, express a high level of QSOX1 mRNA (Figure 1A and Table 1). Furthermore, Kaplan-Meier curves (Figure 1B) showed that patients with high QSOX1 levels presented a significantly better metastasis-free survival compared to patients with low QSOX1 mRNA levels. These data suggest that the QSOX1 expression level could negatively correlate with the aggressiveness of breast tumors.

To determine the extent of association between QSOX1 expression and breast cancer patient outcome, we investigated the roles of QSOX1 on characteristic cancer cell phenotypes in MCF-7 overexpressing QSOX1 and MDA-MB-231, in which QSOX1 expression is knocked down. It must be underlined that QSOX1 levels are higher in the invasive MDA-MB-231 cells compared to the more indolent MCF7 cells. Differences between these two cell lines are not limited to basal QSOX1 expression but also include the expression of several genes, such as steroid hormone receptors and the receptor 2 of the epidermal growth factor [31]. Therefore, QSOX1 expression could not be responsible in itself for the difference in aggressiveness of these cell lines.

After validation of our cellular models, we investigated the role of QSOX1 on proliferation, clonogenic capacities and invasion. Above all, it is interesting to note that all observed phenotypes obtained with the overexpression of QSOX1 were opposite of those obtained with the QSOX1 knocked-down model. Moreover, in the latter cell model, the intensity of the effect was correlated to the extent of QSOX1 knock-down.

We report in this study that QSOX1 inhibits breast cancer cell proliferation. These data are in accordance with previous studies showing that QSOX1 decreased epithelial and endothelial cell proliferation [11,18]. The fact that QSOX1 was induced in quiescent WI38 fibroblasts, but not in cycling lung fibroblasts, suggests that

it could act in the negative control of the cell cycle and reinforces the idea that it could downregulate cell proliferation [3]. Conversely, Katchman and coworkers suggested that a QSOX1 knock-down in different pancreatic cancer cells decreased proliferation. But, cell cycle analyses did not give clear conclusions about QSOX1 role on cell cycle control [16]. All these results suggested that QSOX1 role on proliferation and cell cycle could be cell type or tumor stage dependent.

The study of cancer cell proliferation is generally performed in parallel with the study of the cell clonogenic capacity, often associated with tumor development and establishment of metastases [32]. Thus, the fact that QSOX1 reduced cell clonogenicity and anchorage-independent growth is in accordance with our observations on proliferation. In addition, we studied the effect of QSOX1 on cell-matrix adhesion, which is often disrupted in breast cancer. Our findings demonstrate that QSOX1 increased cell adhesion to the extracellular matrix but more specifically early in the adhesion process. Since QSOX1 is implicated in protein folding, we can hypothesize that QSOX1 could enhance the folding or the addressing of newly synthesized proteins implicated in cell adhesion to the matrix. In fact, it is already known that integrin activation can be mediated by thiol disulfide exchanges within the extracellular domain of the beta subunit [33,34], a process often performed by the Protein Disulfide Isomerase (PDI) [35,36]. QSOX1 could activate integrins directly by creating a thiol-disulfide bond or indirectly via an oxidation of PDI [9].

We showed in our retrospective cohort of invasive ductal carcinomas of the breast that a high QSOX1 expression is associated with low expression of a well-established marker of migration and invasion phenotype in breast cancer: PAI1 (Table 1) [37]. In fact, the tumor cell must first degrade basement membrane components before being able to migrate and establish itself in another organ [38]. We demonstrated that QSOX1 decreased the ability of cells to invade the Matrigel. Furthermore, a low QSOX1 expression level confers to the invading cells this stellate morphology described as characteristic of a high metastatic potential [39].

Considering that QSOX1 decreased cellular invasion, we studied the activity of MMP-2 and MMP-9, enzymes widely described to be involved in the mechanism of invasion [29]. QSOX1 decreased both pro and active MMP-2 level in extracellular medium and thus the rate of MMP-2 activity. QSOX1 has also a lesser effect on MMP-9 activity. Nevertheless, QSOX1 had no effect on other MMPs implicated in the basal membrane degradation process, such as MMP-3 and MMP-7 [29] (data not shown). It seems that QSOX1 reduced invasion by down-regulating MMP-2 activity, since the effect of QSOX1 on

invasion was no longer observable in the presence of a specific MMP-2 inhibitor. The involvement of MMP-2 in cell proliferation [40] could account for our results on this cellular process.

The MMP-2 regulation is very complex and the role of QSOX1 on this MMP remains to be determined. Our results suggest that QSOX1 could attenuate MMP-2 extracellular activity by probably acting on MMP-2 secretion and/or stability without modifying the mRNA level.

Thus, QSOX1 could inhibit MMP-2 activation by promoting cell matrix adhesion. In fact, when cells do not adhere to the matrix, integrin $\alpha\beta3$ interacts with MMP-2 and so participates to its activation [29]. The TIMPs (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases), present six conserved disulfide bonds involved in their interaction domains with MMPs [41]. QSOX1 could promote disulfide bond formation in TIMPs, and thus their interaction with MMP-2, leading to its inhibition.

Interestingly, the activation and secretion of MMP-2 could also be positively regulated by oxidative stress through the oxidation of its pro-peptide [41]. Since QSOX1 protected cell against oxidative stress [11], it could eventually prevent oxidation of the pro-peptide and so MMP-2 secretion and activation.

Conversely, it has been shown in pancreatic cancer cells that QSOX1 favored the activities but not the secretion of MMP-2 and MMP-9; whereas, QSOX1, in our breast cancer cell models, decreases both the activity and secretion of these MMPs. The discrepancies between our results on breast cancer cells and Katchman's results on pancreatic cells could be explained by differential expression of QSOX1 isoforms and its substrates availability. Furthermore, QSOX1 participates to the redox state control together with a network of proteins like PDI, Ero1, Glutathione reductase or thioredoxins. It would be interesting to know the expression level of all these actors to understand how QSOX1 could generate opposite effects.

Given these conflicting results between the role of QSOX1 in the breast and pancreas cancer cell models, we performed an *in vivo* study. We demonstrated that QSOX1 drastically inhibited tumor growth. Moreover, it should be noted that during the tumor resection, we observed that QSOX1 was unfavorable for tumor invasion in subjacent muscle tissue. By inhibiting MMP-2, an enzyme involved in tumor development, angiogenesis and metastasis [42], QSOX1 could disfavor breast tumor development and aggressiveness. Indeed, it has been demonstrated in endothelial cancer cell models that QSOX1 could inhibit angiogenesis [18]. It would consequently also be interesting to study angiogenesis to better understand the effect of QSOX1 on tumor growth through MMP-2 activity regulation.

Conclusion

In our study, we demonstrate that QSOX1 could inhibit breast tumor development and aggressiveness, which is in agreement with our findings, indicating that a high QSOX1 expression is associated with a better survival for breast cancer patients. QSOX1 could be regarded as a new marker of good prognosis. All our data provide new insights into the role of QSOX1 in cancer cell biology.

Additional material

Additional file 1: Tumor localization during their excision. During the excision of tumors (white arrow), tumors from the cell line MDA-MB-231 shC developed just under the skin of animals while tumors from MDA-MB-231 shQSOX1-1 developed in the subjacent muscle tissue.

Abbreviations

DMEM: Dulbecco's Minimum Essential Medium; ECM: Extra Cellular Matrix; ER: Estrogen Receptor; ERV/ALR: Essential for Respiration and Vegetative growth/Augmenter of Liver Regeneration; FAD: Flavin Adenine Dinucleotide; FCS: Fetal Calf Serum; GAPDH: GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase; HRP: HorseRadish Peroxidase; HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cell; IDC: Invasive Ductal Carcinomas; MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7; MDA-MB-231: M.D Anderson-Metastatic Breast-231; MDA-MB-453: M.D Anderson-Metastatic Breast-453; MMP-2: Matrix MetalloProteinase-2; OA-Hy: *cis*-9-Octadecenoyl-N-Hydroxylamide; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1; PDI: Protein Disulfide Isomerase; PgR: Progesterone Receptor; PVDF: PolyVinylidene DiFluoride; QSOX1: Quiescin/Sulphydryl OXidase 1; ROS: Reactive Oxygen Species; RTqPCR: Reverse Transcription quantitative Polymerisation Chain Reaction; SBR: Scarff, Bloom and Richardson; SDS: Sodium DodecylSulfate; SDS PAGE: SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis; shRNA: Small Hairpin RNA; TIMP: Tissue Inhibitor of MetalloProteinases; TBST: Tris Buffered Saline Tween

Acknowledgements

We are grateful to Jean Y Bobin (Centre Hospitalier Lyon Sud), J Datchary (Centre Hospitalier Régional, Annecy) and G De Laroche (Clinique Mutualiste, St Etienne) for providing breast cancer tumors and clinical data. We thank F. Bonnefoy for CIEA NOG Mice breeding. We thank Pierre Y Rysold for his valuable help during immunohistochemistry experiments. We thank J Radom for the gift of coding sequence of QSOX1-S splice variant 2, I Idirene for the gift of HT-1080 cells, F Poncet (Plateforme séquençage, IFR133, Besançon), L Pagnot, V Perez and E Bedel for technical help and Nicole J Le Grand for critical reading of the paper. This work was supported by a grant from the "Ligue Nationale Contre le Cancer" (Conférence de Coordination InterRégionale-Grand Est). N Pernodet is supported by a fellowship from "Ville de Besançon". The clinical research work was supported by "Ligue Nationale Contre le Cancer" (Drôme, Haute Savoie, Loire, Saône & Loire and Rhône committees).

Author details

¹Université de Franche-Comté, EA3922 « Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central », IFR133, U.F.R. Sciences et Techniques, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France. ²Université de Bourgogne, EA7270, Equipe 'Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique' (Bio-peroxLL), 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France. ³Service de Biochimie Biologie Moléculaire Sud, Centre Hospitalier Lyon sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite, France. ⁴Université de Franche Comté, UMR INSERM-UFC-EFS 1098 « Relation Hôte Greffon et Ingénierie Cellulaire et Génique », 240 route de Dôle, 25000 Besançon, France. ⁵Université François Rabelais, INSERM U1100, 10 boulevard Tonnelé, 37000 Tours, France.

Authors' contributions

NP performed research, analyzed data and wrote the paper. FH performed research and analyzed data. PA participated in data interpretation and in the writing of the paper. AV participated in experiment design. FD performed clinical data analysis and interpretation. MA performed clinical RT-qPCR analysis. CB provided his expertise in *in vivo* cancer experiments. JRP performed *in vivo* experiments execution. GV performed immunohistochemistry data analysis and interpretation. FE provided critical reagents. MJ participated in writing of the manuscript. GD designed research, analyzed data and wrote the paper. All authors have read and approved the manuscript for publication.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 17 February 2012 Revised: 17 September 2012

Accepted: 24 October 2012 Published: 25 October 2012

References

- Musard JF, Sallot M, Dulieu P, Fraichard A, Ordener C, Remy-Martin JP, Jouvenot M, Adami P: **Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOX-3 during the cell cycle and estrus cycle in uterine cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **287**:83-91.
- Coppock DL, Cina-Poppe DA, Gilleran S: **The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1.** *Genomics* 1998, **54**:460-468.
- Coppock DL, Kopman C, Gudas J, Cina-Poppe DA: **Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin and ribosomal protein S29.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **269**:604-610.
- Benayoun B, Esnard-Fève A, Castella S, Courty Y, Esnard F: **Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family.** *J Biol Chem* 2001, **276**:13830-13837.
- Tury A, Mairet-Coello G, Poncet F, Jacquemard C, Risold PY, Fellmann D, Griffond B: **QSOX sulfhydryl oxidase in rat adenohypophysis: localization and regulation by estrogens.** *J Endocrinol* 2004, **183**:353-363.
- Coppock DL, Thorpe C: **Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases.** *Antioxid Redox Signal* 2006, **8**:300-311.
- Hooper KL, Joneja B, White HB, Thorpe C: **A sulfhydryl oxidase from chicken egg white.** *J Biol Chem* 1996, **271**:30510-30516.
- Thorpe C, Hooper KL, Rajé S, Glynn NM, Burnside J, Turi GK, Coppock DL: **Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes.** *Arch Biochem Biophys* 2002, **405**:1-12.
- Hooper KL, Sheasley SL, Gilbert HF, Thorpe C: **Sulfhydryl oxidase from egg white. A facile catalyst for disulfide bond formation in proteins and peptides.** *J Biol Chem* 1999, **274**:22147-150.
- Thorpe C, Coppock DL: **Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family.** *J Biol Chem* 2007, **282**:13929-13933.
- Morel C, Adami P, Musard JF, Duval D, Radom J, Jouvenot M: **Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis.** *Exp Cell Res* 2007, **313**:3971-3982.
- Bostwick DG, Alexander EE, Singh R, Shan A, Qian J, Santella RM, Oberley LW, Yan T, Zhong W, Jiang X, Oberley TD: **Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer.** *Cancer* 2000, **89**:123-134.
- Oberley TD: **Oxidative damage and cancer.** *Am J Pathol* 2002, **160**:403-408.
- Coppock DL, Kopman C, Scandalis S, Gilleran S: **Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts.** *Cell Growth Differ* 1993, **4**:483-493.
- Antwi K, Hostetter G, Demeure MJ, Katchman BA, Decker GA, Ruiz Y, Sielaff TD, Koep LJ, Lake DF: **Analysis of the plasma peptidome from pancreas cancer patients connects a peptide in plasma overexpression of the parent protein in tumors.** *J Proteome Res* 2009, **8**:4722-4731.
- Katchman BA, Antwi K, Hosteller GH, Demeure MJ, Watanabe A, Decker GA, Miller LJ, Von Hoff DD, Lake DF: **Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes invasion of pancreatic tumor cells mediated by matrix metalloproteinases.** *Mol Cancer Res* 2011, **9**:1621-1631.
- Song H, Zhang B, Watson MA, Humphrey PA, Lim H, Milbrandt J: **Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis.** *Oncogene* 2009, **28**:3307-3319.
- Hellebrekers DM, Melotte V, Vire E, Langenkamp E, Molema G, Fuks F, Herman JG, Van Criekinge W, Griffioen AW, van Engeland M: **Identification of epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells.** *Cancer Res* 2007, **67**:4138-4148.
- Berthier A, Seguin S, Sascio AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, Saez S, Rodriguez-Lafresse C, Tolle F, Fraichard A, Boyer-Guittaut M, Jouvenot M, Delage-Mourroux R, Descotes F: **High expression of gabarapl1 is associated with better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer.** *Brit J Cancer* 2010, **102**:1024-1031.
- EORTC: **Revision of the standards for the assessment of hormone receptors in human breast cancer. Report of the Second E.O.R.T.C. Workshop, held on 16-17 March, 1979, in The Netherlands Cancer Institute.** *Eur J Cancer* 1980, **16**:1513-1515.
- Descotes F, Riche B, Saez S, De Laroche G, Datchary J, Roy P, André J, Bobin JY: **Plasminogen activator inhibitor type 1 is the most significant of the usual tissue prognostic factors in node-negative breast ductal adenocarcinoma independent of urokinase-type plasminogen activator.** *Clin Breast Cancer* 2008, **8**:168-177.
- Berton A, Rigot V, Huet E, Decarme M, Eeckhout Y, Patthy L, Godeau G, Hornebeck W, Bellon G, Emonard H: **Involvement of fibronectin type II repeats in the efficient inhibition of gelatinases A and B by long-chain unsaturated fatty acids.** *J Biol Chem* 2001, **276**:20458-20465.
- Simian M, Hirai Y, Navre M, Werb Z, Lochter A, Bissell MJ: **The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells.** *Development* 2001, **128**:3117-3131.
- Hamburger AW: **The human tumor clonogenic assay as a model system in cell biology.** *Int J Cell Cloning* 1987, **5**:89-107.
- Colburn NH, Bruegge WF, Bates JR, Gray RH, Rossen JD, Kelsey WH, Shimada T: **Correlation of anchorage-independent growth with tumorigenicity of chemically transformed mouse epidermal cells.** *Cancer Res* 1978, **38**:624-634.
- Fidler IJ: **Understanding bone metastases: the key to the effective treatment of prostate cancer.** *Clin Adv Hematol Oncol* 2003, **1**:278-279.
- Simon N, Noel A, Foidart JM: **Evaluation of *in vitro* reconstituted basement membrane assay to assess the invasiveness of tumor cells.** *Invasion Metastasis* 1992, **12**:156-167.
- Deryugina EI, Luo GX, Reisfeld RA, Bourdon MA, Strongin A: **Tumor cell invasion through matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2.** *Anticancer Res* 1997, **17**:3201-3210.
- Stamenkovic I: **Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis.** *Semin Cancer Biol* 2000, **10**:415-433.
- Nemos C, Delage-Mourroux R, Jouvenot M, Adami P: **Onset of direct 17- β estradiol effects on proliferation and c-fos expression during oncogenesis of endometrial glandular epithelial cells.** *Exp Cell Res* 2004, **296**:109-122.
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW: **A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes.** *Cancer Cell* 2006, **10**:515-527.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, Van Bree C: **Clonogenic assay of cells *in vitro*.** *Nat Protoc* 2006, **1**:2315-2319.
- Yan B, Smith JW: **A redox site involved in integrin activation.** *J Biol Chem* 2000, **275**:39964-39672.
- Yan B, Smith JW: **Mechanism of integrin activation by disulfide bond reduction.** *Biochemistry* 2001, **40**:8861-8867.
- Lahav J, Gofer-Dadosh N, Luboshitz J, Hess O, Shklai M: **Protein disulfide isomerase mediates integrin-dependent adhesion.** *FEBS Lett* 2000, **475**:89-92.
- Lahav J, Jurk K, Hess O, Barnes MJ, Farndale RW, Luboshitz J, Kehrel BE: **Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange.** *Blood* 2002, **100**:2472-2478.
- Durand MK, Bødker JS, Christensen A, Dupont DM, Hansen M, Jensen JK, Kjølgaard S, Mathiasen L, Pedersen KE, Skeldal S, Wind T, Andreassen PA: **Plasminogen activator inhibitor-1 and tumour growth, invasion, and metastasis.** *Thromb Haemost* 2004, **9**:438-449.
- Strimpakos A, Saif MW, Syrigos KN: **Pancreatic cancer: from molecular pathogenesis to targeted therapy.** *Cancer Metastasis Rev* 2008, **3**:495-522.

39. Thompson EW, Paik S, Br nner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R, Shima TB, Torri J, Donahue S, Lippman ME: **Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines.** *J Cell Physiol* 1992, **150**:534-544.
40. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK: **Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting.** *FEBS J* 2011, **278**:16-27.
41. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R: **Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix.** *Cardiovasc Res* 2010, **85**:413-423.
42. Stetler-Stevenson WG: **Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention.** *J Clin Invest* 1999, **103**:1237-1241.

doi:10.1186/bcr3341

Cite this article as: Pernodet *et al.*: High expression of QSOX1 reduces tumorigenesis, and is associated with a better outcome for breast cancer patients. *Breast Cancer Research* 2012 **14**:R136.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



2. Communications orales (CO) dans des congrès internationaux

CO10 : **Hermetet F**, Launay S, Jacquin E, Gaiffe E, Oudet P, Prétet JL and Mougin C. *Clearance of apoptotic cervical cancer cells by human primary fibroblasts: implication in horizontal transfer of viral oncogenes*. 29th International Papillomavirus Conference, August 21-25, 2014, Seattle, USA

CO9 : **Hermetet F**, Launay S, Gaiffe E, Prétet JL, Hirchaud F and Mougin C. *Human primary fibroblasts recognize and process apoptotic cervical cancer cells at various stages of cell death*. 21st ECDO (European Cell Death Organization) Euroconference on apoptosis, September 25-28, 2013, Paris, France

3. Communications orales dans des colloques/séminaires interrégionaux

CO8 : **Hermetet F**. *La seconde vie de cellules cancéreuses mourantes ingérées par des fibroblastes*. Société de Biologie de Besançon, December 10, 2014, Besançon, France (Prix de communication orale)

CO7 : **Hermetet F**, Launay S, Jacquin E, Gaiffe E, Oudet P, Prétet JL and Mougin C. *Brain angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) is a pattern recognition receptor that may mediate human primary fibroblast binding and engulfment of apoptotic HPV positive cervical cancer cells: implication in horizontal transfer of viral oncogenes*. 8^{ème} Forum du Cancéropôle du Grand-Est, November 20-21, 2014, Strasbourg, France

CO6 : **Hermetet F**, Launay S, Gaiffe E, Oudet P, Prétet JL and Mougin C. *Clearance of apoptotic cervical cancer cells by human primary fibroblasts: implication in horizontal transfer of viral oncogenes*. 20^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, June 23-24, 2014, Besançon, France

CO5 : **Hermetet F**, Launay S, Gaiffe E, Oudet P, Prétet JL and Mougin C. *Efferocytosis of apoptotic HPV positive cervical cancer cells contributes to horizontal transfer of viral oncogenes*. Journée Scientifique Annuelle de la SFR FED 4234, Ingénierie et Biologie Cellulaire et Tissulaire, May 23, 2014, Besançon, France

CO4 : **Hermetet F**, Launay S, Gaiffe E, Hirchaud F et Mougin C. *Mécanisme d'internalisation de cellules apoptotiques dérivées du cancer du col de l'utérus : Un processus clé dans le transfert de propriétés cancéreuses à des cellules saines*. 19^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, June 13-14, 2013, Dijon, France (Prix de communication orale)

CO3 : Hirchaud F, **Hermetet F**, Fauconnet S, Ablise M, Vuitton DA, Prétet JL et Mougin C. *Une molécule issue de la racine de réglisse est létale pour les cellules dérivées du cancer du col de l'utérus. L'isoliquiritigénine (ILG) synthétique induit l'apoptose dans les lignées humaines du cancer du col de l'utérus*. Société de Biologie de Besançon, December 20, 2012, Besançon, France

CO2 : Hirchaud F, **Hermetet F**, Fauconnet S, Ablise M, Vuitton DA, Prétet JL et Mougin C. *L'isoliquiritigénine (ILG) synthétique a une activité anti-tumorale dans les lignées humaines du cancer du col de l'utérus*. 18^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, September 6-7, 2012, Besançon, France

CO1 : Pernodet N, **Hermetet F**, Adami P, Vejux A, Descotes F, Adams M, Esnard F, Jouvenot M et Despouy G. *Etude de la sulfhydryl oxydase QSOX1 dans la biologie des cellules cancéreuses*. 17^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, June 16-17, 2011, Dijon, France

4. Communication affichée (CA) dans un congrès international

CA3 : Hirchaud F, **Hermetet F**, Fauconnet S, Prétet JL, Ablise M, Vuitton DA and Mougin C. *Isoliquiritigenin has potent anti-tumor activities in human cervical carcinoma cells lines*. 20th Euroconference of apoptosis (ECDO), September 14-17, 2012, Rome, Italy

5. Communications affichées dans des colloques/séminaires interrégionaux

CA2 : **Hermetet F**, Jacquin E, Lupberger J, Dalstein V, Jung A, Jeulin H, Mougin C, Clavel C et Prétet JL. Chronicité-permissivité des infections virales et cancers. Réunion thématique Axe C du CGE : "Virus et Cancer". 6^{ème} Forum du Cancéropôle du Grand-Est, November 13-14, 2012, Strasbourg, France

CA1 : Pernodet N, **Hermetet F**, Adami P, Vejux A, Descotes F, Adams M, Esnard F, Jouvenot M and Despouy G. *High expression of QSOX1 is associated with a better outcome for breast cancer patients, and reduces cell proliferation, migration and invasiveness*. 5^{ème} Forum du Cancéropôle du Grand-Est, November 2-3, 2011, Strasbourg, France