



HAL
open science

Etude de la voie d'action intracrine et nucléaire du Fibroblast Growth Factor 1 dans des cellules de type neuronal

Caroline Pirou

► **To cite this version:**

Caroline Pirou. Etude de la voie d'action intracrine et nucléaire du Fibroblast Growth Factor 1 dans des cellules de type neuronal. Interactions cellulaires [q-bio.CB]. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLV102 . tel-01686052

HAL Id: tel-01686052

<https://theses.hal.science/tel-01686052>

Submitted on 17 Jan 2018

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.

NNT : 2016SACLV102



École Pratique
des Hautes Études

THÈSE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY
PRÉPARÉE À
L'UNIVERSITÉ DE VERSAILLES SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES

ÉCOLE DOCTORALE N°577
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants

Spécialité de doctorat :
Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Caroline Pirou

Étude de la voie d'action intracrine et nucléaire du FGF1
dans des cellules de type neuronal

**Thèse présentée et soutenue
à l'UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, le 25/11/2016**

Composition du Jury :

Pr Henri-Jean GARCHON	PU-PH, INSERM, Université de Versailles St Quentin	Président
Dr Alicia TORRIGLIA	DR, INSERM	Rapporteur
Pr Hervé PRATS	DR, INSERM, Université de Toulouse	Rapporteur
Dr Claude CARON DE FROMENTEL	DR, INSERM	Examineur
Dr Flore RENAUD	MCU, École Pratique des Hautes Études	Directrice de thèse

Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire EA4589 UVSQ/EPHE

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

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Alicia TORRIGLIA, Hervé PRATS, Claude CARON DE FROMENTEL et Henri-Jean GARCHON d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'évaluer mon travail.

Je souhaite également remercier Bernard MIGNOTTE de m'avoir accueillie au sein du LGBC.

Un grand merci à Flore pour m'avoir ouvert les portes de la thèse. Merci pour nos discussions scientifiques et tes conseils avisés. Merci d'avoir pris le temps de relire et corriger ce manuscrit toujours dans la bonne humeur, c'était un plaisir de travailler avec toi !

Je garderai une foultitude de bons souvenirs de ces quatre années passées au LGBC, et plus particulièrement dans la Dream Team (aka l'équipe Bio Cell). Merci à Sylvina ma binôme de RNA-Seq pour ta bonne humeur, ton optimisme inébranlable, tes conseils et ces sessions brainstorming à se plier le cerveau en quatre pour faire des listes dans tous les sens, et qui avec Nath est toujours prête à m'écouter râler. Merci à Arno d'avoir supporté ça à l'insu de ton plein gré, et les sessions musicales en pièce culture. Merci Eli pour ta complicité et tous ces bons moments passés en pièce culture, ces moments de grand n'importe quoi pendant les temps d'attente de ces IP interminables, ma comparse de Nesquik et ma cellule de soutien psychologique (t'inquiète, tu l'auras ta médaille !). Ευχαριστώ Sevasti, grâce à toi je suis bilingue en insultes grecques (επειδή το αξίζω !), que la lumière de Jah guide tes manips !

Merci à tous les autres thésards actuels et anciens pour la bonne ambiance, l'entraide et les pauses goûter (il faut s'y remettre d'ailleurs, beaucoup trop de laisser-aller !). Jess (Princesse Chonchon !!), faire nos thèses ensemble je crois qu'on ne pouvait pas rêver mieux, merci pour les fous rires et tout le reste, cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans toi. Vincent, aka BioWitch mon binôme de TP, force et courage pour cette année d'ATER, tu verras on finit par s'en sortir ! Merci à Benjamin pour les délires de pauses clopes, à Amandine pour sa bonne humeur, Angé (si si, porqué élévacion...), Marie pour sa gentillesse, Yoyo et Adrie le duo comique Belle-Ilois de choc.

Je remercie tous les autres membres du labo qui contribuent grâce à leur humour et leur bonne humeur à faire du LGBC un endroit où on prend plaisir à travailler : Isa, je te lègue mon klaxon (à utiliser avec modération !) ; Aurore, je sais que nos discussions sur Human Centipede te manqueront terriblement (on pourra se faire un marathon de la trilogie !) ; Seb G merci pour tes corrections d'anglais, nos high-fives vont me manquer ; Seb Sup mon collègue d'enseignement, la génét' c'est

chouette, mais c'est bien quand ça s'arrête ! ; Jean-Marc (HEEEY !) ; Fred, merci pour ta gentillesse et tes bons conseils ; Jessie, toujours à 1000 à l'heure, les pauses clopes ne sont jamais monotones avec toi ! Merci également à Kiki et Sophie, la team marketing en or de ma société de SAV informatique, et Marcelle.

Merci à mes amis pour qui mon sujet de thèse n'a aucun sens et qui m'ont permis d'avoir une vie en dehors du FGF1 ! Merci en particulier à Dexus et Narf, à Elsa, Laure, Audrey et Mousse, et à Momo (et CLOCHETTE !!!) pour la dernière ligne droite.

Enfin je remercie ma famille qui m'a toujours encouragée et soutenue : mes parents, ma grand-mère, et Guillaume et Clara toujours au top et d'un soutien sans faille (je parle –un peu– des mitochondries, continuez à lire c'est page 62 ! :D).

Sommaire

LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX.....	6
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	11
I La famille des Fibroblast Growth Factors : activités et modes d'action.....	13
1 - La famille des FGFs	13
1.1 - Généralités	13
1.2 - Structure et activités	13
a) <i>Les FGFs intracrines</i>	15
b) <i>Les FGFs paracrines (et autocrines)</i>	15
c) <i>Les FGFs endocrines</i>	15
2 - Les récepteurs aux FGFs (FGFRs).....	16
2.1 - Récepteurs à haute affinité (FGFRs)	16
a) <i>Structure</i>	16
b) <i>Les voies de signalisation induites par les FGFRs</i>	17
i. <i>Ras/MAPK</i>	17
ii. <i>PI3K/Akt/mTOR</i>	19
iii. <i>PLCy/PKC</i>	19
c) <i>Régulation des FGFRs</i>	19
2.2 - Récepteurs à basse affinité (HSPG)	20
a) <i>Les HSPGs comme co-récepteurs ou récepteurs des FGFs</i>	20
b) <i>Les HSPGs : stockage/protection FGFs à la membrane et dans la MEC</i>	21
3 - Rôles physiologiques et pathologies associées aux FGFs et FGFRs.....	23
3.1 - Rôles physiologiques des FGFs et FGFRs au cours du développement	23
3.2 - Rôles pathologiques des FGFs et FGFRs	23
II Le FGF1 : un facteur de croissance intracellulaire	25
1 - Découverte & généralités.....	25
2 - Structure	27
2.1 - Gène	27
a) <i>Promoteur 1.A</i>	27
b) <i>Promoteur 1B</i>	29
c) <i>Promoteurs 1.C et 1.D</i>	29
2.2 - Protéine	31
a) <i>Structure</i>	31
b) <i>Modifications post-traductionnelles du FGF1</i>	31
i. <i>Méthylation de la Lys132</i>	31
ii. <i>Phosphorylation de la Ser130</i>	33
3 - Activités extracellulaires du FGF1.....	33
3.1 - Mode de sécrétion atypique du FGF1	33
3.2 - Internalisation du FGF1	35
4 - Le FGF1 intracellulaire	36
4.1 - Activités du FGF1	36
a) <i>Développement et différenciation</i>	36

b)	<i>Survie (anti-apoptotique)</i>	37
c)	<i>Mitogénique</i>	38
d)	<i>Oncogénique</i>	38
e)	<i>Modulations transcriptionnelles et traductionnelles induites par le FGF1</i>	39
4.2 -	<i>Partenaires du FGF1</i>	40
a)	<i>Partenaires impliqués dans la sécrétion atypique du FGF1</i>	40
b)	<i>Partenaires impliqués dans le trafic intracellulaire du FGF1</i>	40
c)	<i>Partenaires impliqués dans la régulation des activités du FGF1</i>	41
III	Les facteurs de croissance intracellulaires : modes d'action	43
1 -	Les FGFs intracellulaires	43
1.1 -	Le FGF2.....	43
a)	<i>Le LMW-FGF2 (18 kDa)</i>	44
a)	<i>Les HMW-FGF2 (22, 22,5, 24 et 34 kDa)</i>	44
1.2 -	Le FGF3.....	46
1.3 -	Les FGFs 11 à 14 (FHFf).....	47
2 -	Internalisation des facteurs de croissance et de leurs récepteurs	47
2.1 -	FGFRs	48
2.2 -	NGF et NGFR	50
2.3 -	VEGF et VEGFR	50
2.4 -	EGF et EGFR	51
IV	L'apoptose	55
1 -	Généralités	55
2 -	Les caspases	56
a)	<i>Structure et activation des caspases</i>	57
b)	<i>Substrats des caspases</i>	57
c)	<i>Inhibition des caspases par les IAPs</i>	59
3 -	Voie extrinsèque de l'apoptose	61
3.1 -	Fas	61
3.2 -	TNF	61
4 -	Voie intrinsèque de l'apoptose	62
4.1 -	Apoptosome	63
4.2 -	La famille BCL2 : régulateurs des évènements mitochondriaux.....	64
a)	<i>La sous-famille anti-apoptotique BCL-2</i>	66
b)	<i>La sous-famille pro-apoptotique des effecteurs BAX/BAK</i>	66
c)	<i>La sous-famille pro-apoptotique BH3-only</i>	67
4.3 -	L'apoptose dépendante de p53	68
a)	<i>p53 : découverte et généralités</i>	68
b)	<i>Structure et localisation de p53</i>	69
i.	<i>Région N-terminale : domaines TAD et PRD</i>	70
ii.	<i>Région centrale : domaine DBD</i>	70
iii.	<i>Région C-terminale : domaine TET et séquences régulatrices</i>	70
iv.	<i>Localisation de p53</i>	71
c)	<i>Régulation de p53 : modifications post-traductionnelles</i>	71
i.	<i>Ubiquitination de p53 : rôle de MDM2</i>	72
ii.	<i>Acétylation de p53</i>	73
iii.	<i>Phosphorylation de p53</i>	74
d)	<i>Activités oncosuppressives de p53</i>	75
i.	<i>Induction de l'arrêt du cycle cellulaire</i>	75

ii. Réparation de l'ADN.....	76
iii. Induction de l'apoptose dépendante de p53.....	77
V Les neuroblastomes : modèle d'étude.....	80
1- Généralités.....	80
2- L'apoptose dans les neuroblastomes.....	80
2.1 - L'apoptose induite par les dommages à l'ADN.....	81
2.2 - L'apoptose induite par la production de ROS.....	81
2.3 - L'apoptose induite par les flavonoïdes.....	82
2.4 - L'apoptose induite par la voie extrinsèque	82
2.5 - La modulation des voies d'activation de p53	83
2.6 - Rôle de l'amplification de MYCN	85
2.7 - L'inhibition de la voie de survie PI3K/Akt/mTOR.....	86
3- Neuroblastomes & FGFs	87
4- Les autres facteurs de croissance dans les neuroblastomes	89
VI Projet de recherche	91
1- Travaux précédemment menés dans l'équipe	91
2- Projet de thèse.....	94
RÉSULTATS	97
I Article 1 : Caractérisation des activités neurotrophiques et anti-apoptotiques du FGF1 dans les cellules PC12	99
II Article 2 : Caractérisation des activités anti-apoptotiques du FGF1 dans des modèles de neuroblastomes humain et murin	121
1- Article 2.....	121
2- Rôle de la nucléarisation dans la régulation de l'activité anti-apoptotique du FGF1 dans les cellules SH-SY5Y	151
2.1 - Étude de l'activité anti-apoptotique du FGF1 ^{ΔNLS} dans les cellules SH-SY5Y	151
2.2 - Étude de la localisation subcellulaire des mutants de nucléarisation du FGF1 dans les cellules SH-SY5Y par fractionnement nucléaire	153
III Caractérisation des modulations transcriptionnelles induites par le FGF1 et p53 dans les cellules PC12 par étude transcriptomique (RNA-Seq)	155
1- But et stratégie	155
2- Premiers résultats	156
2.1 - Le FGF1 ^{WT} et l'étoposide induisent les régulations significatives de très nombreux gènes	156
2.2 - La surexpression du FGF1 humain induit l'expression du FGF1 endogène murin.....	158
3- Quels sont les gènes dont l'expression est régulée par le FGF1 et/ou l'étoposide : approche globale et gène-candidat.....	159
3.1 - Approche globale : premières analyses.....	159
a) Méthode	159
b) Validation des résultats par RT-PCR	161
i. Rasip1.....	162
ii. Protéines S100.....	163
iii. Dkk3.....	165
iv. SerpinE1.....	166
3.2 - Approche gène-candidats : premiers résultats.....	173
a) Les facteurs de transcription.....	173

b) Les FGFs, FGFRs et leurs partenaires.....	177
c) La régulation de la survie.....	178
d) La différenciation.....	179
e) La voie de signalisation JAK/STAT.....	181
f) La voie de signalisation Wnt.....	182
g) La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.....	183
h) Le cytosquelette.....	183
i) Le cycle cellulaire.....	185

DISCUSSION..... 189

I Activités intracellulaires des différentes formes mutantes du FGF1..... 191

1 - Les activités intracellulaires du FGF1 ^{WT}	192
2 - La nucléarisation du FGF1 est requise pour son activité anti-apoptotique.....	195
3 - Mutants de nucléarisation.....	196
4 - La mutation K132E inhibe l'activité anti-apoptotique du FGF1.....	198
5 - La phosphorylation du FGF1 inhibe son activité anti-apoptotique.....	199

II Les régulations transcriptionnelles induites par p53 et le FGF1..... 201

1 - Le facteur de transcription EGR-1.....	202
2 - La famille des facteurs de transcription ETS/ETV.....	205
3 - La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.....	206
4 - La voie de signalisation JAK/STAT.....	208
5 - Le complexe transcriptionnel AP-1 (Jun/Fos).....	209
6 - La voie de signalisation Wnt.....	210

III Conclusions et perspectives..... 213

BIBLIOGRAPHIE..... 219

ANNEXES..... 271

I Matériels et méthodes..... 273

1 - Fractionnement cellulaire.....	273
2 - RNA-Seq.....	273
3 - Analyse de l'expression de gènes par RT-PCR.....	274
3.1 - Traitement des cellules et extraction des ARNm.....	274
3.2 - Rétro-transcription et amplification par PCR.....	274
3.3 - Quantification et tests statistiques.....	276

Liste des figures

Figure 1 : Structure des FGFs	14
Figure 2 : Relations évolutives au sein de la famille des gènes <i>Fgfs</i> humains	14
Figure 3 : Structure et mode d'action des FGFRs.....	18
Figure 4 : Voies de signalisation induites par les FGFRs	18
Figure 5 : Du gène <i>FGF1</i> humain à la protéine.....	26
Figure 6 : Régulation du promoteur 1.B du gène <i>FGF1</i>	28
Figure 7 : Structure et sites remarquables de la protéine <i>FGF1</i>	30
Figure 8 : Sécrétion atypique du <i>FGF1</i>	32
Figure 9 : Le <i>FGF1</i> est phosphorylé par la <i>PKCδ</i>	34
Figure 10 : Modes d'action du <i>FGF1</i>	34
Figure 11 : Isoformes du <i>FGF2</i>	42
Figure 12 : Activités des isoformes du <i>FGF2</i>	45
Figure 13 : Un équilibre dynamique entre <i>FGFR1</i> , <i>CBP</i> et <i>RSK1</i>	49
Figure 14 : Modèle d'internalisation et nucléarisation du complexe <i>EGF-EGFR</i>	52
Figure 15 : Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.....	54
Figure 16 : Structure des caspases.....	58
Figure 17 : Activation protéolytique des caspases	58
Figure 18 : Structure des IAPs	60
Figure 19 : Les complexes activateurs de la voie extrinsèque de l'apoptose (<i>DISCs</i>).....	62
Figure 20 : Formation de l'apoptosome	63
Figure 21 : La famille <i>BCL-2</i>	65
Figure 22 : Les régulations au sein de la famille <i>BCL-2</i>	65
Figure 23 : Activités de <i>p53</i>	69
Figure 24 : Structure de la protéine <i>p53</i>	70
Figure 25 : Modifications post-traductionnelles de la protéine <i>p53</i>	72
Figure 26 : Régulation négative de <i>p53</i> par <i>MDM2</i>	73
Figure 27 : Induction de l'arrêt du cycle cellulaire par <i>p53</i>	76
Figure 28 : Mécanismes d'activation de <i>p53</i> et de régulation de ses cibles transcriptionnelles	79
Figure 29 : Le <i>FGF1</i> intracellulaire a une activité anti-apoptotique dans les cellules <i>RetsAF</i>	93
Figure 30 : La nucléarisation du <i>FGF1</i> est requise pour son activité anti-apoptotique dans les cellules <i>PC12</i>	93
Figure 31 : Activités intracellulaires et localisation du <i>FGF1</i> et de ses formes mutantes	101
Figure 32 : Le <i>FGF1</i> ^{ΔNLS} ne protège pas les cellules <i>SH-SY5Y</i> de l'apoptose dépendante de <i>p53</i>	152
Figure 33 : Étude de l'expression et de la localisation subcellulaire du <i>FGF1</i> ^{WT} et des mutants de nucléarisation dans les cellules <i>SH-SY5Y</i>	153
Figure 34 : Conditions et analyses différentielles réalisées.....	155
Figure 35 : L'ajout d'étoposide induit une diminution du nombre de gènes non exprimés et une augmentation du nombre de gènes faiblement exprimés	157
Figure 36 : La surexpression du <i>FGF1</i> humain induit l'expression du <i>FGF1</i> endogène murin.....	158
Figure 37 : Recherche des gènes négativement régulés par le <i>FGF1</i> en présence d'étoposide.....	160
Figure 38 : Recherche des gènes positivement régulés par le <i>FGF1</i> en présence d'étoposide.....	160
Figure 39 : Analyse par RT-PCR de l'expression de <i>Rasip1</i>	163

Figure 40 : Analyse par RT-PCR de l'expression de <i>S100A4</i> et <i>S100A6</i>	164
Figure 41 : Analyse par RT-PCR de l'expression de <i>Dkk3</i>	165
Figure 42 : Analyse par RT-PCR de l'expression de <i>SerpinE1</i>	167
Figure 43 : Analyse par RT-PCR de l'expression d' <i>Etv1</i>	174
Figure 44 : Analyse par RT-PCR de l'expression de <i>c-Jun</i>	175
Figure 45 : Analyse par RT-PCR de l'expression d' <i>Id1</i>	177
Figure 46 : Analyse par RT-PCR de l'expression de <i>GAP43</i> et <i>NF-160 kDa</i>	180
Figure 47 : Analyse par RT-PCR de l'expression de <i>JAK1</i>	182
Figure 48 : Analyse par RT-PCR de l'expression d' <i>Anxa1</i>	185
Figure 49 : Modifications transcriptionnelles des acteurs du cycle cellulaire	186
Figure 50 : Conditions et analyses différentielles réalisées	201

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effets de l'inactivation des gènes <i>Fgfs</i> et <i>Fgfrs</i> sur le développement de la souris.....	22
Tableau 2 : Pathologies associées aux altérations perte ou gain de fonction, ou à la surexpression des gènes <i>FGFs</i> et <i>FGFRs</i> chez l'Homme.....	24
Tableau 3 : Le FGF1 ^{WT} et l'étoposide induisent les régulations significatives de nombreux gènes....	157
Tableau 4 : Résultats du RNA-Seq pour une sélection de gènes	172

Liste des abréviations

#

4-HPR : 4-hydroxy(phenyl)retinamide

A

aFGF : acidic-FGF, FGF1

AP-1 : Activator Protein-1

AP-2 α : Activator Protein 2 α

APAF-1 : Apoptotic Protease-Activating Factor 1

APC : Adenomatosis Polyposis Coli

APG : Apigénine

ARF : Alternative Reading Frame

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3 related

B

BAG3 : BCL-2-Associated athanogene 3

BAK : BCL-2 antagonist or Killer

BAX : BCL-2-associated X protein

BCL-2 : B-Cell Lymphoma 2 protein

BCRP : Breast Cancer Resistant Protein

BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

bFGF : basic-FGF, FGF2

BH3 : BCL-2 Homology 3

BID : BH3 Interacting-Domain death agonist

BIR : Baculoviral IAP Repeat

BOK : BCL-2-related Ovarian Killer

BTF3 : Basic Transcription Factor 3

C

CAD : Caspase-3-Activated DNase

CARD : Caspase-Recruitment Domain

Caspase : Cysteine-ASPartic proteASE

Ca_v : canal calcique voltage-dépendant

CBL : Casitas B-lineage Lymphoma

CDK : Kinase Cycline-Dépendante

CEP57 : Centrosomal Protein of 57 kDa

CHK1/2 : Checkpoint Kinase 1/2

c-IAP1 : Cellular Inhibitor of Apoptosis 1

CK1/2 : Casein Kinase 1/2

COPI : Coat Protein I

CPN : complexe de pore nucléaire

CREB : cAMP Responsive Element Binding protein

D

$\Delta\psi_m$: potentiel de la membrane mitochondriale externe

DAG : diacylglycérol

DBD : DNA Binding Domain

DDB2 : DNA Damage Binding protein 2

DED : Death Effector Domain

DIABLO : Direct IAP-Binding protein with LOW PI

DISC : Death-Inducing Signaling Complex

Dkk3 : Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3

DNA-PK : DNA-dependent Protein Kinase

DR : Death Receptor

E

EBP2 : EBNA1-binding protein 2

EGC : Epigallocatechine

EGCG : Epigallocatechin-3-gallate

EGF : epidermal growth factor

EGL : Egg Laying Defective

EGR : Early Growth Response

eIF : Eukaryotic translation Initiation Factor

ERC : Endocytic Recycling Compartment

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases

ETS : E26-Transformation Specific

Etv1 : Ets Variant 1

F

FADD : Fas-Associated Death Domain factor

FC : Fold Change

FGF : Fibroblast Growth Factor

FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor

FHF : Fibroblast growth factor homologous factor

FIBP : FGF1 intracellular-binding protein

FIF : FGF2 Interacting Factor

FLIP : FLICE Inhibitory Protein

FRS2 : FGFR Substrate 2

G

GAB1 : GRB2-associated-binding protein 1

GADD45 : Growth Arrest and DNA Damage 45

GAG : glycosaminoglycane

GAP43 : Growth Associated Protein 43
GRB2 : Growth Factor Receptor-Bound 2
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3
GST : Génistéine

H

HB-EGF : Heparin Binding-Epidermal Growth Factor
HDAC : Histone DésACétylase
HDAC : histones désacétylases
hFGF : hormone-like FGF
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HIF-1 α : Hypoxia-Induced Factor 1 α
HMW-FGF2 : FGF2 de haut poids moléculaire
hnRNPM : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
HR : Homologous Recombination
HSPG : protéoglycane à sulfate d'héparane
HtrA2 : High-Temperature Requirement A2

I

IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein
IB2 : Islet-Brain 2
ICAD : Inhibitor of Caspase-Activated DNase
Id-1 : Inhibitor of differentiation-1 ou Inhibitor of DNA Binding-1
iFGFs : FGFs intracellulaires/intracrines
IGFR : Insulin-like Growth Factor Receptor
IL-22 : Interleukine 22
IL22RA2 : Interleukin-22 Receptor subunit Alpha-2
iNOS : inducible NO Synthase
IP₃ : inositol 1,4,5-triphosphate
IRES : Internal Ribosome Entry Site

J

JAK : Janus Kinase
JIP2 : JNK-interacting protein 2
JNK : c-Jun N-terminal Kinases

K

kb : kilobase
kDa : kilo-Dalton

L

LDL : Low-density lipoprotein
L-DNase II : LEI-derived DNase II
LEI : Leukocyte Elastase Inhibitor

LET : lethal
LMW-FGF2 : FGF2 de faible poids moléculaire
LOH : Loss Of Heterozygosity
LRP : Lipoprotein Receptor-related Protein
LRRC59 : Leucine-Rich Repeat Containing 59

M

MAPK : Mitogen Associated Protein Kinase
MDM2 : Mouse Double Minute 2
MEC : matrice extra-cellulaire
MEK : MAPKK
miRNA : micro ARN
MLH1 : MutL Homolog 1
MMR : MisMatch Repair
MNE : Membrane nucléaire externe
MNI : membrane nucléaire interne
MPP⁺ : 1-methyl-4-phenylpyridinium
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

N

Na_v : canal sodique voltage-dépendant
NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule
NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule
NER : Nucleotide Excision Repair
NES : Nuclear export signal
NF : Neurofilament
NFATc : Nuclear Factor of Activated T-cells
NF- κ B : Nuclear Factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells
NGF : Nerve growth factor
NLS : Nuclear localization signal
NO : monoxyde d'azote
NoBP : Nucleolar Binding Protein
NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain
NOS1 : Nitric Oxide Synthase 1

O

ORF : Open Reading Frame

P

p75NTR : p75 Neurotrophin Receptor
PARP : Poly ADP Ribose Polymerase
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PDK : Phosphoinositide-Dependent Kinase
PGF : Placenta Growth Factor
PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP₃ : phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PKC : protéine kinase C
PLC γ : Phospholipase C γ
PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate
PMS2 : PostMeiotic Segregation increased 2
PRD : Proline Rich Domain
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PUMA : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis

R

Ras : Rat sarcoma
Rasip1 : Ras Interacting Protein 1
rFGF1 : FGF1 recombinant extracellulaire
RFX : Regulatory Factor protein of the X-box
RING : Really Interesting New Gene
RIPK1 : Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1
ROS : espèces réactives de l'oxygène
RPS19 : Ribosomal Protein S19
rpS2 : Ribosomal Protein S2
RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

S

S100A10 : S100 calcium-binding protein A10
SerpinE1 : SERine Proteinase INhibitor E1
S100A4 : S100 calcium-binding protein A4
S100A6 : S100 calcium-binding protein A6
SF3a66 : Splicing factor 3a sous-unité 66 kDa
Smac : Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
SMN : Survival of motoneuron protein
SNC : système nerveux central
SOS : Son Of Sevenless
SP1 : Specificity Protein 1
SphK1 : sphingosine kinase 1
SPRY : Sprouty
SRE : Serum Response Element
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
Syt1 : synaptotagmine-1

T

TA : Transcriptionally Active
TAD : Transcriptional Activation Domain
TAM : Tumor-Associated Macrophages

TAP : Tandem Affinity Purification
TGF- β : Transforming Growth Factor β
TH : tyrosine hydroxylase
Thy1 : THYmocyte differentiation antigen 1
TK : tyrosine kinase
TNF : Tumor Necrosis Factor
TPA : Tetradecanoyl Phorbol Acetate, ou PMA
TRADD : TNF-R-Associated Death Domain protein
TRAF2 : TNF Receptor-Associated Factor 2
TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TrkA : Tropomyosine Receptor Kinase A
TUBB3 : neuron-specific class III β -tubulin
TYK2 : Tyrosine Kinase 2

U

UBF : Upstream Binding Factor
UTR : UnTranslated Region
UV : ultraviolets

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

X

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

Introduction

I La famille des Fibroblast Growth Factors : activités et modes d'action

1 - La famille des FGFs

1.1 - Généralités

La famille des Fibroblast Growth Factors (FGFs) regroupe des gènes conservés depuis les invertébrés jusqu'aux vertébrés, et exprimés chez tous les organismes pluricellulaires. Les premiers à avoir été identifiés sont les *FGF1* et *FGF2*, purifiés à partir d'extraits de glande pituitaire et montrant des propriétés mitogéniques (Armelin, 1973; Gospodarowicz *et al.*, 1974). Chez les mammifères, cette famille comprend désormais 22 membres appelés *FGF1-23* (le *FGF19* humain étant l'orthologue du *Fgf15* murin) (Itoh and Ornitz, 2008). Ils possèdent des activités biologiques variées impliquées dans des processus développementaux ou métaboliques.

Il existe deux *FGFs* chez *C. elegans* : *let-756* (*let*, lethal) essentiel au développement du nématode, et *egl-17* (*egl*, egg-laying defective) requis pour la migration des myoblastes sexuels (Burdine *et al.*, 1997; Roubin *et al.*, 1999). Trois homologues ont été identifiés chez *D. melanogaster* : *branchless*, impliqué dans la migration cellulaire et la ramification de la trachée, et *thisbe* et *pyramus* impliqués dans le développement (Stathopoulos *et al.*, 2004; Sutherland *et al.*, 1996). Au cours de l'évolution, des évènements supplémentaires de duplication du génome chez le poisson-zèbre *Danio rerio* portent le nombre de *FGFs* à 27 chez cet organisme, comprenant 21 homologues humains (tous excepté le *FGF9*), et 6 paralogues (Itoh, 2007).

Les FGFs agissent pour la plupart *via* leurs récepteurs (FGFRs). Selon la combinaison ligand-récepteur, différentes voies de signalisation seront activées et interviendront dans une multitude de processus, par exemple au cours de l'embryogenèse, l'angiogenèse, la prolifération et la survie cellulaires, la différenciation ou encore la migration. Du fait de cette implication dans des processus fondamentaux, de nombreuses pathologies sont associées à des niveaux protéiques anormaux ou à des mutations des FGFs ou de leurs récepteurs. Ils sont notamment souvent associés à plusieurs types de cancer ou à des défauts de développement (Ornitz and Itoh, 2015).

1.2 - Structure et activités

Les FGFs sont de petites protéines de ≈150-300 acides aminés, partageant un domaine central commun de ≈120 acides aminés présentant de 30 à 60% d'identité (Itoh and Ornitz, 2004) (**Figure 1**). Chez les mammifères, des analyses phylogénétiques ont montré que les 22 gènes *FGF* pouvaient être regroupés en 7 sous-familles contenant chacune de 2 à 4 membres. Itoh et Ornitz regroupent ces sous-familles selon leur mode d'action : **intracrine**, **paracrine** et **endocrine** (**Figure 2**) (Itoh and Ornitz, 2011).

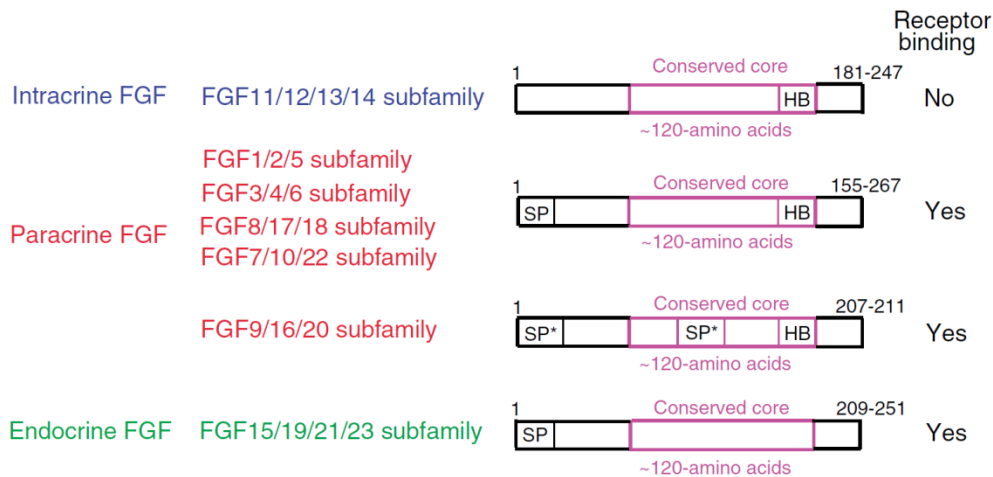


Figure 1 : Structure des FGFs

Les FGFs possèdent ou non un peptide signal clivable (SP), ou non clivable bipartite (SP*) et un domaine de liaison à l'héparine (HB). À noter que les FGF1 et 2 ne possèdent pas de peptide signal de sécrétion, à l'inverse des autres FGFs paracrines. Issu de (Itoh and Ornitz, 2011).

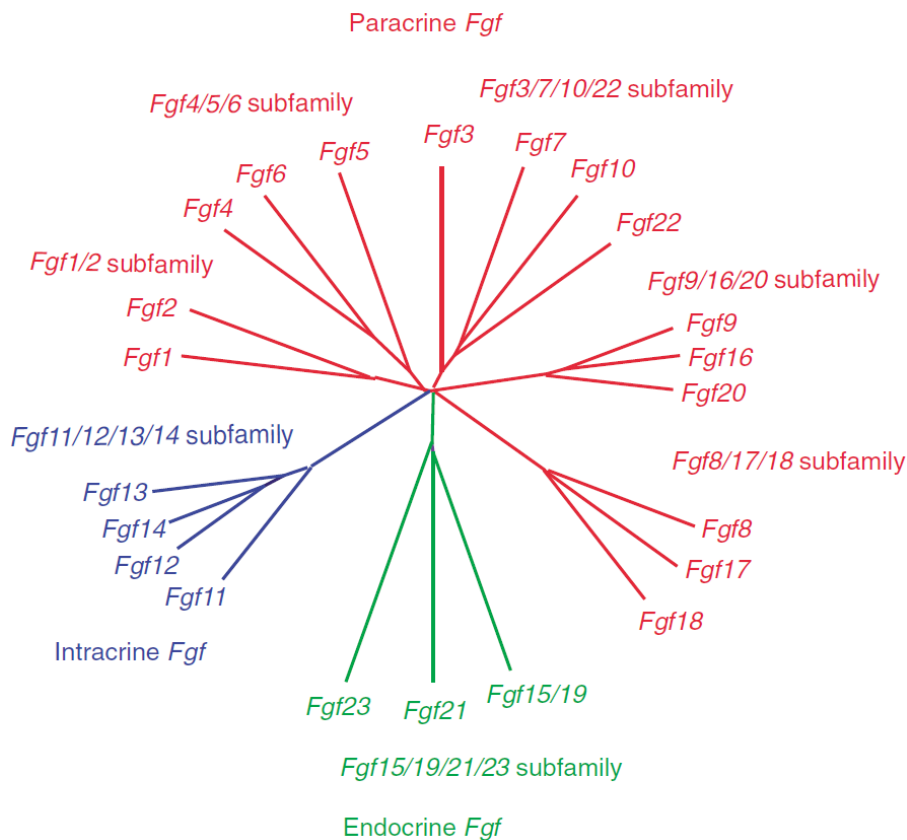


Figure 2 : Relations évolutives au sein de la famille des gènes *Fgfs* humains

Les *Fgfs* sont classifiés en 7 sous-familles de 2 à 4 membres chacune, et regroupés en trois classes selon leurs distances évolutives et leur mode d'action. Issu de (Itoh and Ornitz, 2011).

a) Les FGFs intracrines

Ce groupe comprend les FGFs 11, 12, 13 et 14. Ils sont aussi appelés FGFs intracellulaires (iFGFs) ou Fibroblast growth factor homologous factors (FHF). Ces FGFs possèdent un domaine de liaison à l'héparine mais pas de séquence signal de sécrétion. Ils ne sont pas sécrétés à l'extérieur de la cellule et aucune interaction avec les FGFRs n'a pu être démontrée à ce jour. Ils interagissent avec les domaines intracellulaires des canaux sodiques voltage-dépendant, ce qui participerait à la régulation de la localisation subcellulaire de ces canaux dans les axones lors du développement, et à la régulation de l'activité de ces canaux dans les neurones matures et autres cellules excitables comme les cardiomyocytes (Goldfarb *et al.*, 2007; Lou *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2013). Il a également été montré que le FGF13 interagit avec les microtubules pour les stabiliser et réguler la polarisation et la migration axonale (Wu *et al.*, 2012), et que le FGF12 interagit avec la protéine d'échafaudage des MAPKs Islet-Brain 2 (IB2, ou JIP2 pour JNK-interacting protein 2) et régule ainsi l'activation de la MAPK p38 α (Schoorlemmer, 2002).

b) Les FGFs paracrines (et autocrines)

Les FGFs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 20 et 22 forment le groupe des FGFs paracrines, aussi appelés FGFs canoniques, capables de lier les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) qui peuvent servir de co-récepteurs et faciliter leur liaison aux FGFRs. La majorité possède un peptide signal clivable à leur extrémité N-terminale. Les FGFs 9, 16 et 20 possèdent eux une séquence signal de sécrétion bipartite non clivée. Ces FGFs peuvent agir *via* les FGFRs de façon paracrine sur des cellules proches, ou de façon autocrine sur les cellules productrices.

Il est à noter que bien qu'étant historiquement classés dans ce groupe, les FGFs 1 et 2 ne possèdent pas de séquence signal de sécrétion mais peuvent être relargués dans le milieu extracellulaire par des cellules endommagées, ou sécrétés de façon atypique – indépendamment de la voie RE-Golgi – dans des conditions de stress cellulaire (voir II.3.1). Il a également été montré que les FGFs 1, 2 et 3 peuvent agir de façon intracrine et être transloqués dans le noyau des cellules (Antoine *et al.*, 1997; Förthmann *et al.*, 2015; Imamura *et al.*, 1990).

c) Les FGFs endocrines

Les FGFs 15/19 (respectivement murin ou humain), 21 et 23 sont également appelés hormone-like FGFs (hFGFs) et agissent de façon endocrine *via* les FGFRs sur des cellules éloignées, en passant par la circulation sanguine. Contrairement aux autres FGFs, ils ne possèdent pas de domaine de liaison à l'héparine pour laquelle ils ont une affinité extrêmement faible et utilisent les protéines de la famille Klotho comme co-récepteurs. Le FGF15/19 régule l'homéostasie de l'acide biliaire et est

impliqué dans le métabolisme des glucides (Potthoff *et al.*, 2012), le FGF21 induit une sensibilisation à l'insuline (Kharitonov *et al.*, 2005), et le FGF23 est impliqué dans l'homéostasie du phosphate (Yu and White, 2005).

2 - Les récepteurs aux FGFs (FGFRs)

Il existe deux types de récepteurs aux FGFs : les récepteurs de haute affinité (FGFRs), et les récepteurs de basse affinité que sont les HSPGs. Les FGFs peuvent, grâce à leur domaine de liaison à l'héparine, se lier aux HSPGs indépendamment des FGFRs ou bien les utiliser comme co-récepteurs pour faciliter leur liaison aux FGFRs.

2.1 - Récepteurs à haute affinité (FGFRs)

Quatre gènes *Fgfr* ont été identifiés chez les mammifères : les *FGFR1-4* (Itoh and Ornitz, 2004). Ils sont les acteurs majeurs de la signalisation des FGFs sécrétés.

a) Structure

Les FGFRs sont des récepteurs transmembranaires à domaine tyrosine kinase (TK). Ils contiennent :

- **de deux à trois domaines immunoglobulin-like (I, II et III)** (Zhang *et al.*, 2006). La boucle II contient le domaine de liaison à l'héparine/HSPG (Powers *et al.*, 2000). Par épissage alternatif, les *Fgfr1-3* codent pour deux versions majeures de la partie C-terminale du domaine immunoglobulin-like III (IIIb et IIIc). Ce domaine est déterminant pour la spécificité de l'interaction ligand-récepteur (Johnson *et al.*, 1991; Miki *et al.*, 1992). Il y a donc 7 formes majoritaires de FGFRs générées à partir de 4 gènes (FGFRs 1b, 1c, 2b, 2c, 3b, 3c et 4), qui ont chacune des affinités différentes pour les FGFs. Il est à noter que le FGF1 est l'unique FGF à pouvoir se lier et activer tous les FGFRs.
- **un domaine transmembranaire**
- **un domaine TK intracellulaire bipartite**. Le domaine TK est interrompu par un insert, séparant TK1 et TK2. Cette structure est similaire à celle des récepteurs au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) (Wesche *et al.*, 2011). Sept sites d'autophosphorylation y sont décrits et peuvent servir de sites d'amarrage pour des messagers intracellulaires possédant des domaines SH2 (Src homology 2) (Wesche *et al.*, 2011). On peut noter parmi ces sites la tyrosine 766 du FGFR1, localisée à l'extrémité C-terminale du récepteur et requise pour la transduction du signal *via* son interaction avec la phospholipase C γ (PLC γ) (Mohammadi *et al.*, 1991; Shi *et al.*, 1993). La Tyr766 est très

conservée parmi les quatre FGFRs et correspond à la Tyr769 pour le FGFR2 (Itoh *et al.*, 1994), la Tyr760 pour le FGFR3 (Kanai *et al.*, 1997) et la Tyr760 pour le FGFR4 (van Heumen *et al.*, 1999).

Un cinquième FGFR atypique a été découvert en 2000 : FGFR1/FGFR5 (Wiedemann and Trueb, 2000). Ses domaines extracellulaire et transmembranaire sont structurellement identiques aux autres FGFRs, mais sa région intracellulaire très courte est dépourvu de domaine TK. Des expériences de FRET n'ont pas pu montrer d'interaction avec les autres FGFRs, avec lesquels il semble incapable de se dimériser (Rieckmann *et al.*, 2008). De ce fait, il semblerait qu'il agisse comme un leurre pour les FGFs vis-à-vis des autres FGFRs (Trueb, 2011).

b) Les voies de signalisation induites par les FGFRs

La dimérisation du complexe ternaire FGF/FGFR/HSPG induit une modification de la conformation du FGFR qui conduit à la transactivation par phosphorylation du domaine TK intracellulaire (**Figure 3**). Les activités biologiques induites vont dépendre du type de FGF, de FGFR et de messagers intracellulaires recrutés. Deux substrats principaux permettent la transduction du signal : le FGFR substrate 2 (FRS2) et la phospholipase C γ (PLC γ).

La protéine FRS2 est constitutivement liée au domaine cytosolique du FGFR, à proximité de la membrane, et est phosphorylée lors de l'activation du récepteur. Elle peut alors recruter et s'associer à la protéine adaptatrice Growth Factor Receptor-Bound 2 (GRB2). Ce complexe activateur permet ensuite l'activation des voies de signalisation Ras (Rat sarcoma)/MAPK (Mitogen Associated Protein Kinase) et PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt/mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (**Figure 4**) (Dailey *et al.*, 2005; Eswarakumar *et al.*, 2005; Wesche *et al.*, 2011).

PLC γ se lie à la phosphotyrosine 766 du FGFR activé, indépendamment du complexe FRS2 et active la protéine kinase C (PKC) (Mohammadi *et al.*, 1991).

i. Ras/MAPK

Suite à l'activation du FGFR et à la formation du complexe FRS2-GRB2, ce dernier recrute le facteur d'échange nucléotidique Son Of Sevenless (SOS) qui conduit à l'activation de la petite GTPase Ras, et ainsi de la cascade des MAPKs. L'activation de cette voie par les FGFRs joue un rôle dans la prolifération cellulaire, la différenciation, l'invasion tumorale et le potentiel métastatique (Dailey *et al.*, 2005; Raju *et al.*, 2014; Tsang and Dawid, 2004).

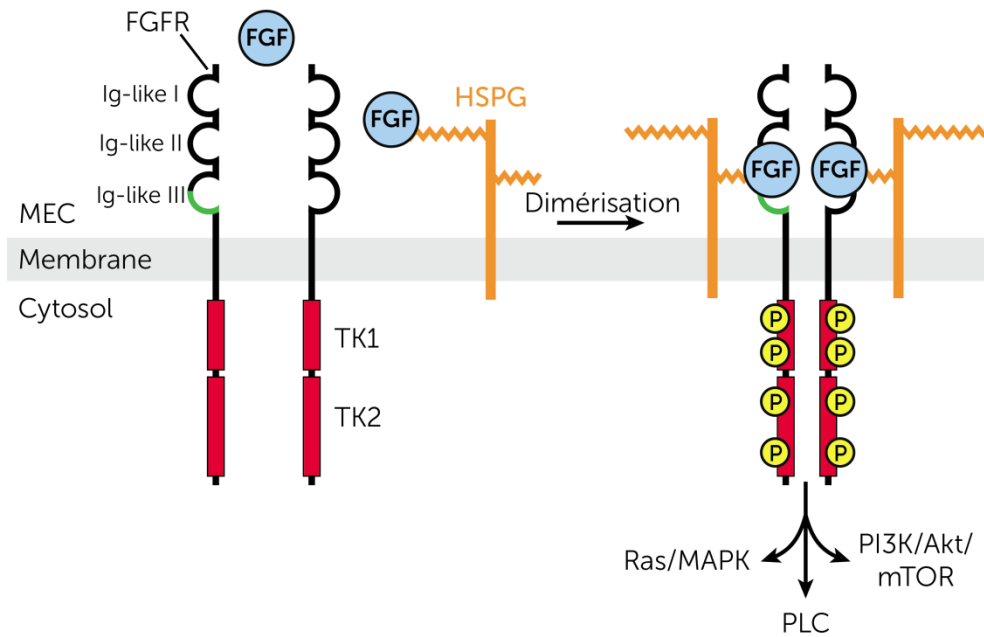


Figure 3 : Structure et mode d'action des FGFRs

Les FGFRs sont constitués de trois domaines Ig-like, un domaine transmembranaire et un domaine TK intracellulaire bipartite (TK1 et TK2) scindé par un insert. La liaison du FGF avec son co-récepteur HSPG induit la dimérisation et la transactivation des récepteurs puis l'activation de voies de signalisation. D'après (Wesche *et al.*, 2011).

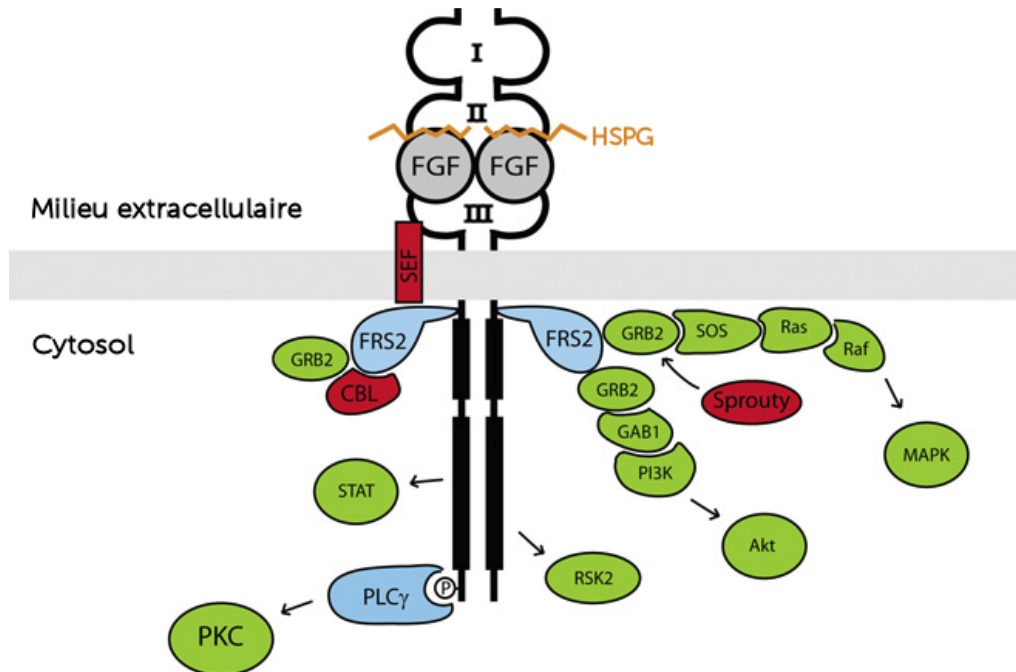


Figure 4 : Voies de signalisation induites par les FGFRs

L'activation des FGFRs par la liaison du FGF et des HSPGs (orange) induit plusieurs cascades de signalisation. FRS2 et PLC γ (en bleu) sont les deux substrats principaux qui se lient directement aux FGFRs. FRS2 est phosphorylé et induit deux voies de signalisation : Ras/MAPK et PI3K/Akt/mTOR. PLC γ se lie à la phosphotyrosine de l'extrémité C-terminale du récepteur, et son recrutement permet l'activation de la protéine kinase C (PKC). Des régulateurs négatifs (en rouge), comme notamment Sprouty, interviennent aussi dans cette signalisation. Adapté de (Wesche *et al.*, 2011)

ii. PI3K/Akt/mTOR

Le recrutement de la protéine adaptatrice GAB1 (GRB2-associated-binding protein 1) par le complexe FRS2 permet l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR. Cette voie régule de nombreux processus comme la croissance, la survie, la prolifération ou la migration cellulaires (Dailey *et al.*, 2005; Turner and Grose, 2010; Wesche *et al.*, 2011).

iii. PLC γ /PKC

Contrairement aux deux voies précédentes, l'activation de la voie PLC γ /PKC ne met pas en jeu le complexe FRS2. La protéine PLC γ se lie à la phosphotyrosine 766 de l'extrémité C-terminale du FGFR activé et hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) pour produire du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). Cela déclenche le relargage d'ions Ca²⁺ et l'activation de la PKC (Mohammadi *et al.*, 1991; Ornitz and Itoh, 2015; Wesche *et al.*, 2011). Cette voie de signalisation est impliquée dans un grand nombre de mécanismes, notamment dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Choi *et al.*, 2007; Dailey *et al.*, 2005; Powers *et al.*, 2000).

Ces différentes voies peuvent interagir entre elles. Par exemple, la PKC activée peut phosphoryler et activer Raf, ce qui renforce l'activation de la voie Ras/MAPK (Sözeri *et al.*, 1992).

c) Régulation des FGFRs

Sprouty (SPRY) est un régulateur intracellulaire négatif des récepteurs TK, incluant les FGFRs ou les récepteurs au VEGF, PDGF et NGF (Nerve growth factor). La famille SPRY comprend quatre membres : SPRY1-4. La plupart des gènes *Spry* sont exprimés ubiquitairement dans les tissus embryonnaires et adultes. Dans la signalisation du FGF, Sprouty1 et Sprouty2 interagissent avec GRB2 pour inhiber la voie Ras/MPAK en bloquant le recrutement de SOS (Hanafusa *et al.*, 2002). Sprouty2 inhibe la voie PI3K/Akt/mTOR en activant le suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and tensin homolog) (Edwin *et al.*, 2006; Stambolic *et al.*, 1998).

SEF (Similar Expression to FGF) est une protéine transmembranaire capable d'interagir directement avec le FGFR pour inhiber la phosphorylation du récepteur. SEF peut également jouer un rôle d'antagoniste de la voie Ras-MAPK en bloquant la translocation nucléaire des MAPK activées (Kovalenko *et al.*, 2006; Torii *et al.*, 2004).

CBL (Casitas B-lineage Lymphoma), une ubiquitine-ligase E3, forme un complexe avec la forme phosphorylée de FRS2 et GRB2, et induit ainsi l'ubiquitination et la dégradation du FGFR et de FRS2 en réponse à une stimulation par le FGF. L'activation du FGFR2 peut également augmenter les

interactions entre CBL et PI3K et mener à la dégradation de PI3K et donc à la diminution de sa signalisation (Dufour *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2002).

2.2 - Récepteurs à basse affinité (HSPG)

Les HSPGs (Héparanes Sulfates Protéoglycanes) sont les récepteurs/co-récepteurs les plus décrits des FGFs. Ce sont des glycoprotéines contenant une ou plusieurs chaînes d'héparane sulfate, un type de glycosaminoglycane (GAG). Les FGFs se lient aux HSPGs chargés négativement *via* des interactions électrostatiques (Jackson *et al.*, 1991; Wesche *et al.*, 2011).

Les HSPGs peuvent être classifiés en trois groupes (Dreyfuss *et al.*, 2009; Sarrazin *et al.*, 2011) :

- **les HSPGs liés à la membrane** : syndécane 1-4, glypicane 1-6, betaglycane, neuropiline-1. Ils coopèrent avec les intégrines et d'autres récepteurs d'adhésion cellulaire pour faciliter l'adhésion cellule-matrice extracellulaire (MEC), les interactions cellule-cellule et la mobilité cellulaire. Ils agissent également comme récepteurs endocytiques pour le recyclage de ligands, notamment dans le métabolisme hépatique des lipoprotéines. Enfin, ils agissent comme co-récepteurs pour de nombreux récepteurs de facteurs de croissance à domaine tyrosine-kinase (FGFs, VEGFs...) en abaissant leur seuil d'activation.
- **les HSPGs associés aux vésicules de sécrétion** dont le plus notable est la serglycine. Elle est impliquée dans la régulation de différents processus post-sécrétion comme la coagulation, la défense de l'hôte ou la cicatrisation, ou encore le maintien de protéases comme la tryptase dans un état actif (Kolset and Tveit, 2008; Sommerhoff *et al.*, 1999).
- **les HSPGs de la matrice extracellulaire** : perlécane, agrine, testicane 1-3 et collagène XVIII peuvent moduler l'activité des facteurs de croissance, cytokines, morphogènes et enzymes.

a) Les HSPGs comme co-récepteurs ou récepteurs des FGFs

Bien que les FGFs soient capables de se lier aux FGFRs en absence de HSPGs, leur interaction avec les HSPGs stabilise le complexe FGF/FGFR (Duchesne *et al.*, 2006; Nugent and Edelman, 1992; Pantoliano *et al.*, 1994) et aboutit à une signalisation prolongée, requise pour les activités biologiques induites, comme par exemple la mitogénicité (Delehedde *et al.*, 2000; Rapraeger *et al.*, 1991). Ce modèle général a été étendu à de nombreux autres facteurs de croissance, comme le VEGF, le HGF (Hepatocyte Growth Factor), le PDGF, le PGF (Placenta Growth Factor) ou le HB-EGF (Heparin Binding-Epidermal Growth Factor) (Dreyfuss *et al.*, 2009).

Les HSPGs peuvent également agir indépendamment des FGFRs comme récepteurs. Quarto et Amalric ont utilisé une lignée de myoblastes dépourvue de FGFRs pour montrer une implication

directe du syndécanne dans l'internalisation du FGF2 et la réponse cellulaire en découlant. Cette signalisation cellulaire est indépendante et distincte des FGFRs (Quarto and Amalric, 1994).

b) Les HSPGs : stockage/protection FGFs à la membrane et dans la MEC

Les HSPGs localisés à la membrane plasmique ou dans la MEC peuvent également interagir avec les FGFs et d'autres facteurs de croissance indépendamment des FGFRs et ainsi les stocker à la surface de la cellule et inhiber leur dégradation par les protéases (Nugent and Iozzo, 2000; Saksela *et al.*, 1988).

Gène invalidé	Viabilité	Phénotype du KO
Fgf		
Fgf1	Viable	Diabète agressif et développement adipeux aberrant lors de régimes riches en matières grasses
Fgf2	Viable	Défauts cardiovasculaires, neuronaux, squelettiques, cicatrisation
Fgf3	Viable	Défauts de développement cardiaque, squelettique et de l'oreille interne
Fgf4	Létal (embryon 4-5 jours)	Défauts de formation du blastocyste et des bourgeons de membres
Fgf5	Viable	Altération du développement des follicules pileux (phénotype angora)
Fgf6	Viable	Défauts de régénération et développement musculaires
Fgf7	Viable	Défauts du développement des follicules pileux, de la synaptogenèse, de l'uretère, de la régénération du thymus et de la cicatrisation
Fgf8	Létal (embryon 7 jours)	Défauts de la gastrulation, du développement des membres et nombreux organes
Fgf9	Létal (naissance)	Défauts de développement des poumons, gonades, du cœur, squelette, oreille interne et intestins, agénésie des reins
Fgf10	Létal (naissance)	Défauts de développement de nombreux organes
Fgf11	Viable	Aucun phénotype apparent (données non publiées)
Fgf12	Viable	Ataxie sévère et motricité réduite
Fgf13	Viable	Défauts migration neuronale, mémoire et apprentissage
Fgf14	Viable	Ataxie sévère, motricité réduite, défauts de mémoire et apprentissage, excitabilité neuronale altérée
Fgf15	Létal (embryon 13,5 jours à 7 jours post-naissance)	Défaut de développement cardiaque, neurogenèse et métabolisme de l'acide biliaire altérés, défaut de régénération hépatique
Fgf16	Viable	Défaut de développement cardiaque
Fgf17	Viable	Défauts de développement du cervelet et cortex frontal
Fgf18	Létal (naissance)	Défauts de développement du SNC, squelette, palais et poumons
Fgf20	Viable	Défauts de développement des dents, de la cochlée et agénésie des reins
Fgf21	Viable	Altérations du métabolisme énergétique et lipidique
Fgf22	Viable	Altérations de la synaptogenèse
Fgf23	Létal (4-13 semaines post-naissance)	Surdité, défaut de développement de l'oreille moyenne, altérations de l'homéostasie du phosphate et de la vitamine D
Fgfr		
Fgfr1	Létal (embryon 7,5-9,5 jours)	Développement aberrant, altérations gastrulation et blastocyste
Fgfr2	Létal (embryon 10-11 jours)	Défaut de formation du placenta, absence de bourgeons de membres
Fgfr3	Viable	Dysplasie osseuse, altérations de l'oreille interne, cerveau, cartilage articulaire, pancréas, différenciation oligodendrocytes
Fgfr4	Viable	Altérations du métabolisme du cholestérol et de la synthèse de l'acide biliaire
Fgfr11	Létal (naissance)	Défauts de développement des reins, diaphragme et squelette

Tableau 1 : Effets de l'inactivation des gènes *Fgfs* et *Fgfrs* sur le développement de la souris

D'après (Ornitz and Itoh, 2015)

3 - Rôles physiologiques et pathologies associées aux FGFs et FGFRs

3.1 - Rôles physiologiques des FGFs et FGFRs au cours du développement

Les FGFs et leurs récepteurs régulent une grande diversité de processus au cours du développement, comme l'établissement de l'axe dorso-ventral, la morphogenèse, la différenciation neuronale ou encore l'ostéogenèse (Thisse and Thisse, 2005). Pour préciser les activités biologiques des FGFs et de leurs récepteurs, de nombreuses études ont caractérisé les effets de la perte de fonction des *Fgfs* et *Fgfrs* par *knock-out* chez la souris. Ils sont résumés dans le **Tableau 1**.

On peut noter que la perte de fonction totale de certains *FGFs* ou *FGFRs* induit des défauts très sévères du développement et sont donc impliqués dans des processus clés de l'embryogenèse, comme le FGF8 ou le FGFR1. Il y a également des effets de redondance, comme entre les FGFs 12 et 14 ; 3 et 10 ; 4 et 8 ; 9 et 20 ; ou encore entre le FGFR4 et 1, et le FGFR 4 et 3 (Ornitz and Itoh, 2015).

3.2 - Rôles pathologiques des FGFs et FGFRs

De l'implication des FGFs et de leurs récepteurs dans cette variété de processus découle leur association avec diverses pathologies humaines, rassemblées dans le **Tableau 2** de façon non exhaustive.

Les mutations gains de fonction des *FGFRs* conduisent à leur activation en absence de ligand, et l'on retrouve des pathologies comme le syndrome de Pfeiffer et Kallmann qui peuvent tous deux conduire à des défauts squelettiques et notamment une fusion précoce des soudures crâniennes impliquant les *FGFRs 1 et 2* (Kan *et al.*, 2002; Schell *et al.*, 1995), ou encore le *FGFR3* dans le syndrome de Muenke (Muenke *et al.*, 1997).

La surexpression des *FGFs* est très largement retrouvée lors de cribles génétiques de patients atteints de cancer. En effet, la surexpression des *FGF1 et 2* est associée à des cancers du système nerveux comme des gliomes et astrocytomes (Bredel *et al.*, 1997; Maxwell *et al.*, 1991; Takahashi *et al.*, 1990). Les *FGF1 et 3* sont notamment associés aux cancers du sein (Fioravanti *et al.*, 1997; La Rosa *et al.*, 2001) et des ovaires (Rosen *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 2012). Dans le cas du *FGF1* et du cancer des ovaires, le niveau de surexpression du *FGF1* est corrélé à la sévérité de l'agressivité du cancer et du pronostic vital du patient (Smith *et al.*, 2012).

La surexpression des *FGFs*, ainsi que les mutations gain de fonction des *FGFRs*, ont été associées dans un grand nombre d'études à différents types de cancers ce qui a suscité le lancement de nombreux essais cliniques visant à bloquer l'action des *FGFRs* et *FGFs* (Brooks *et al.*, 2012).

Gène	Pathologies associées	Références
Perte de fonction des FGFs		
FGF3	Syndrome LAMM (aplasie de Michel – surdité par agénésie de l’oreille interne – microtie et microdentie)	(Sensi <i>et al.</i> , 2011; Tekin <i>et al.</i> , 2008)
FGF8	Syndrome de Kallmann (hypogonadisme, déficit odorat)	(Falardeau <i>et al.</i> , 2008)
FGF10	Syndrome LADD (aplasie des glandes lacrymales et salivaires, surdité, anomalies dentaires et digitales)	(Entesarian <i>et al.</i> , 2007; Milunsky <i>et al.</i> , 2006)
FGF12	Syndrome de Brugada (arythmie cardiaque – gène candidat)	(Hennessey <i>et al.</i> , 2013)
FGF13	Hypertrichose liée à l’X (gène candidat), syndrome Börjesson-Forsman-Lehmann (retard mental liée à l’X)	(DeStefano <i>et al.</i> , 2013; Gecz <i>et al.</i> , 1999)
FGF14	Ataxie spinocérébelleuse (SCA27)	(Coebergh <i>et al.</i> , 2014; van Swieten <i>et al.</i> , 2003)
FGF17	Syndrome de Kallmann (hypogonadisme, déficit odorat)	(Valdes-Socin <i>et al.</i> , 2014)
FGF23	Calcinose tumorale familiale hyperphosphat�mique	(Araya <i>et al.</i> , 2005)
Gain de fonction des FGFs		
FGF23	ADHR (rachitisme hypophosphat�mique autosomique dominant)	(ADHR Consortium, 2000)
Surexpression des FGFs (cancers)		
FGF1	Cancers : sein, ovaire, prostate, gliome, astrocytome, pancréas, colon	(Henriksson <i>et al.</i> , 2011; La Rosa <i>et al.</i> , 2001; Maxwell <i>et al.</i> , 1991; Payson <i>et al.</i> , 1998; Smith <i>et al.</i> , 2012; Takahashi <i>et al.</i> , 1990; Yamanaka <i>et al.</i> , 1993)
FGF2	Cancers : prostate, gliome, sein	(Bredel <i>et al.</i> , 1997; Giri <i>et al.</i> , 1999; Relf <i>et al.</i> , 1997)
FGF3	Cancers : sein, vessie, ovaire, larynx ; sarcome de Kaposi,	(Fioravanti <i>et al.</i> , 1997; Jovanovic <i>et al.</i> , 2014; Kiuru-Kuhlefelt <i>et al.</i> , 2000; Rosen <i>et al.</i> , 1993; Zaharieva <i>et al.</i> , 2003)
FGF4	Cancer de la vessie, sarcome de Kaposi	(Kiuru-Kuhlefelt <i>et al.</i> , 2000; Zaharieva <i>et al.</i> , 2003)
FGF5	Cancer : pancréas	(Kornmann <i>et al.</i> , 1997)
FGF6	Cancer : prostate	(Ropiquet <i>et al.</i> , 2000)
FGF9	Cancer : prostate	(Huang <i>et al.</i> , 2015; Teishima <i>et al.</i> , 2012)
FGF15/19	Cancer : foie	(Sawey <i>et al.</i> , 2011)
Perte de fonction des FGFRs		
FGFR1	Syndrome de Kallmann (KAL2 : fusion prématurée soudures crâniennes)	(Dod� <i>et al.</i> , 2003)
Gain de fonction des FGFRs		
FGFR1	Syndrome de Kallmann (hypogonadisme, déficit odorat), syndrome de Pfeiffer (fusion prématurée soudures crâniennes). Cancers : Glioblastomes, prostate	(Giri <i>et al.</i> , 1999; Rand <i>et al.</i> , 2005; Schell <i>et al.</i> , 1995; Valdes-Socin <i>et al.</i> , 2014)
FGFR2	Syndromes d’Apert, de Pfeiffer, de Crouzon. Cancers : endomètre, sein	(Kan <i>et al.</i> , 2002; Pollock <i>et al.</i> , 2007; Schneider <i>et al.</i> , 2008a)
FGFR3	Syndrome de Muenke (fusion prématurée de certains os), hypochondroplasie (maladie des os), dysplasie. Cancers : vessie, col de l’utérus	(Muenke <i>et al.</i> , 1997; Tavormina <i>et al.</i> , 1999; Tomlinson <i>et al.</i> , 2007)
FGFR4	Cancer : prostate	(Wang <i>et al.</i> , 2004)

Tableau 2 : Pathologies associées aux altérations perte ou gain de fonction, ou   la surexpression des gènes FGFs et FGFRs chez l’Homme

II Le FGF1 : un facteur de croissance intracellulaire

1 - Découverte & généralités

Le FGF1 a été isolé pour la première fois par Armelin en 1973 à partir d'extraits de glande pituitaire humaine. Ajouté à des fibroblastes murins 3T3, il induit leur prolifération. C'est un facteur de croissance des fibroblastes qui est non-dialysable, thermolabile et sensible à l'action des protéases (Armelin, 1973).

L'année suivante, Gospodarowicz le purifie à partir de glandes pituitaires bovines (Gospodarowicz, 1974) et très rapidement de nombreuses études rapportent sa forte activité mitogénique pour des fibroblastes murins et humains (Gospodarowicz, 1974; Gospodarowicz and Moran, 1975; Holley and Kiernan, 1974), des myoblastes bovins (Gospodarowicz *et al.*, 1976a), ou encore des cellules vasculaires endothéliales bovines (Gospodarowicz *et al.*, 1976b, 1977). De par sa capacité à induire la prolifération et la migration des cellules endothéliales et donc la néovascularisation, le FGF1 possède un fort potentiel angiogénique (Folkman and Klagsbrun, 1987; Lobb *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 1985).

Les FGF1 et FGF2 diffèrent par leur point isoélectrique, qui leur a donné leur nomenclature originelle (FGF1 : aFGF pour acidic FGF ; FGF2 : bFGF pour basic FGF) mais ont en commun leurs activités mitogéniques et angiogéniques (Gimenez-Gallego *et al.*, 1985). Ce sont également tous les deux des facteurs neurotrophiques. Les premières expériences le démontrant ont été réalisées sur le modèle cellulaire PC12 (issues d'un phéochromocytome de rat). Sous l'action de facteurs neurotrophiques, ces cellules sont capables de se différencier en neurones de type sympathique. Le FGF1 et le FGF2 sont capables d'induire cette différenciation de la même façon que le NGF (Togari *et al.*, 1985; Wagner and D'Amore, 1986). Il est à noter que l'addition d'héparine augmente cet effet du FGF1 recombinant d'un facteur 100 (Wagner and D'Amore, 1986).

Les FGF1 et FGF2 sont les premiers FGFs à avoir été caractérisés et purifiés grâce à leur affinité pour l'héparine. C'est une forme tronquée du FGF1 qui a été initialement purifiée, de seulement 140 acides aminés (Esch *et al.*, 1985). Des mises au point ultérieures ont permis de purifier la forme totale de 155 acides aminés, qui comprend la méthionine initiatrice (Burgess *et al.*, 1986). La nomenclature utilisée est celle de 154 acides aminés qui ne tient pas compte de cette première méthionine.

Les FGF1 et 2 sont les premiers FGFs à avoir été clonés et positionnés dans le génome (Abraham *et al.*, 1986a, 1986b; Jaye *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1989).

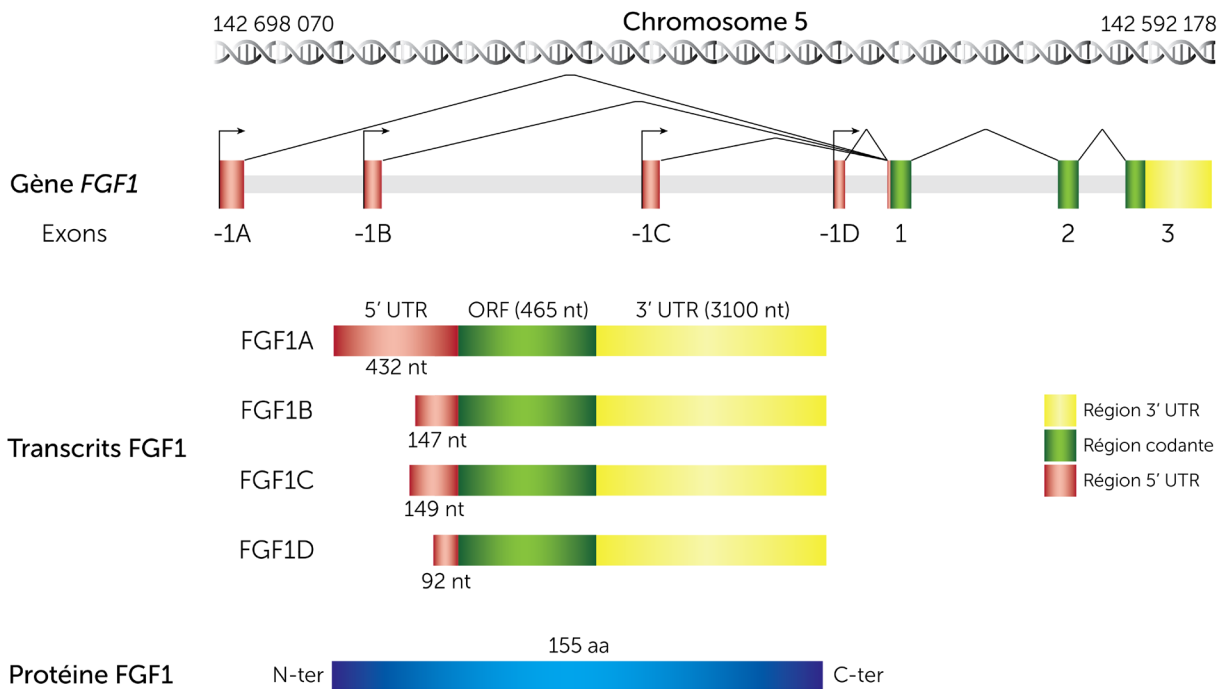


Figure 5 : Du gène *FGF1* humain à la protéine

Le gène *FGF1* humain, d'une longueur minimale de 105 kb, est localisé sur le brin antisens du chromosome 5. Il est composé de trois exons majoritairement codants (1, 2 et 3), excepté pour les 34 premiers nucléotides de l'exon 1, ainsi que l'exon 3 qui comprend une longue région non traduite (UTR) en 3' (en jaune). Ces trois régions codantes constituent la phase ouverte de lecture (ORF, en vert). Il existe quatre exons alternatifs non codants -1A, -1B, -1C et -1D, alternativement épissés à l'exon 1 selon le promoteur tissu-spécifique utilisé (flèche). Les quatre transcrits majoritaires FGF1A, B, C et D comprennent une région 5' UTR constituée de l'exon alternatif non codant et des 34 premiers nucléotides non traduits de l'exon 1 (en rouge), les exons codants 1, 2 et 3 ainsi que la longue région 3' UTR de l'exon 3. La traduction de ces quatre transcrits aboutit à une même isoforme protéique de 155 acides aminés. D'après (Chiu *et al.*, 2001; Martineau *et al.*, 2004)

2 - Structure

2.1 - Gène

Le gène *FGF1* humain est d'une longueur minimale d'environ 105 kb (kilobases) et est localisé sur le brin antisens du chromosome 5 (5q31) (**Figure 5**). Ce gène code pour une isoforme protéique unique, à partir de quatre transcrits majoritaires qui varient à leur extrémité 5'. Ces transcrits contiennent chacun quatre exons : les trois derniers exons sont majoritairement codants (exons 1, 2 et 3) et présents sur l'ensemble des transcrits du FGF1, tandis que le premier exon en 5' est non traduit et est alternativement présent dans les transcrits FGF1A, B, C et D (Jaye *et al.*, 1986; Myers *et al.*, 1993; Payson *et al.*, 1993). Il est à noter que les 34 premiers nucléotides de l'exon 1 sont non traduits, ainsi que la majeure partie 3' de l'exon 3.

Chacun de ces quatre exons alternatifs non traduits (-1A, -1B, -1C et -1D) est couplé à son promoteur respectif (1.A, 1.B, 1.C et 1.D) dont l'activation est tissu-spécifique (Alam *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 1993, 1995a; Payson *et al.*, 1993; Ray *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1989) (**Figure 5**). Les promoteurs 1.A et 1.B sont constitutivement actifs au sein de leurs types cellulaires respectifs (rein et cœur pour le 1.A, système nerveux pour le 1.B), tandis que les promoteurs 1.C et 1.D peuvent être induits par différents facteurs activateurs (Chiu *et al.*, 2001).

a) Promoteur 1.A

Le promoteur 1.A est constitutivement actif dans le rein (Myers *et al.*, 1993, 1995a) et dans le cœur où le FGF1 est requis pour la différenciation des myoblastes (Conte *et al.*, 2009; Madaï *et al.*, 1999). L'équipe d'Anne-Catherine Prats s'est intéressée aux régulations transcriptionnelles et traductionnelles du FGF1 et a pu mettre en évidence l'existence d'éléments IRES (Internal Ribosome Entry Site) au sein de l'ARNm FGF1A (Martineau *et al.*, 2004). Ces éléments sont retrouvés dans les ARNm de facteurs de croissance ou de transcription et peuvent permettre la traduction des ARNm lorsque la traduction coiffe-dépendante est bloquée, comme par exemple en conditions de stress ou lors de la mitose (Jackson, 1991). Ils peuvent aussi participer au contrôle de l'initiation alternative de la traduction.

Le niveau protéique de FGF1 augmente lors de la différenciation des myoblastes en myotubes, parallèlement à la diminution de la traduction coiffe-dépendante. Dans ces conditions, l'expression du FGF1 est concomitante à une forte activation du promoteur 1.A et requiert la présence du motif IRES du transcrit FGF1A. De façon intéressante, la traduction IRES-dépendante du FGF1A nécessite la présence de la région -905 à -513 nt du promoteur 1.A. Ceci suggère l'existence d'un mécanisme de couplage de la transcription et de la traduction (Conte *et al.*, 2009).

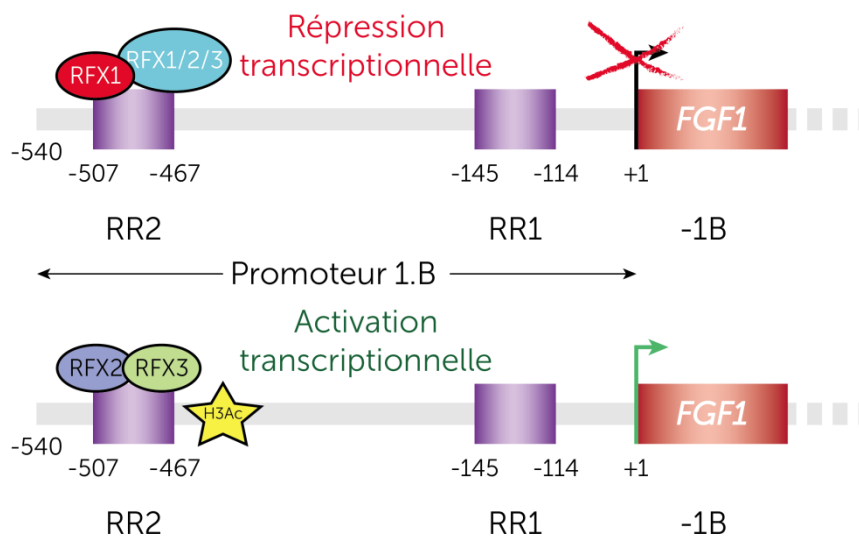


Figure 6 : Régulation du promoteur 1.B du gène FGF1

Le promoteur 1.B du gène FGF1 humain possède deux régions régulatrices RR1 et RR2 en amont de l'exon alternatif non traduit -1B. La région RR2 contient un site de fixation pour les facteurs de transcription RFX1, 2 et 3. La fixation de l'homodimère RFX1 ou des hétérodimères RFX1-RFX2/3 inhibe l'activation du promoteur, tandis que la fixation de l'hétérodimère RFX2-RFX3 active le promoteur et est corrélée à une augmentation de l'acétylation des histones H3 à proximité de RR2. D'après (Hsu *et al.*, 2010, 2012; Kao *et al.*, 2013).

b) Promoteur 1B

Le promoteur 1B est le plus étudié chez l'humain. Il est actif dans le cerveau, les tissus nerveux comme la rétine, ainsi que dans plusieurs lignées de glioblastomes (Liu *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 1995b; Ray *et al.*, 1997). Il conduit à la transcription de l'ARNm noté FGF1B. Chez la souris, la région 5' non codante jouxtant le premier exon codant de l'ARNm FGF1 présente 77% d'homologie avec l'exon -1B humain. Le promoteur murin est donc également nommé 1.B et est le seul actif dans le cerveau. Le transcrit FGF1B est exprimé dans les neurones moteurs et sensitifs, le cervelet, les cellules neurales épendymales et les neurones dopaminergiques (Alam *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2014).

Le promoteur proximal 1.B du gène *FGF1* humain, en amont du site majeur d'initiation de la transcription (+1), contient deux régions cis-régulatrices (RR1, -145 à -114 bp et RR2, -507 à -467 pb) (Myers *et al.*, 1995a) (**Figure 6**). Une étude plus approfondie de la région RR2 a montré qu'il s'agissait d'un site de fixation pour des facteurs de transcription (Ray *et al.*, 1997). Dans des lignées de glioblastome, le facteur de transcription RFX1 (Regulatory Factor protein of the X-box 1) régule négativement la transcription du *FGF1* en se fixant sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère avec RFX2 ou RFX3 sur la région RR2 du promoteur 1.B de façon spécifique. Aucun autre site de fixation pour RFX1 n'a été trouvé sur les autres promoteurs du *FGF1* (Hsu *et al.*, 2010, 2012). Les glioblastomes contiennent une sous-population de cellules souches qui sont les principales responsables de la tumorigénicité de ce type de cancer (Galli *et al.*, 2004; Gilbertson and Rich, 2007). Le traitement de ces cellules par l'acide valproïque, un inhibiteur de la kinase GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) et des histones désacétylases (HDAC), active le promoteur 1.B *via* la fixation de l'hétérodimère RFX2/RFX3 sur la région RR2 et induit la croissance des cellules souches. L'activation du promoteur 1.B est induite par une baisse de l'activité de la kinase GSK3 et des HDAC, l'acétylation de l'histone H3 étant augmentée aux environs de la région RR2 (Kao *et al.*, 2013).

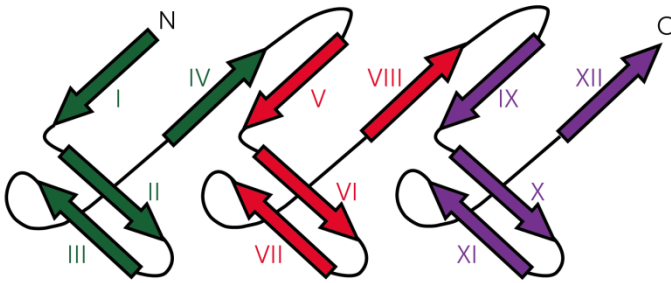
c) Promoteurs 1.C et 1.D

Les promoteurs 1.C et 1.D sont actifs dans une grande variété de lignées cellulaires incluant différentes lignées de cancers mammaires, de la prostate (PC-3) ou de fibroblastes ainsi que de cellules musculaires lisses vasculaires (Chotani and Chiu, 1997; Chotani *et al.*, 1995; Payson *et al.*, 1993; Renaud *et al.*, 1996a). Ces deux promoteurs ont la particularité d'être inductibles par différents facteurs comme le sérum, l'ester de phorbol ou le TGF- β (Transforming Growth Factor β) (Chotani and Chiu, 1997; Chotani *et al.*, 1995; Payson *et al.*, 1998). Le promoteur 1.D répond notamment à l'ajout de sérum *via* son domaine SRE (Serum Response Element) qui possède deux sites remarquables (Ets et CARG), ciblés par deux cascades de signalisation distinctes. Le site Ets, cible de la

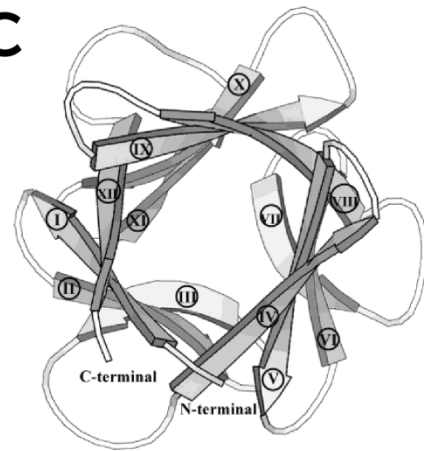
A

1 11 21 31 41 51
 AEGETTFTA LTEKFNLPNG NYKKPKLLYC SNGGHFLRIL PDGTVDGTRD RSDQHIQLQL
 ...IV I II III IV...
 61 71 81 91 101 111
 SAEVSGEVYI KSTETGQYLA MDTDGLLYGS QTPNEECFLF ERLEENHYNT YISKKHAEKN
 ...IV V VI VII VIII IX
 121 131 141 151 154
 WFGVGLKKNGS CKRGPRTHYG QKAILFLPLP VSSD
 X XI XII

B



C



D

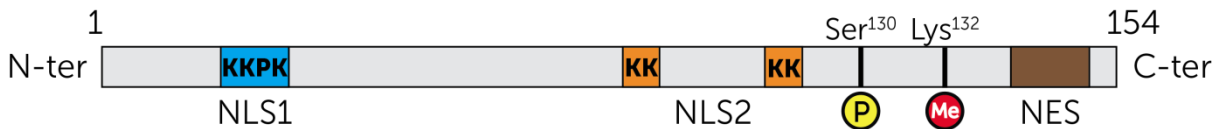


Figure 7 : Structure et sites remarquables de la protéine FGF1

A-B : La protéine FGF1 est constituée de 154 acides aminés (en excluant sa méthionine initiatrice) et comprend 12 feuillettes β numérotées de I à XII. Ceux-ci sont organisés en trois unités (vert, rouge et violet) comportant 4 feuillettes chacune. Adapté de (Bennett *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 1996). **C** : Dans sa structure tertiaire, ces trois unités sont repliées en tonneaux β dits « β -barrel », et forment ainsi une structure en trèfle « β -trefoil superfold ». Issu de (Chi *et al.*, 2002). **D** : Le FGF1 possède deux signaux de nucléarisation : une NLS1 N-terminale classique KKK (acides aminés 23-26, en bleu), et une NLS2 bipartite de la forme KK...KK (acides aminés 114-127, en orange). Il possède également un signal d'export NES à son extrémité C-terminale (acides aminés 144-151, en marron). Deux sites de modifications post-traductionnels majeurs sont connus : un site de phosphorylation sur la Ser130 et un site majeur de méthylation sur la Lys132. Les séquences NES et NLS1-2 sont respectivement soulignées en marron, bleu et orange dans le panneau A.

famille des facteurs de transcription Ets, est ciblé par des protéines de la famille des GTPases comme Ras, Rac1 et Cdc42. Le motif CARG (5'-CC(A/T)₆ GG-3') est la cible d'une cascade de signalisation indépendante de la synthèse protéique *de novo*. L'activation de cette cascade requiert en effet la présence de cycloheximide, en plus de l'ajout de sérum (Chotani *et al.*, 2000).

2.2 - Protéine

a) Structure

Les transcrits issus des quatre promoteurs alternatifs du FGF1 conduisent tous à la traduction d'une unique protéine de 154 acides aminés (en excluant sa méthionine iniatrice) et 17,5 kDa (kilodalton). Sa structure secondaire est constituée de 12 feuillets β numérotés de I à XII (**Figure 7A-B**) qui s'organisent en 3 unités comportant 4 feuillets chacune. Dans sa structure tertiaire, ces trois unités sont repliées en tonneaux β dits « β -barrel », et forment ainsi une structure en trèfle « β -tréfoil superfold » (Bennett *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 1991) (**Figure 7C**).

Contrairement à la majorité des facteurs de croissance, le FGF1 ne contient pas de peptide signal de sécrétion (Jaye *et al.*, 1986). En revanche il contient deux séquences de localisation nucléaire (NLS). Une NLS classique de type KKPK à son extrémité N-terminale (NLS1, acides aminés 23 à 26) (Imamura *et al.*, 1990), et une NLS bipartite à son extrémité C-terminale consistant en deux groupements lysines KK...KK séparés par 10 acides aminés (NLS2, acides aminés 114 à 127) (Wesche *et al.*, 2005) (**Figure 7D**). Une séquence NES (Nuclear Export Signal) a été identifiée à son extrémité C-terminale (Nilsen *et al.*, 2007). La délétion de la séquence NLS1 n'affecte pas la capacité du FGF1 à se lier à l'héparine et aux FGFRs. En revanche, la plupart de ses activités, comme la prolifération cellulaire, sa mitogénicité ou son action neurotrophique sont inhibées, démontrant ainsi l'importance de la localisation nucléaire du FGF1 pour ses activités biologiques (Imamura *et al.*, 1990; Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009).

b) Modifications post-traductionnelles du FGF1

Très peu de modifications post-traductionnelles du FGF1 ont été décrites jusqu'ici. À ce jour, un site unique de phosphorylation est connu sur le résidu Ser130. Le FGF1 possède 11 résidus lysine dont 5 peuvent être significativement méthylés (Lys23, 24, 26, 126 et 132). Son site majeur de méthylation est la Lys132 (Harper and Lobb, 1988) (**Figure 7D**).

i. Méthylation de la Lys132

Le résidu Lys132 du FGF1 est la lysine la plus rapidement monométhylée *in vitro*, et est la seule à pouvoir être diméthylée. La méthylation de ce résidu affecte négativement la capacité du FGF1 à lier les HSPGs et les FGFRs ainsi que son activité mitogénique (Harper and Lobb, 1988). La mutation de

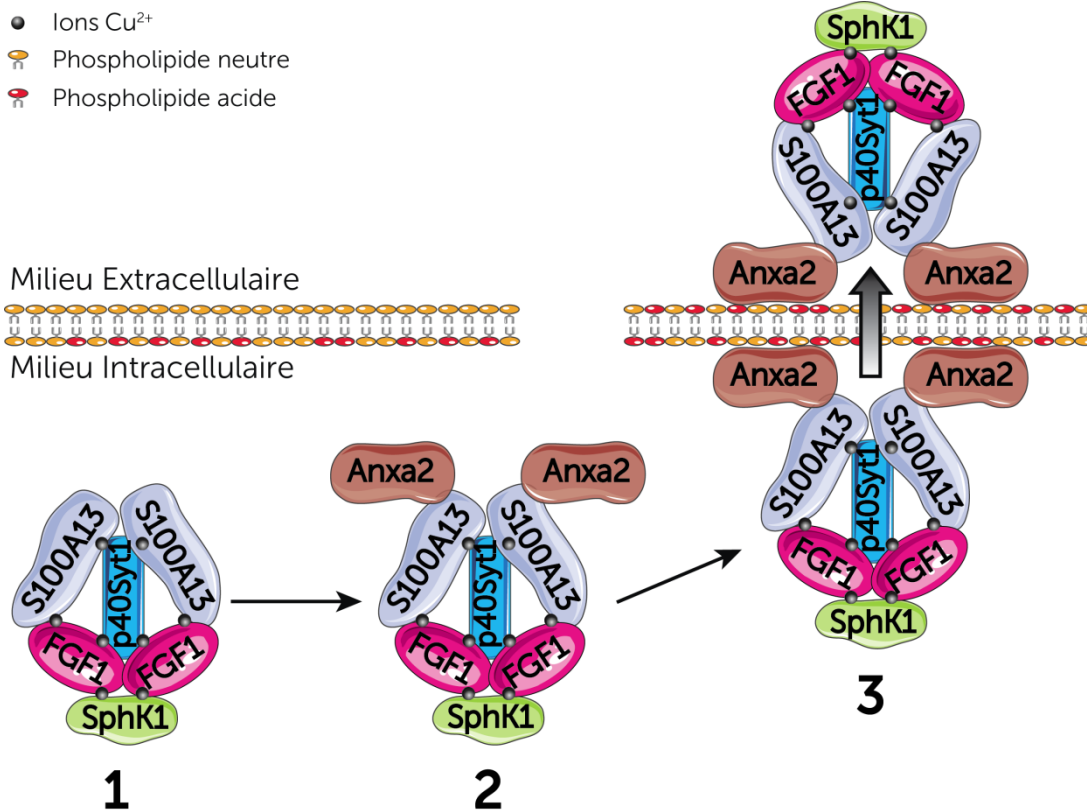


Figure 8 : Sécrétion atypique du FGF1

Le complexe de sécrétion est composé d'un homodimère de FGF1, du fragment extravésiculaire p40 de la synaptotagmine-1 (p40Syt1), de la protéine de liaison au Ca^{2+} S100A13 ainsi que de la sphingosine kinase 1 (SphK1) **(1)**. Ce complexe s'associe à l'annexine II (Anxa2), ancrée à la membrane plasmique **(2)**. Le complexe est alors relargué à l'extérieur de la cellule après translocation de phospholipides acides comme la phosphatidylsérine vers la face externe de la membrane plasmique **(3)**. D'après (Prudovsky *et al.*, 2013).

cette lysine en glycine (mutant FGF1^{K132E}) inhibe également la liaison FGF1-HSPGs, ses activités mitogénique et neurotrophique, mais pas la liaison FGF1-FGFR (Burgess *et al.*, 1990; Renaud *et al.*, 1996b). *In vitro*, le FGF1^{K132E} perd sa capacité à être phosphorylé sur le résidu Ser130 proche (Klingenberg *et al.*, 1998).

ii. Phosphorylation de la Ser130

La capacité du FGF1 à être phosphorylé a été décrite pour la première fois en 1989 et semble être dépendante de la PKC (Klingenberg *et al.*, 1998; Mascarelli *et al.*, 1989). Le FGF1 contient en effet un site consensus de phosphorylation par la PKC (Ser¹³⁰-Cys-Lys) (Klingenberg *et al.*, 1999). Wiedlocha et ses collaborateurs ont montré que le FGF1 est phosphorylé par la PKC δ dans le compartiment nucléaire. Ce processus de phosphorylation serait positivement régulé par la nucléoline (Sletten *et al.*, 2014), et induit son export rapide vers le cytosol puis sa déphosphorylation et sa dégradation (Wiedlocha *et al.*, 2005) (**Figure 9**). L'impact de sa phosphorylation sur ses activités biologiques reste cependant peu décrit.

3 - Activités extracellulaires du FGF1

Le FGF1 ayant été initialement purifié à partir d'extraits de glande pituitaire (Gospodarowicz, 1974), ses activités ont été historiquement étudiées par l'ajout de FGF1 recombinant dans le milieu de culture.

3.1 - Mode de sécrétion atypique du FGF1

Des expériences de transfection du FGF1 n'ont pu mettre en évidence de relargage du FGF1 dans le milieu extracellulaire dans des conditions normales (Prudovsky *et al.*, 2008), contrairement à des conditions de stress hypoxique, thermique ou de privation de sérum (Carreira *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 1992, 1995; Shin *et al.*, 1996) (**Figure 10B**).

Dans ces conditions, le FGF1 est sécrété sous forme d'homodimère inactif par un mécanisme indépendant de la voie RE-Golgi (Jackson *et al.*, 1995) au sein d'un complexe de sécrétion régulé par le Cu²⁺ (Landriscina *et al.*, 2001a). Ce complexe comprend le fragment extravésiculaire p40 de la synaptotagmine-1 (p40Syt1) (LaVallee *et al.*, 1998), la protéine de liaison au Ca²⁺ S100A13 (Landriscina *et al.*, 2001b; Mouta Carreira *et al.*, 1998) ainsi que la sphingosine kinase 1 (SphK1) (Soldi *et al.*, 2007). Les fonctions exactes des différents composants du complexe lors de la sécrétion du FGF1 sont mal connues. Les domaines C2A et C2B de p40Syt1 ont une forte affinité pour les lipides et pourraient jouer un rôle important dans l'ancrage du complexe à la membrane plasmique (Jayanthi *et al.*, 2014). Il a également été proposé que la protéine de liaison à la membrane Annexine II (Anxa2) pourrait interagir avec ce complexe. En effet, Anxa2 forme habituellement un hétérotétramère

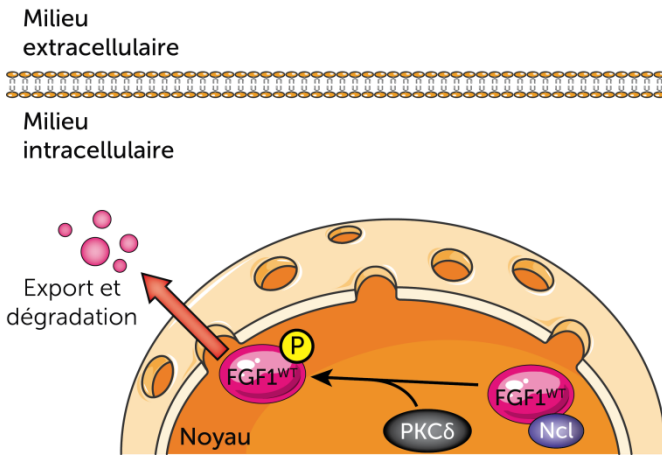


Figure 9 : Le FGF1 est phosphorylé par la PKC δ

Le FGF1 est phosphorylé dans le noyau par la PKC δ sur son résidu Ser130, la nucléoline (Ncl) interagit avec le FGF1 et régule la phosphorylation. Cela induit l'export nucléaire puis la dégradation cytosolique du FGF1. D'après (Sletten *et al.*, 2014; Wiedlocha *et al.*, 2005).

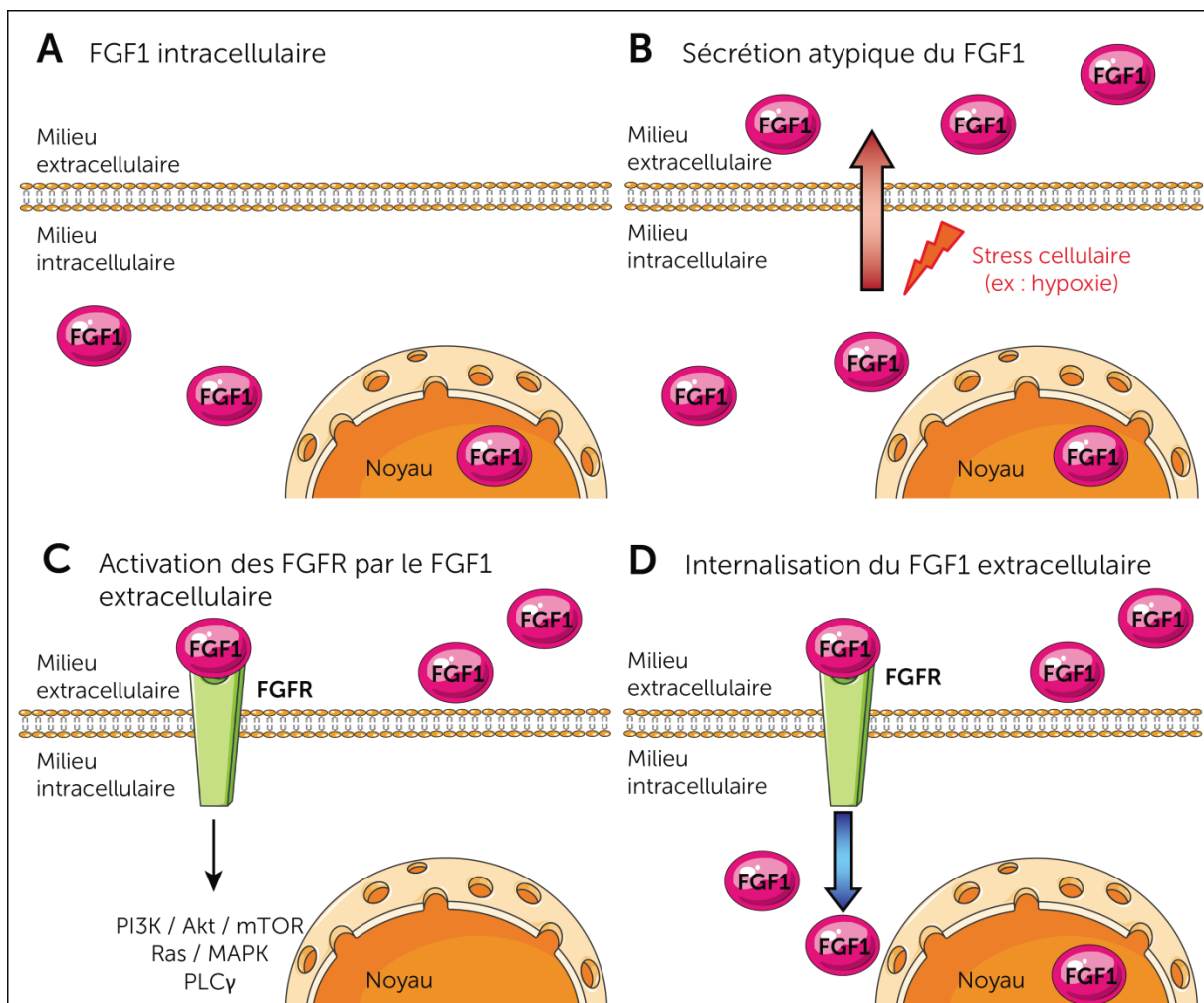


Figure 10 : Modes d'action du FGF1

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

composé de deux Anxa2 et deux S100A10. Au vu des similarités de structure entre S100A13 et S100A10, il a été proposé que S100A13 serait responsable de l'interaction du complexe avec Anxa2 ancrée à la membrane (Prudovsky *et al.*, 2013) (**Figure 8**). Une étude récente se proposant d'identifier de nouveaux partenaires du FGF1 par différentes approches a identifié Anxa2 comme partenaire potentiel par une expérience de co-précipitation avec du FGF1 recombinant (Bober *et al.*, 2016) et semble ainsi confirmer cette hypothèse. La translocation de phospholipides acides comme la phosphatidylsérine vers la face externe de la membrane plasmique participerait à l'externalisation du complexe (Kirov *et al.*, 2012).

3.2 - Internalisation du FGF1

La translocation du FGF1 extracellulaire vers le cytosol ou le noyau (**Figure 10D**) est un processus dépendant de la présence de FGFRs et de l'activité de la PI3K (Klingenberg *et al.*, 2000; Wiedlocha *et al.*, 1995), qui dans des fibroblastes ou des cellules endothéliales a préférentiellement lieu durant la phase G₁ du cycle cellulaire (Imamura *et al.*, 1994; Malecki *et al.*, 2004; Zhan *et al.*, 1993). Le FGF1 extracellulaire est l'unique membre de sa famille à pouvoir lier les quatre différents FGFRs, mais seule sa liaison aux FGFR1 ou 4 peut donner lieu à son internalisation dans la cellule, alors que les FGFR2 et 3 en sont incapables (Sorensen *et al.*, 2006a).

Après sa liaison au FGFR (**Figure 10C**), le complexe FGF1-FGFR est internalisé indépendamment des vésicules à manteau de clathrine ou des cavéoles (Citores *et al.*, 1999, 2001), et indépendamment de l'activité tyrosine-kinase du FGFR (Zakrzewska *et al.*, 2011). La translocation du complexe FGF1-FGFR nécessite des vacuoles possédant un potentiel de membrane (Malecki *et al.*, 2002, 2004; Rothbard *et al.*, 2005). Le type de vacuole pourrait dépendre du FGFR impliqué : en effet, les complexes FGF1-FGFR4 seraient préférentiellement acheminés vers le compartiment de recyclage de l'endocytose (ERC) (Citores *et al.*, 1999), tandis que les complexes FGF1-FGFR1 seraient préférentiellement acheminés vers les lysosomes pour y être rapidement dégradés (Haugsten *et al.*, 2005). Le FGF1 est capable de transloquer à travers la membrane de l'endosome vers le cytosol (Olsnes *et al.*, 2003) par un mécanisme non décrit mais dépendant de la protéine chaperonne Hsp90 (Wesche *et al.*, 2006).

Le faible poids moléculaire du FGF1 lui permet de diffuser librement à travers les pores nucléaires, mais plusieurs mécanismes semblent participer à son import nucléaire actif. La séquence NLS1 N-terminale est requise pour la nucléarisation du FGF1 exogène. Ce processus nécessite une activité Ran-GTPase ainsi que la protéine LRRC59 (leucine-rich repeat containing 59) localisée dans le RE et l'enveloppe nucléaire, et qui est un partenaire intracellulaire du FGF1 (Skjerpen *et al.*, 2002a). De façon intéressante, lorsque son ancrage à la membrane du RE est supprimé, LRRC59 a une forte

tendance à être nucléarisée de façon dépendante de Ran, ce qui suggère qu'elle pourrait réguler l'import nucléaire du FGF1 exogène en facilitant son interaction avec la machinerie d'import et en transportant le FGF1 aux, voire à travers, les pores nucléaires. Cette machinerie implique les importines Kpn α 1 et Kpn β 1 (Yamada *et al.*, 2016; Zhen *et al.*, 2012). La deuxième séquence NLS2 bipartite est active dans les cellules NIH 3T3 mais son mécanisme exact n'a pas été déterminé (Wesche *et al.*, 2005). La séquence d'export NES C-terminale permet l'export du noyau après formation du complexe FGF1/exportine-1/Ran-GTP (Nilsen *et al.*, 2007).

4 - Le FGF1 intracellulaire

Le FGF1 possède deux séquences NLS (Imamura *et al.*, 1990; Wesche *et al.*, 2005). Ainsi, en conditions physiologiques, le FGF1 est intracellulaire, localisé dans le cytosol et le noyau (**Figure 10A**). Son expression dans une variété de tissus et sa capacité à interagir avec différents partenaires l'impliquent dans de nombreux processus cellulaires, y compris développementaux.

4.1 - Activités du FGF1

a) Développement et différenciation

Le FGF1 est exprimé de façon précoce au cours du développement, et son niveau d'expression augmente progressivement au cours du développement embryonnaire du poulet (Philippe *et al.*, 1996). L'étude de la localisation du FGF1 dans des embryons de rat montre des niveaux importants de FGF1 dans les tissus d'origine neuroectodermale et mésodermale. Le niveau de FGF1 reste constant dans les reins et le système respiratoire, et diminue dans les muscles squelettiques. Il augmente au cours de l'organogenèse dans le système nerveux central (SNC) et la rétine de façon corrélée avec la différenciation tissulaire, suggérant un rôle du FGF1 dans la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire (Fu *et al.*, 1991).

D'autres études ont pu démontrer que la présence de FGF1 dans le cœur et les vaisseaux sanguins, en particulier les vaisseaux collatéraux en croissance (Fu *et al.*, 1991; Spirito *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 2010), jouait un rôle important dans la prolifération des myocytes et l'angiogenèse des capillaires (Engelmann *et al.*, 1993; Hidai *et al.*, 2003; Matsuyama and Kawahara, 2009; Wu *et al.*, 2010).

Dans le muscle squelettique, le niveau d'ARNm du FGF1 est maximal dans les myoblastes où il stimule leur prolifération, et diminue au cours de la différenciation, jusqu'à devenir indétectable après différenciation terminale dans les myotubes (Alterio *et al.*, 1990; Fu *et al.*, 1991; Hannon *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 1991). Cette diminution du FGF1 s'accompagne de l'augmentation de myogénine (Moore *et al.*, 1991), marqueur de la différenciation myogénique. Cependant, cet effet inhibiteur de

la différenciation semble être FGFR-dépendant (Hannon *et al.*, 1996). Des études plus récentes semblent montrer des rôles différents et opposés du FGF1 dans la myodifférenciation, selon qu'il soit extra- ou intracellulaire. En effet, l'ajout de FGF1 recombinant dans le milieu de culture de myoblastes de rat inhibe leur différenciation, tandis que la transfection de ces mêmes cellules avec la forme sauvage du FGF1 promeut leur différenciation (Urano *et al.*, 1999). L'expression du FGF1 intracellulaire sous le contrôle du promoteur 1.A semble requise pour la différenciation des myoblastes (Conte *et al.*, 2009).

Le FGF1 est exprimé dès le stade embryonnaire au sein du SNC et périphérique, avec un niveau maximal atteint chez l'adulte. Le FGF1 est essentiellement localisé dans les cellules neuronales comme les cellules de Purkinje (neurones GABAergiques du cervelet), les neurones des noyaux du cervelet profond et du tronc cérébral, ainsi que les neurones du système périphérique (ganglion spinal), mais aussi dans les neurones ganglionnaires rétiniens dont les axones forment le nerf optique (Elde *et al.*, 1991; Nurcombe *et al.*, 1993; Schnurch and Risau, 1991). Il est exprimé dans les trois couches neuronales de la rétine, et notamment dans les photorécepteurs (Jacquemin *et al.*, 1990). Dans la moëlle épinière du rat, le FGF1 est principalement localisé dans le noyau et le cytoplasme des neurones moteurs et sensitifs matures (Elde *et al.*, 1991). Il est également exprimé dans le système auditif par les neurones cochléaires de l'organe de Corti (Pirvola *et al.*, 1995).

L'activité différenciatrice du FGF1 a été démontrée dans différents modèles cellulaires *in vitro*, où le FGF1 intracellulaire est capable d'induire la différenciation neuronale de nombreux types de cellules en promouvant notamment la croissance des neurites dans les cellules PC12 (issues d'un phéochromocytome de rat) (Renaud *et al.*, 1996b), les cellules SH-SY5Y (issues d'un neuroblastome humain) (Raguenez *et al.*, 1999), ou de cultures primaires de cellules embryonnaires de rétine neurale de poulet (Desire *et al.*, 1998).

b) Survie (anti-apoptotique)

Comme beaucoup de facteurs de croissance, le rôle anti-apoptotique du FGF1 a été largement décrit dans la littérature, pour la grande majorité *via* l'addition de FGF1 recombinant et sa liaison aux FGFRs. Peu d'études se sont intéressées aux voies de signalisation intracellulaires du FGF1, et leurs mécanismes sont encore très peu décrits.

Le rôle du FGF1 dans la survie cellulaire a été étudié dans différents modèles *in vitro*. Le FGF1 protège les cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVEC) et les cellules embryonnaires de rétine de poulet de la mort cellulaire (Desire *et al.*, 1998; Maier *et al.*, 1996). Le traitement à l'interleukine 6 (IL6) d'une lignée neuronale humaine (NT2) induit la survie cellulaire *via*

l'activation de l'expression du *FGF1* (Thorns *et al.*, 2002). Le FGF1 protège également de la mort différentes lignées cellulaires cultivées en absence de sérum, comme des cellules épithéliales issues de cristallin bovin (Renaud *et al.*, 1994), des cellules de phéochromocytome de rat (PC12) (Renaud *et al.*, 1996b), ou encore de neuroblastome humain SH-SY5Y (Raguenez *et al.*, 1999).

Au laboratoire, nous étudions les mécanismes intracellulaires sur lesquels repose l'activité anti-apoptotique du FGF1. Nous avons pu montrer dans deux lignées cellulaires (REtsAF, issues de fibroblastes embryonnaires de rat, et PC12) que le FGF1 inhibe l'apoptose dépendante de p53 en diminuant la stabilité de ce dernier et en modifiant ses activités transcriptionnelles (Bouleau *et al.*, 2005, 2007). Dans les cellules PC12, nous avons pu mettre en évidence l'importance de la localisation nucléaire du FGF1 pour son activité anti-apoptotique, ainsi que son interaction avec p53 (Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009).

In vivo, la surexpression du FGF1 dans des myocytes de souris retarde significativement le développement de l'infarctus suite à une ischémie. Cet effet protecteur du FGF1 vis-à-vis de la mort cellulaire des myocytes est indépendant de son activité pro-angiogénique (Buehler *et al.*, 2002). *Ex vivo*, la surexpression du FGF1 dans un cœur de souris isolé améliore la récupération de la fonction cardiaque ainsi que la survie cellulaire après une ischémie myocardique aiguë (Palmen *et al.*, 2004).

c) Mitogénique

Le FGF1 intracellulaire ou internalisé induit la prolifération cellulaire et la synthèse d'ADN dans des cellules endothéliales pulmonaires, des fibroblastes embryonnaires murins NIH 3T3 ou des cellules issues d'ostéosarcome humain U2OS (Imamura *et al.*, 1990; Klingenberg *et al.*, 1998, 1999, Wiedlocha *et al.*, 1994, 1996). Cette activité mitogénique dépend de la localisation nucléaire du FGF1 car la délétion ou la mutation de la séquence NLS du FGF1 inhibe sa localisation nucléaire et abolit cette activité (Imamura *et al.*, 1990). D'autre part, la mitogénicité du FGF1 est indépendante de l'activité des FGFRs : l'utilisation d'une protéine de fusion FGF1-toxine diphtérique permet son internalisation dans la cellule *via* le récepteur membranaire de la toxine diphtérique. Cette protéine de fusion internalisée indépendamment des FGFRs conserve ses propriétés mitogéniques (Wiedlocha *et al.*, 1994, 1996).

d) Oncogénique

Le FGF1 est surexprimé *in vivo* dans différents types de cancer, comme notamment des cancers du sein (Cooper *et al.*, 1997; La Rosa *et al.*, 2001; Payson *et al.*, 1998; Yoshimura *et al.*, 1998), des ovaires (Birrer *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2012), du poumon (Li *et al.*, 2015), de la prostate (Dorkin *et al.*, 1999; Payson *et al.*, 1998), du pancréas (Yamanaka *et al.*, 1993), du côlon (Henriksson *et al.*,

2011), dans des mélanomes (Di Serio *et al.*, 2008), des astrocytomes et glioblastomes (Maxwell *et al.*, 1991; Takahashi *et al.*, 1990). De plus, différentes études ont pu mettre en évidence une corrélation entre le niveau d'expression du FGF1 et la sévérité du diagnostic ainsi que du pronostic vital des patients atteints de cancers de la prostate, des ovaires, du sein ou des poumons. En effet, la surexpression du FGF1 est corrélée avec l'aggravation du score de Gleason dans les cancers de la prostate, c'est-à-dire avec l'agressivité de la tumeur et la sévérité du pronostic vital (Dorkin *et al.*, 1999). C'est également le cas dans certains cancers du sein (Slattery *et al.*, 2013), ou des ovaires où la surexpression du FGF1 est également associée à une chimiorésistance (Smith *et al.*, 2012). Dans les cancers du poumon non à petites cellules, la surexpression du FGF1 est associée à une taille plus importante de la tumeur primaire, une invasion vasculaire, une densité augmentée des microvaisseaux intratumoraux et un mauvais pronostic vital (Li *et al.*, 2015).

In vitro, la surexpression du FGF1 dans des cellules cancéreuses augmente leur prolifération et l'injection de telles cellules dans des souris nude induit la tumorigenèse et l'angiogenèse ainsi que la formation de métastases (El Yazidi *et al.*, 1998; Jouanneau *et al.*, 1991, 1997; Okunieff *et al.*, 2003; Shain *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999).

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

e) Modulations transcriptionnelles et traductionnelles induites par le FGF1

De nombreuses régulations induites par le FGF1 au niveau transcriptionnel ou traductionnel ont été décrites (Raju *et al.*, 2014). Il induit l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation et la prolifération comme EGR-1 (Early Growth Response 1) (Tamura *et al.*, 2008), Jun/Fos (Lungu *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2001a), et Myc (Dudka *et al.*, 2010), impliqué dans la croissance cellulaire. L'expression d'autres acteurs de la différenciation est augmentée par le FGF1 comme Thy1 ou GAP43 (Chang *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2001). Quant à la prolifération, l'expression de la cycline D1 est augmentée (Billottet *et al.*, 2008), celle de l'inhibiteur GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage 45) est diminuée (Ambrosetti *et al.*, 2008) et celle de MDM2 (Mouse Double Minute 2) est augmentée (Bouleau *et al.*, 2005). MDM2 est un régulateur négatif de p53 qui inhibe notamment l'arrêt du cycle cellulaire *via* p21. L'expression de p21 est diminuée par le FGF1 (Bouleau *et al.*, 2005), tout comme celle des facteurs de transcription TCF3 et 4 de la voie Wnt/ β -caténine

(Ambrosetti *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2012), impliquée notamment dans la prolifération, la différenciation ou la migration cellulaire.

Le FGF1 module l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire comme iNOS (inducible NO Synthase) (Vargas *et al.*, 2006) ou les facteurs de croissance de la famille IGF (Insulin-like Growth Factor) (Siewverts *et al.*, 2002) ou le NGF (Yoshida and Gage, 1992). Il induit la progression et l'invasion tumorale en régulant positivement les métalloprotéases MMP7 et 9 (Billottet *et al.*, 2008; Udayakumar *et al.*, 2002) et en régulant négativement l'inhibiteur de métalloprotéases TIMP3 (Ambrosetti *et al.*, 2008).

Le FGF1 autorégule son expression *via* une boucle de rétrocontrôle positif (Renaud *et al.*, 1996b), dont les mécanismes exacts ne sont pas encore précisés.

4.2 - Partenaires du FGF1

Le FGF1 intracellulaire est capable d'interagir directement avec différents partenaires qui lui permettent de réguler notamment sa sécrétion, son trafic ou ses activités intracellulaires.

a) Partenaires impliqués dans la sécrétion atypique du FGF1

La sécrétion atypique du FGF1 nécessite la formation d'un complexe de sécrétion multiprotéique au sein duquel le FGF1 interagit avec le fragment extravésiculaire p40 de la synaptotagmine-1 (p40Syt1), la protéine de liaison au Ca²⁺ S100A13, la sphingosine kinase 1 (SphK1) et l'annexine 2 (cf. **Mode de sécrétion atypique du FGF1** – p. 33).

b) Partenaires impliqués dans le trafic intracellulaire du FGF1

Suite à sa liaison aux FGFRs, le FGF1 peut être internalisé dans la cellule puis transloqué au noyau. Ces mécanismes font intervenir notamment LRRC59 et les importines Kpn α 1 et Kpn β 1 (cf. **Internalisation du FGF1** – p. 35).

Plus récemment, il a été montré que le FGF1 interagissait avec la nucléoline (Sletten *et al.*, 2014), une protéine nucléolaire impliquée dans des processus cellulaires variés comme la croissance cellulaire, la régulation du cycle cellulaire, la transcription, l'apoptose, la biogenèse des ribosomes ou encore le trafic nucléo-cytoplasmique des ribosomes (Tajrishi *et al.*, 2011). La nucléoline régulerait la phosphorylation du FGF1 sur son résidu Ser130 par la PKC δ et donc l'export nucléaire du FGF1 (cf. **Phosphorylation de la Ser130** – p. 33).

c) Partenaires impliqués dans la régulation des activités du FGF1

L'interaction du FGF1 avec la kinase CK2 (Casein Kinase 2) corrèle avec son activité mitogénique (Skjerpen *et al.*, 2002b). La kinase CK2 est surexprimée dans les tissus en prolifération et requise pour la progression du cycle cellulaire chez les mammifères (Lebrin *et al.*, 2001; Pinna and Meggio, 1997). Elle joue un rôle majeur dans les phases précoces de la transduction des signaux mitogéniques (Pyerin, 1994; Tawfic *et al.*, 2001). Un autre partenaire du FGF1, FIBP (FGF1 Intracellular-Binding Protein), pourrait également être impliqué dans l'activité mitogénique du FGF1, cependant son rôle exact n'est pas connu (Kolpakova *et al.*, 1998).

La mortaline (ou GRP75 pour 75 kDa glucose-regulated protein) interagit avec le FGF1 recombinant internalisé ou avec le FGF1 intracellulaire surexprimé. Cette interaction dépend du niveau de phosphorylation des tyrosines de la mortaline qui atteint son pic en fin de phase G₁. Cela suggérerait que la formation du complexe FGF1-mortaline est importante pour la transduction des signaux de croissance induits par le FGF1. Il est intéressant de noter que le FGF1 et la mortaline colocalisent dans la région périnucléaire, ce qui pourrait suggérer un rôle de la mortaline dans la nucléarisation du FGF1 et la régulation de son activité mitogénique (Mizukoshi *et al.*, 1999, 2001).

La protéine suppresseur de tumeur p53 est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. Notre équipe a montré il y a quelques années que le FGF1 interagit avec la protéine p53, en conditions physiologiques ou suite à l'induction de l'apoptose. L'interaction entre p53 et le FGF1 semble corrélée avec l'activité anti-apoptotique de ce dernier : le FGF1 induit en effet une diminution de la stabilité de p53 et de ses activités transcriptionnelles, inhibant ainsi l'apoptose dans les cellules PC12 (Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009). Cette interaction semble confirmée par l'étude récente de Bober *et al.*, qui retrouve p53 parmi les partenaires potentiels du FGF1 *via* une approche de Tandem Affinity Purification (TAP) (Bober *et al.*, 2016).

Enfin, il est à noter qu'une étude récente visant à identifier de nouveaux partenaires du FGF1 et alliant trois approches (TAP, co-précipitation de FGF1 recombinant et crible double hybride chez la levure) confirme plusieurs de ces interactions. Elle ouvre la voie à de nouveaux candidats dont les relations avec le FGF1 sont encore inconnues à ce jour, mais leur implication dans des processus similaires aux activités du FGF1 comme la prolifération, l'angiogenèse ou l'apoptose semble prometteuse. Elle met notamment à jour de nouvelles interactions du FGF1 avec des composants du cytosquelette cytoplasmique (MAPRE pour Microtubule-associated protein RP/EB family member 1, γ -actine, α -actinine-4) ou nucléaire (lamines A/C), ainsi qu'avec HSP90 α , ce qui pourrait permettre de préciser les mécanismes du trafic intracellulaire du FGF1 (Bober *et al.*, 2016).

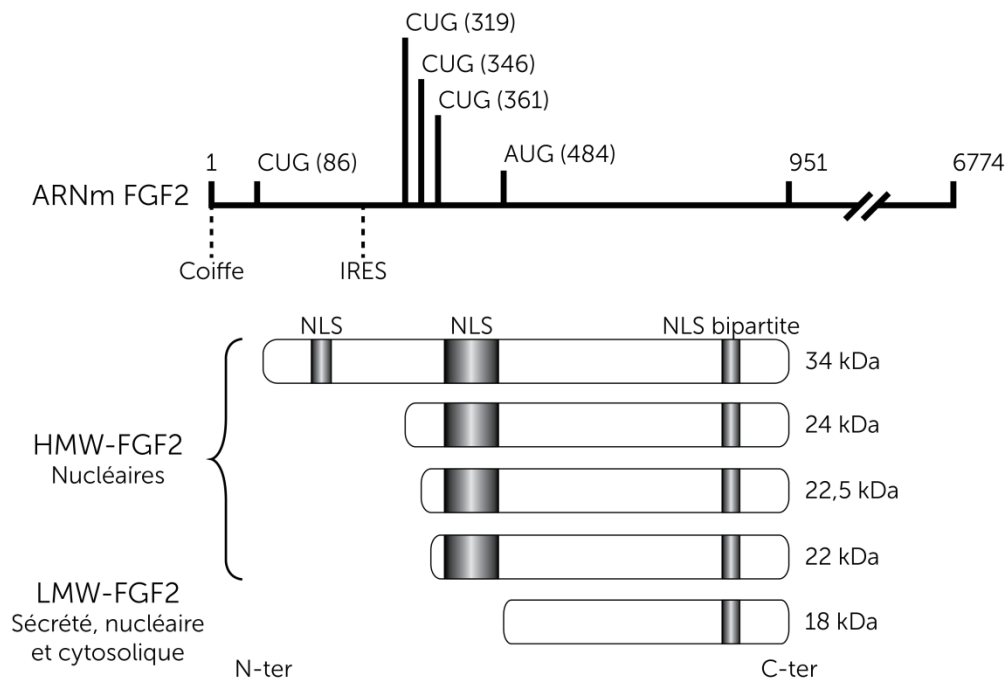


Figure 11 : Isoformes du FGF2

Chez l'Homme, cinq isoformes protéiques sont traduites à partir d'un transcrit unique. Il existe quatre isoformes de haut poids moléculaire (HMW-FGF2) et une isoforme de faible poids moléculaire (LMW-FGF2). Ces isoformes possèdent une NLS faible bipartite à leur extrémité C-terminale. Elles diffèrent par leur extrémité N-terminale et possèdent une ou deux NLS supplémentaires selon leur longueur. Le transcrit unique du FGF2 possède un site d'initiation de la traduction classique (AUG) conduisant à la traduction du LMW-FGF2, tandis que les HMW-FGF2 sont traduits à partir de sites de traduction alternatifs (CUG). La traduction de l'isoforme de 34 kDa est coiffe-dépendante, tandis que la traduction des autres isoformes est coiffe-indépendante et dépend de la séquence IRES située en 5' du transcrit. D'après (Sorensen *et al.*, 2006b).

III Les facteurs de croissance intracellulaires : modes d'action

De nombreux autres facteurs de croissance peuvent être soit strictement intracellulaires, comme c'est le cas par exemple pour les FGFs 11 à 14, ou être internalisés suite à leur liaison avec leurs récepteurs membranaires. Certains d'entre eux peuvent ensuite être nucléarisés et réguler la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN ou encore le métabolisme des ARN. On retrouve également une corrélation entre la localisation nucléaire de ces facteurs et la progression tumorale ainsi qu'un mauvais pronostic vital pour les patients (Planque, 2006).

1 - Les FGFs intracellulaires

1.1 - Le FGF2

La transcription du *FGF2* résulte en un transcrite unique possédant plusieurs sites alternatifs d'initiation de la traduction qui produisent ainsi différentes isoformes protéiques (Florkiewicz and Sommer, 1989; Prats *et al.*, 1989). Cinq isoformes humaines sont décrites et regroupées selon leur poids moléculaire (**Figure 11**). Ces isoformes diffèrent par leur localisation subcellulaire et leurs activités.

Le codon d'initiation classique AUG produit l'isoforme FGF2 de 18 kDa, dite de faible poids moléculaire (LMW) et majoritairement cytoplasmique (Renko *et al.*, 1990). Elle est constituée des 155 acides aminés de l'extrémité C-terminale qui représentent la séquence commune à toutes les autres isoformes du FGF2. Elle contient une séquence NLS faible bipartite dans sa région C-terminale qui permet au LMW-FGF2 d'être localisé dans le cytoplasme et le noyau, et plus particulièrement le nucléole (Bugler *et al.*, 1991; Sheng *et al.*, 2004).

Les autres isoformes sont dites de haut poids moléculaire (HMW) et sont produites à partir de quatre codons d'initiation CUG alternatifs. La protéine complète est l'isoforme de 34 kDa, dont la traduction est coiffe-dépendante (Arnaud *et al.*, 1999). La traduction des trois autres isoformes (24, 22,5 et 22 kDa) ainsi que du LMW-FGF2 est coiffe-indépendante et dépend du site IRES présent dans la région 5' du transcrite. Les HMW-FGF2 diffèrent par leur domaine N-terminal qui selon sa longueur peut contenir une ou deux séquences NLS supplémentaires fortes (Arnaud *et al.*, 1999; Quarto *et al.*, 1991). Ils sont majoritairement localisés dans le noyau (Bugler *et al.*, 1991; Renko *et al.*, 1990).

Les isoformes intracellulaires du FGF2 présentent des activités similaires à celles du FGF1 : elles peuvent induire la prolifération de différents types cellulaires comme les fibroblastes (Arese *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1993). Elles peuvent aussi induire la migration cellulaire, l'angiogenèse, et présentent une activité tumorigène (Huang *et al.*, 1994; Maret *et al.*, 1995; Sherman *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1993). Les isoformes du FGF2 interagissent avec différents

partenaires qui présentent des localisations subcellulaires variées et permettent l'implication du FGF2 dans différents processus (Patry *et al.*, 1997; Sorensen *et al.*, 2006b).

a) Le LMW-FGF2 (18 kDa)

Aucune des isoformes du FGF2 ne possède de peptide signal de sécrétion, mais comme le FGF1, le FGF2 de faible poids moléculaire peut être sécrété indépendamment de la voie du RE-Golgi. Ce mécanisme de sécrétion ATP-dépendant fait intervenir la protéine chaperonne Hsp27 (Florkiewicz *et al.*, 1995; Mignatti *et al.*, 1992; Piotrowicz *et al.*, 1997). À l'instar du FGF1, le LMW-FGF2 extracellulaire peut se lier aux FGFRs et être internalisé et nucléarisé (Baldin *et al.*, 1990; Bikfalvi *et al.*, 1989; Bouche *et al.*, 1987; Malecki *et al.*, 2004). Le LMW-FGF2 intracellulaire ou internalisé possède une activité mitogénique et interagit avec la kinase CK2 dont il régule l'activité nucléoline-dépendante (Bailly *et al.*, 2000; Bonnet *et al.*, 1996; Bossard *et al.*, 2003; Soulet, 2005). Il peut interagir dans le noyau avec la kinase RSK2 et permet ainsi le maintien de l'activation de cette kinase phosphorylant les histones H3 lors de la phase G₁ du cycle cellulaire (Soulet, 2005), avec la translokine/CEP57 (Centrosomal Protein of 57 kDa) qui permettrait la nucléarisation du LMW-FGF2 (Bossard *et al.*, 2003), le facteur de transcription UBF (Upstream Binding Factor) essentiel à la transcription des ARN ribosomiques (Sheng *et al.*, 2005) (**Figures 11-12**). Le LMW-FGF2 cytoplasmique pourrait également interagir dans le cytoplasme avec la protéine ribosomale RPS19 (Ribosomal Protein S19) libre, ou associée à la sous-unité 40S (Soulet *et al.*, 2001). La signification biologique de cette interaction n'a pas encore été élucidée.

a) Les HMW-FGF2 (22, 22,5, 24 et 34 kDa)

Les isoformes de haut poids moléculaire possèdent, en plus de la séquence NLS C-terminale faible bipartite et commune à tous les FGF2, une à deux NLS supplémentaires fortes à leur extrémité N-terminale et sont majoritairement nucléaires et nucléolaires (Arese *et al.*, 1999; Bugler *et al.*, 1991; Gualandris *et al.*, 1999). L'analyse par microarray de fibroblastes 3T3 exprimant les isoformes de haut poids moléculaires a mis en évidence des profils transcriptionnels différents des fibroblastes exprimant le LMW-FGF2. Les résultats obtenus suggèrent que les HMW-FGF2 induisent l'expression de suppresseurs de tumeurs et d'inhibiteurs de la croissance cellulaire. On retrouve par exemple parmi les gènes transcriptionnellement activés par les HMW-FGF2 *Nfl-X* et *Nupr1*, impliqués dans l'arrêt de la croissance, ou encore les suppresseurs de tumeur *p53* et *St5* (Quarto *et al.*, 2005). Les HMW-FGF2 induisent la survie cellulaire et la prolifération en absence de sérum (Arese *et al.*, 1999; Bikfalvi *et al.*, 1995; Gualandris *et al.*, 1999; Hortala *et al.*, 2005), la transdifférenciation de précurseurs de cellules neurales en mélanocytes (Sherman *et al.*, 1993), le développement de métastases (Okada-Ban *et al.*, 1999; Thomas-Mudge *et al.*, 2004) ou encore une résistance aux

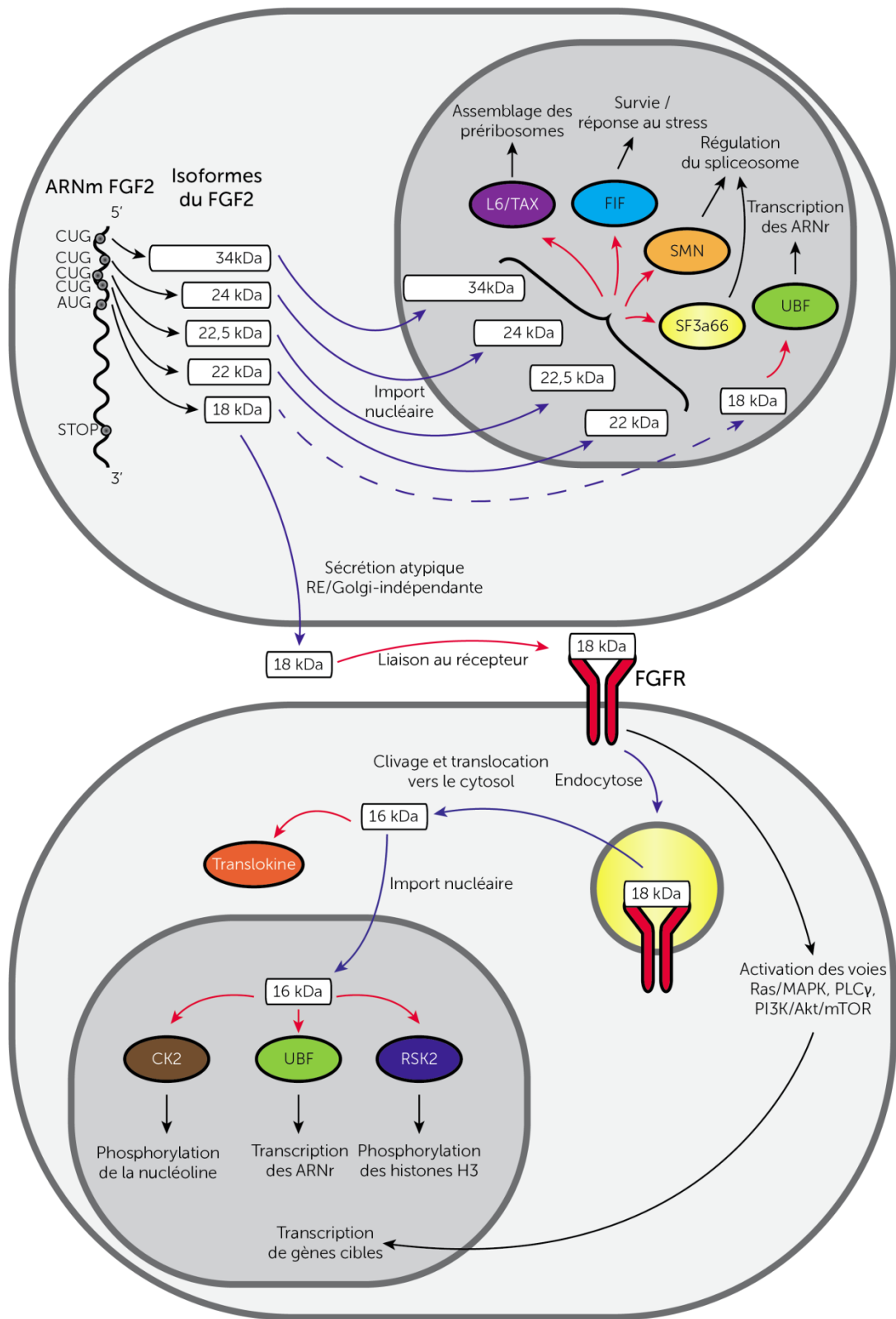


Figure 12 : Activités des isoformes du FGF2

Les isoformes du FGF2 produites dans une cellule peuvent être transportées dans différents compartiments subcellulaires (flèches bleues) et interagir avec différentes molécules (interactions directes indiquées par les flèches rouges). Les isoformes de 22 à 34 kDa issues de sites d'initiation de la traduction alternatifs (CUG) sont importées et s'accumulent dans le noyau. Le FGF2^{18kDa} endogène

peut aussi être nucléarisé. Dans le noyau, les FGF2 peuvent interagir avec L6/Tax, impliqué dans l'assemblage des préribosomes, FIF, impliqué dans la régulation de la survie et de la réponse au stress, ou SMN et SF3a66, impliqués dans la régulation du spliceosome. Le FGF2^{18kDa} peut interagir avec UBF et réguler la transcription des ARNr. Seule l'isoforme de 18 kDa peut être sécrétée par un mécanisme indépendant de la voie de sécrétion classique médiée par le RE/Golgi. Le FGF2 extracellulaire se lie au FGFR. Le FGFR activé peut activer les voies de signalisation Ras/MAPK, PLC γ , PI3K/Akt/mTOR et ainsi activer la transcription de gènes cibles de ces voies. Le complexe FGF2-FGFR est endocyté. Le FGF2^{18kDa} endocyté est alors clivé en une forme de 16 kDa et transloque vers le cytosol. Il peut alors lier la translokine, impliquée dans le transport nucléaire du FGF2. Le FGF2^{18kDa} internalisé et nucléarisé peut se lier et activer CK2, qui phosphoryle la nucléoline et régule la biogenèse des ribosomes. Le FGF2 peut interagir avec UBF et réguler la transcription des ARNr soit de façon endogène, soit après internalisation. Le FGF2 peut se lier à RSK2, et lui permet de maintenir son activité durant la transition G₀-G₁ et phosphoryle les histones H3. D'après (Sorensen *et al.*, 2006b)

radiothérapies (Cohen-Jonathan *et al.*, 1997). Il est intéressant de noter que cette radiorésistance peut être corrélée à une forte expression du FGF2 dans les gliomes et méningiomes, des tumeurs cérébrales peu sensibles aux radiothérapies (Takahashi *et al.*, 1990). Les HMW-FGF2 sont de puissants facteurs angiogéniques dont les mécanismes d'action ne sont pas encore décryptés, mais qui semblent impliquer des crosstalks complexes avec le facteur de transcription pro-angiogénique HIF-1 α (Hypoxia-Induced Factor 1 α) (Conte *et al.*, 2008; Javerzat *et al.*, 2002).

Ces isoformes peuvent interagir dans le compartiment nucléaire avec la protéine anti-apoptotique FIF (FGF2 Interacting Factor) (Van den Berghe *et al.*, 2000), avec la protéine ribosomale L6/Tax impliquée dans l'assemblage des préribosomes (Shen *et al.*, 1998), avec le facteur de survie des motoneurones SMN (Survival of motoneuron protein) (Claus *et al.*, 2003, 2004) et la sous-unité de 66 kDa du facteur d'épissage 3a (SF3a66) pour réguler la machinerie d'épissage (Gringel *et al.*, 2004) (**Figure 11-12**).

1.2 - Le FGF3

Le transcrite FGF3 possède deux sites d'initiation de la traduction : un codon d'initiation AUG classique et un codon alternatif CUG produisant respectivement une isoforme courte et une isoforme longue. Elles contiennent toutes les deux un peptide signal clivable permettant au FGF3 d'être sécrété par la voie classique du RE-Golgi, ainsi que deux séquences NLS à l'extrémité C-terminale permettant sa nucléarisation. L'isoforme longue est le produit majeur de traduction et peut à la fois être sécrétée ou transloquée au noyau (Kiefer *et al.*, 1994). Une fois nucléarisé, le FGF3 se localise principalement dans le nucléole grâce à une séquence de rétention nucléolaire (Kiefer and Dickson, 1995). Le FGF3 a des rôles opposés selon qu'il est sécrété ou nucléarisé. Le FGF3 extracellulaire possède une activité mitogénique FGFR-dépendante (Mathieu *et al.*, 1995a, 1995b), tandis que le

FGF3 nucléaire/nucléolaire est impliqué dans l'arrêt de la croissance cellulaire (Kiefer and Dickson, 1995).

À ce jour, deux partenaires nucléaires du FGF3 ont été identifiés *via* un crible double-hybride. Le FGF3 interagit avec la protéine nucléolaire NoBP/EBP2 (Nucleolar Binding Protein ou EBNA1-binding protein 2), qui régule les activités nucléolaires de c-Myc et promeut l'expression des ARNr (Liao *et al.*, 2014). L'expression de NoBP est régulée durant le cycle cellulaire et atteint son pic en fin de phase G₁-début de phase S. La surexpression de NoBP dans des fibroblastes 3T3 stimule leur croissance, et diminue l'effet inhibiteur du FGF3 nucléolaire sur la croissance cellulaire dans des cellules épithéliales mammaires (Reimers *et al.*, 2001). Le FGF3 interagit également avec la protéine ribosomale rpS2 (Ribosomal Protein S2), un composant des ribosomes (Antoine *et al.*, 2005). Le FGF3 nucléaire inhiberait la croissance cellulaire en ciblant NoBP et en perturbant la biosynthèse des ribosomes.

1.3 - Les FGFs 11 à 14 (FHF)

Les FGFs 11 à 14 sont également nommés FHF pour Fibroblast growth factor Homologous Factors, et sont strictement intracellulaires. Chaque gène FHF possède au moins deux sites d'initiation de la transcription générant plusieurs ARNm. Le premier exon alternatif est épissé aux quatre exons communs II à V. Les isoformes protéiques diffèrent par leur région N-terminale et sont classées en deux groupes A et B. Les isoformes longues A sont majoritairement nucléaires grâce à la présence d'une NLS bipartite dans leur région N-terminale, tandis que les isoformes B dépourvues de cette NLS sont cytoplasmiques (Munoz-Sanjuan *et al.*, 2000; Smallwood *et al.*, 1996). Les FHF sont principalement exprimés dans les cellules neuronales.

Ils sont incapables d'activer les FGFRs (Olsen *et al.*, 2003), mais interagissent avec l'extrémité C-terminale de canaux sodiques voltage-dépendants (Na_v), dont ils ont depuis été identifiés comme des régulateurs majeurs (Liu *et al.*, 2001, 2003). Ils réguleraient également les canaux calciques voltage-dépendants (Ca_v) et la transmission synaptique (Pablo and Pitt, 2014). Ils sont d'ailleurs impliqués dans de nombreuses neuropathologies, comme l'ataxie spinocérébelleuse 27 (SCA27) (van Swieten *et al.*, 2003). D'autre part, il a été montré que les FHF 11 et 12 interagissent avec la protéine IB2 (Islet Brain 2), ce qui permet le recrutement et l'activation des MAPK (Schoorlemmer, 2002; Schoorlemmer and Goldfarb, 2001).

2 - Internalisation des facteurs de croissance et de leurs récepteurs

De nombreux complexes facteur de croissance-récepteur ont été décrits comme pouvant être internalisés et exercer des activités intracellulaires, comme les FGF-FGFR, NGF-NGFR, VEGF-VEGFR ou EGF-EGFR.

2.1 - FGFRs

Les FGFR-1 (Maher, 1996), -2 (Sabbieti *et al.*, 2005), -3 (Johnston *et al.*, 1995) et -4 (Citores *et al.*, 1999, 2001) peuvent être internalisés dans la cellule et pour certains d'entre eux être transloqués dans le compartiment nucléaire. Les FGFRs ne possédant pas de NLS, la translocation nucléaire se fait vraisemblablement *via* leur interaction avec des protéines pouvant être nucléarisées (FGF1, 2, RSK...). La nucléarisation du FGFR1 dépend de l'importine β (Reilly and Maher, 2001).

L'internalisation du FGFR1 est la plus étudiée et semble faire intervenir deux mécanismes distincts. Après liaison du ligand (par exemple FGF2) au FGFR membranaire, le complexe FGF-FGFR1 peut être internalisé indépendamment des vésicules à manteau de clathrine ou des cavéoles (**cf. Internalisation du FGF1** – p. 35). Cependant, le FGFR1 cytoplasmique ou nucléaire pourrait également provenir du RE avant qu'il n'atteigne le Golgi, puisqu'une grande partie du FGFR1 nucléaire n'est pas glycosylé (Stachowiak *et al.*, 2007).

Au sein du noyau, le FGFR1 peut interagir avec la protéine RSK1 d'une part et avec la protéine CBP/p300 (CREB Binding Protein) d'autre part. La balance des interactions entre FGFR1, CBP et RSK1 détermine le destin cellulaire (**Figure 13**). En effet, l'interaction entre CBP et RSK1 induit la prolifération cellulaire, tandis que la dissociation de ce complexe induit la différenciation cellulaire. De ce fait, l'interaction entre le FGFR1 et CBP d'une part, et FGFR1 et RSK1 d'autre part, diminue la formation du complexe CBP-RSK1 et induit ainsi la différenciation (Stachowiak *et al.*, 2007). En effet, dans des cellules de type neuronal (cultures primaires ou lignées), CBP et le FGFR1 vont activer la transcription en augmentant l'activité de l'ARN polymérase II et l'acétylation des histones (Fang *et al.*, 2005). Le FGFR1 participe ainsi à la régulation de gènes comme le FGF2 ou la tyrosine hydroxylase (TH) (Peng *et al.*, 2002) et stimule la différenciation de culture primaires neuronales humaines. Dans des cellules souches embryonnaires, le FGFR1 nucléaire se lie aux promoteurs de nombreux gènes pour réguler leur transcription durant leur différenciation en cellules neuronales. Il réprime l'expression de gènes impliqués dans la pluripotence (*Foxd3*, *Rest...*), et active l'expression de gènes impliqués dans la différenciation neuronale (*Pax3*, *Irx3...*) (Terranova *et al.*, 2015).

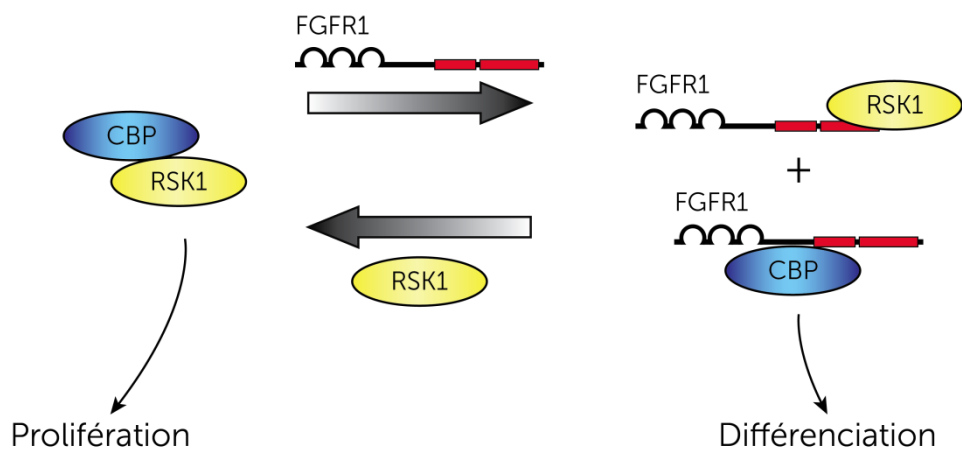


Figure 13 : Un équilibre dynamique entre FGFR1, CBP et RSK1

Le FGFR1, CBP et RSK1 forment un équilibre dynamique. Dans les cellules en prolifération, CBP et RSK1 sont associés en un complexe incapable d'activer les gènes impliqués dans la différenciation cellulaire. L'accumulation nucléaire de FGFR1 perturbe le complexe CBP-RSK1 inactif. La liaison du FGFR1 à CBP active la transcription de gènes impliqués dans la différenciation. D'après (Stachowiak *et al.*, 2007).

2.2 - NGF et NGFR

Les effets du NGF sont classiquement médiés par sa liaison à l'un de ses deux récepteurs : son récepteur de haute affinité TrkA (Tropomyosine Receptor Kinase A) à activité tyrosine kinase, ou bien son récepteur de faible affinité p75NTR (p75 Neurotrophin Receptor), premier membre de la superfamille des récepteurs TNF (Tumor Necrosis Factor) à avoir été identifié.

Suite à sa liaison à TrkA, le complexe TrkA-NGF peut être internalisé, indépendamment de l'activité tyrosine kinase du récepteur (Hosang and Shooter, 1987; Kahle *et al.*, 1994). Dans les cellules PC12, le complexe est internalisé par la voie des vésicules à manteau de clathrine. Il est ensuite retrouvé dans les endosomes qui sont acheminés le long des axones par transport rétrograde (Howe and Mobley, 2004; Howe *et al.*, 2001). Les complexes NGF-TrkA membranaires semblent réguler préférentiellement la survie cellulaire, tandis que les complexes internalisés réguleraient la différenciation cellulaire (Zhang *et al.*, 2000).

Une équipe a montré dans les années 1980 que le NGF pourrait également être transloqué dans le noyau où il se lierait à la chromatine (Rakowicz-Szulczynska, 1993; Rakowicz-Szulczynska and Koprowski, 1989; Rakowicz-Szulczynska *et al.*, 1986, 1991). Cette liaison du NGF à la chromatine inhiberait la synthèse des ARN ribosomiques et la prolifération cellulaire dans les cellules issues de mélanomes ou les mélanocytes. Dans la lignée de cancer du sein SKBr5, la localisation nucléaire du NGF est retrouvée, cependant aucune inhibition de la synthèse des ARN ribosomiques n'a été détectée, suggérant l'implication d'un autre mécanisme (Rakowicz-Szulczynska, 1993).

2.3 - VEGF et VEGFR

Le VEGF est un acteur majeur de la vasculogénèse et de l'angiogénèse *in vitro* et *in vivo* (Ferrara *et al.*, 2003). Son action est médiée par trois récepteurs VEGFRs à activité tyrosine kinase (VEGFR1-3) dont le VEGFR2 est l'isoforme angiogénique majeure. La liaison du VEGF au VEGFR2 induit l'endocytose clathrine-dépendante du récepteur dans des cellules endothéliales humaines. Le VEGFR2 reste activé par phosphorylation, s'associe à la PLC γ activée et active la voie des MAPK pour induire la prolifération cellulaire. L'abolition de l'internalisation du VEGFR2 restaure l'arrêt de la croissance par inhibition de contact (Lampugnani *et al.*, 2006). Le VEGF intracellulaire active la transcription du gène *VEGFR2* et d'autres marqueurs endothéliaux comme *Tie-2* et *VE-Cadherin* (E *et al.*, 2012).

Le VEGF et les VEGFRs peuvent aussi être nucléarisés. Dans des cellules endothéliales et des modèles *in vitro* de cicatrisation, l'accumulation de VEGF dans le compartiment nucléaire semble jouer un rôle dans la coagulation et la fibrinolyse (Li and Keller, 2000). Le VEGFR2 complexé au VEGF

peut être nucléarisé dans ce modèle *in vitro* de cicatrisation. Cette nucléarisation est essentielle pour la cicatrisation (Santos *et al.*, 2007). Dans ces cellules, le VEGFR2 nucléaire se lie au facteur de transcription SP1 (Specificity Protein 1), impliqué dans l'angiogenèse, qui possède un site de fixation dans le promoteur proximal du *VEGFR2* et régule ainsi sa propre transcription (Domingues *et al.*, 2011).

Dans des cellules de cancer mammaire, le VEGFR1 colocalise avec les lamines A/C, des protéines de structure nucléaire, et est principalement détecté au niveau de l'enveloppe nucléaire. Dans ces cellules, le VEGF induit la survie cellulaire *via* le VEGFR1. Ce dernier induit la phosphorylation d'Akt, une voie de survie majeure dans les cancers du sein (Lee *et al.*, 2007).

2.4 - EGF et EGFR

La liaison de l'EGF avec son récepteur à activité tyrosine kinase (EGFR) active des voies de signalisation classiques comme PI3K/Akt/mTOR, Ras/MAPK ou PLC γ /PKC et régule ainsi notamment la prolifération ou la survie cellulaire. L'activation de ces différentes voies est modulée par l'endocytose de l'EGFR (Vieira *et al.*, 1996). L'EGF est nucléarisé en complexe avec l'EGFR et stimule la synthèse de l'ADN lors de la régénération du foie (Lin *et al.*, 2001; Raper *et al.*, 1987).

La famille des récepteurs à l'EGF est constituée de quatre membres : **EGFR**/ErbB-1/HER-1, ErbB-2/HER-2/neu, ErbB-3/HER-3 et ErbB-4/HER-4, et tous peuvent être nucléarisés (Wang and Hung, 2012). L'EGFR possède une séquence NLS tripartite qui lui permet d'être transloqué au noyau, *via* son interaction avec l'importine β (Hsu and Hung, 2007; Lo *et al.*, 2006). Sa nucléarisation suite à sa stimulation par l'EGF fait intervenir un transport rétrograde depuis le Golgi vers le RE impliquant les vésicules COPI (Coat Protein I). Sa translocation depuis la membrane du RE vers la membrane nucléaire interne *via* les pores nucléaires est médiée par l'importine β et par le translocon Sec61 β (Lo *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010b, 2010c) (**Figure 14**). Dans le noyau, l'EGFR ou l'EGF se lie à la chromatine et agit comme un facteur/co-facteur de transcription en interagissant notamment avec les facteurs de transcription STAT3, STAT5 ou E2F1 (Brand *et al.*, 2013; Rakowicz-Szulczynska *et al.*, 1986). L'EGFR régule ainsi l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la tumorigenèse, l'instabilité chromosomique et la chimiorésistance comme *cyclin D1*, *B-Myb*, *iNOS*, *Aurora-A*, *COX-2*, *c-Myc*, *thymidylate synthase*, ou *BCRP* (Breast Cancer Resistant Protein) (Hanada *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2011; Hung *et al.*, 2008; Jaganathan *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 2005, 2010). La localisation nucléaire de l'EGFR est associée à un mauvais pronostic vital des patientes atteintes de cancers du sein (Lo *et al.*, 2005) ou des ovaires (Xia *et al.*, 2009) car il induit des résistances aux chimiothérapies (Hsu *et al.*, 2009) et aux radiothérapies (Brand *et al.*, 2013).

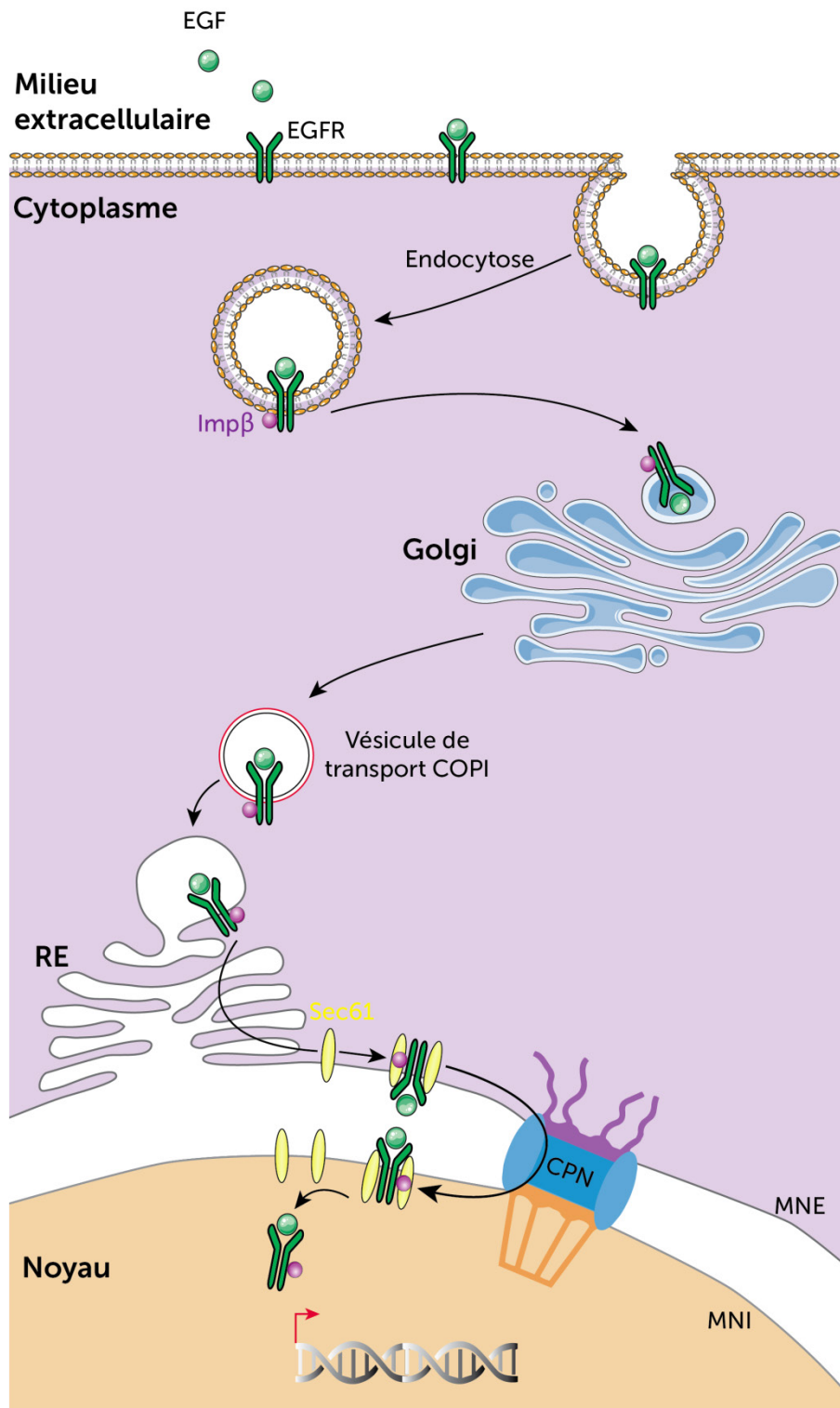


Figure 14 : Modèle d'internalisation et nucléarisation du complexe EGF-EGFR

Le complexe EGF-EGFR est endocyté, la séquence NLS tripartite de l'EGFR lui permet d'être pris en charge par l'importine β ($\text{Imp}\beta$). Sa nucléarisation fait intervenir un transport rétrograde depuis le Golgi vers le RE impliquant les vésicules COPI (Coat Protein I). Sa translocation depuis la membrane du RE vers la membrane nucléaire interne *via* les complexes de pores nucléaires (CPN) est médiée par l'importine β et par le translocon Sec61 β . Dans le noyau, l'EGFR se lie à la chromatine et agit comme un facteur/co-facteur de transcription. MNE : Membrane nucléaire externe ; MNI : membrane nucléaire interne. Adapté de (Wang *et al.*, 2010b, 2010c).

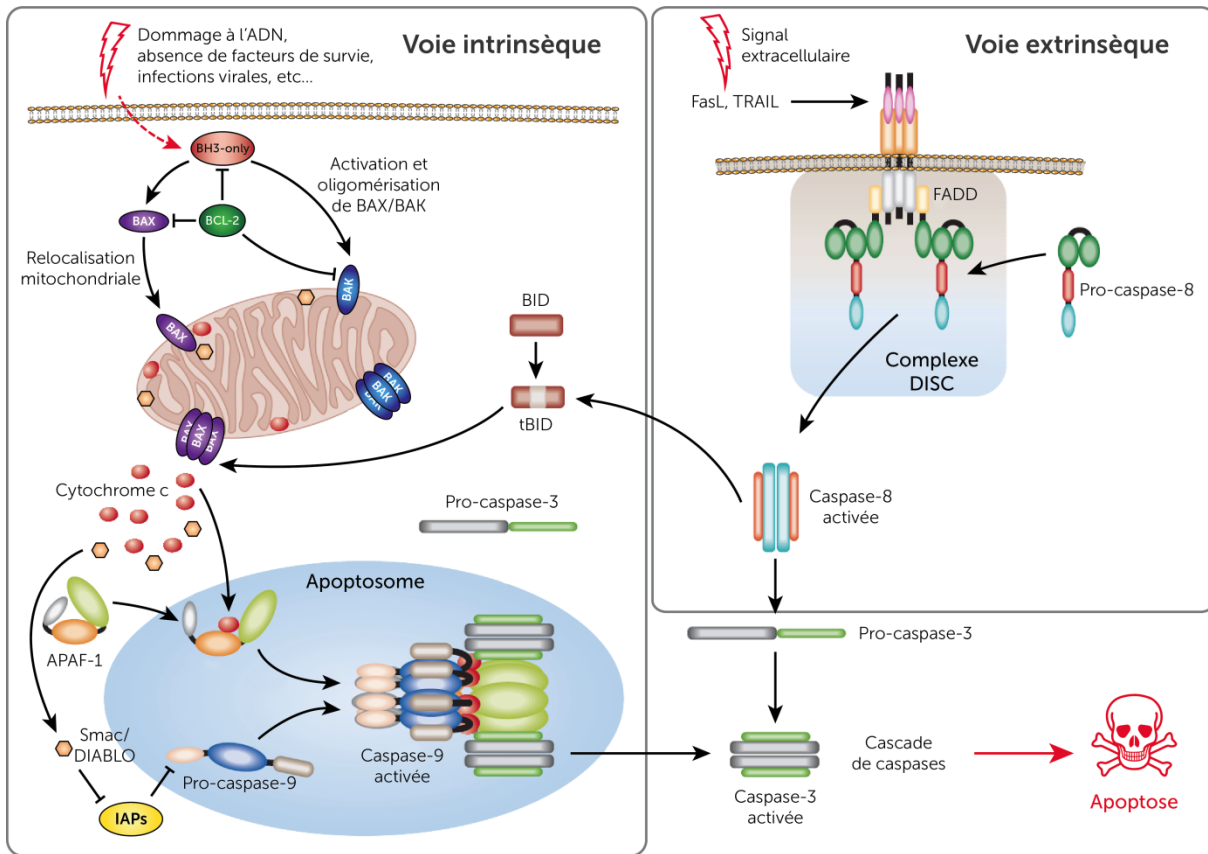


Figure 15 : Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose

Il existe deux voies principales de signalisation de l'apoptose : la voie extrinsèque, ou voie des récepteurs à domaine de mort, et la voie intrinsèque, ou voie mitochondriale. La voie intrinsèque peut être activée par différents stimuli comme des dommages à l'ADN, une absence de facteurs de croissance ou encore une infection virale. Ces deux voies aboutissent à l'activation des protéines effectrices de l'apoptose, les caspases. La voie extrinsèque peut activer la voie mitochondriale de l'apoptose *via* le clivage de BID en tBID. Adapté de (MacFarlane and Williams, 2004).

IV L'apoptose

1 - Généralités

L'apoptose est un type de mort cellulaire programmée identifiée et décrite pour la première fois en 1972 par Kerr, Wyllie et Currie. Elle se caractérise par une condensation du cytoplasme et du noyau, une fragmentation de l'ADN puis la formation de corps apoptotiques. Ceux-ci sont reconnus puis phagocytés par les cellules environnantes, comme les macrophages (Kerr *et al.*, 1972).

L'apoptose joue un rôle central au cours du développement ainsi que dans l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Il s'agit d'un processus conservé au cours de l'évolution qui intervient dans le développement normal des organismes pluricellulaires et dans l'élimination des cellules endommagées ou devenues dangereuses. Elle est requise lors de l'embryogenèse dans de nombreux processus comme la morphogenèse et l'élimination des tissus interdigitaux, l'établissement du dimorphisme sexuel *via* l'élimination des canaux de Wolff ou Müller, ou encore la neurogenèse (Jacobson *et al.*, 1997).

L'apoptose est un processus qui nécessite d'être finement régulé. En effet, un excès d'apoptose peut conduire par exemple à des pathologies neurodégénératives, tandis qu'à l'inverse un défaut d'apoptose peut provoquer l'émergence de cancers (Mohammad *et al.*, 2015; Thompson, 1995). La mutation de membres de voies de signalisation de l'apoptose est une caractéristique centrale des cancers (Hanahan and Weinberg, 2000) et les dérégulations engendrées participent à expliquer la résistance aux oncothérapies.

Ce processus de mort cellulaire programmée peut être déclenché par des signaux externes ou internes à la cellule. Il existe deux voies principales de signalisation : la voie extrinsèque dite des récepteurs à domaine de mort (TNF-R, TRAIL-R, Fas...), et la voie intrinsèque dite mitochondriale (**Figure 15**) (Fulda and Debatin, 2006; Gupta, 2003; Kiraz *et al.*, 2016). La voie extrinsèque est induite par l'activation des récepteurs à domaine de mort suite à la liaison de leurs ligands (TRAIL, Fas-L...). La voie intrinsèque est induite suite à différents stress intracellulaires, comme des dommages à l'ADN qui conduisent à l'activation de la protéine p53, à la privation en facteurs de survie ou encore à un stress oxydant. Ces deux voies conduisent à l'activation des protéines effectrices de l'apoptose, les caspases (**cysteine-aspatic proteases**). Les caspases activées déclenchent et participent au démantèlement de la cellule (Elmore, 2007; Fiandalo and Kyprianou, 2012; Strasser *et al.*, 1995). Il existe également des voies de signalisation de l'apoptose indépendantes des caspases qui peuvent être médiées par d'autres protéases. On peut noter par exemple les cathepsines (cystéine-, aspartate- et sérine-protéases lysosomales), les calpaïnes (cystéine-protéases cytosoliques), la

serpine/endonucléase LEI/L-DNase II (Leukocyte Elastase Inhibitor/LEI-derived DNase II) ou le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor) qui peuvent médier la fragmentation de l'ADN caspase-indépendante, ou encore d'autres sérine-protéases mitochondriales comme Omi/HtrA2 (High-Temperature Requirement A2), localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial et pouvant être relarguée dans le cytosol (Cregan *et al.*, 2004; Mathiasen and Jäättelä, 2002; Torriglia *et al.*, 2008). Ces voies ne seront pas détaillées ici.

2 - Les caspases

Les caspases sont des protéases dont le site actif comporte une cystéine (QACXG), et qui clivent leurs substrats au niveau de sites consensus du côté C-terminal de résidus aspartate. Ainsi, les caspases -2, -3 et -7 reconnaissent principalement des motifs de type DEXD tandis que les caspases -6, -8 et -9 reconnaissent plutôt des motifs de type (L/V)EXD (Lavrik, 2005). Il existe à ce jour 18 membres décrits chez les mammifères (Eckhart *et al.*, 2008). Elles sont classées en trois groupes principaux selon leurs fonctions : les caspases impliquées dans l'inflammation (caspases-1, -4, -5, -11 et -12), les caspases initiatrices de l'apoptose (caspases-2, -8, -9 et -10), et les caspases effectrices de l'apoptose (caspases-3, -6 et -7). Ces trois groupes n'incluent pas les autres caspases dont les fonctions exactes ne sont pas ou peu connues. La caspase-14 est principalement exprimée dans l'épiderme et serait impliquée dans la différenciation des kératinocytes (Eckhart *et al.*, 2000; Lippens *et al.*, 2000). La caspase-15 pro-apoptotique possède un pro-domaine à structure pyrine atypique et est exprimée chez certains mammifères (chien, cochon, bétail...) mais pas chez l'Homme ou la souris (Eckhart *et al.*, 2005). La caspase-16 est une caspase-14-like présente chez les marsupiaux et les mammifères placentaires incluant l'Homme, contrairement à la caspase-17 (caspase-3-like) qui n'a été retrouvée que chez le poisson, la grenouille, le poulet, le lézard et l'ornithorynque (Eckhart *et al.*, 2008). Enfin, la caspase-18 est une caspase-8-like conservée chez le poulet, l'ornithorynque et l'opossum, mais absente des mammifères placentaires (Eckhart *et al.*, 2008). Seules les caspases initiatrices et effectrices de l'apoptose seront détaillées ici.

Les caspases sont des zymogènes, initialement produites comme des monomères inactifs (pro-caspases) dont l'activation protéolytique nécessite leur dimérisation. Elles ont pour substrat d'autres caspases, ainsi qu'un grand nombre de protéines essentielles à la survie de la cellule. Au cours de l'apoptose, les caspases activées initialement vont cliver et activer d'autres caspases : c'est la cascade d'activation des caspases, qui permet d'amplifier et de prolonger le signal apoptotique. L'activité des caspases peut être régulée par les protéines de la famille des IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein) (Lavrik, 2005; Pop and Salvesen, 2009; Riedl and Shi, 2004; Shalini *et al.*, 2015).

a) Structure et activation des caspases

Les caspases contiennent à leur extrémité N-terminale le pro-domaine. Le long pro-domaine des caspases initiatrices contient un domaine CARD (Caspase-Recruitment Domain) (caspases-2 et -9) ou DED (Death Effector Domain) (caspases-8 et -10). Il permet le recrutement de ces caspases au sein de complexes activateurs plus larges comme le DISC (Death-Inducing Signaling Complex) ou l'apoptosome. Le complexe DISC permet l'activation par homodimérisation des caspases initiatrices 8 et 10 (Boldin *et al.*, 1995). L'apoptosome permet l'activation par homodimérisation de la caspase initiatrice 9 (Zou *et al.*, 1999). En aval de leur pro-domaine se situe un domaine central portant le site catalytique et qui deviendra la grande sous-unité après clivage. À l'extrémité C-terminale se trouve le domaine qui deviendra la petite sous-unité après clivage (**Figure 16**).

L'activation des caspases initiatrices requiert leur dimérisation au sein de complexes activateurs, mais pas leur clivage (Boatright and Salvesen, 2003). L'auto-clivage de la caspase-9 initiatrice pourrait promouvoir son remplacement au sein de l'apoptosome par de nouvelles pro-caspases-9 (Malladi *et al.*, 2009). Les caspases effectrices possèdent un pro-domaine court et sont activées par clivage *via* les caspases initiatrices matures, ou d'autres caspases effectrices activées. Les caspases possèdent des sites de clivage (Asp-X) qui permettent la dissociation des deux sous-unités (Tait and Green, 2010) (**Figure 17**).

b) Substrats des caspases

Une fois activées, les caspases vont pouvoir cliver un très grand nombre de substrats et sont ainsi des acteurs essentiels du démantèlement de la cellule lors de l'apoptose (Fischer *et al.*, 2003).

Les caspases ciblent des protéines de structure comme les constituants du cytosquelette que sont l'actine, les kératines ou les lamines nucléaires (Caulin *et al.*, 1997; Mashima *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1996). Cela participe à la condensation cytoplasmique et nucléaire observée lors de cette mort cellulaire. Elles ciblent également des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN comme PARP (Poly ADP Ribose Polymerase) ou les DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) (Casciola-Rosen *et al.*, 1995; Henkels and Turchi, 1997). Les caspases ciblent la protéine ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated DNase), qui est normalement associée en complexe avec la DNase CAD. Cette dernière participe à la fragmentation de l'ADN caractéristique de l'apoptose (Enari *et al.*, 1998).

La capacité des caspases à affecter de nombreux processus cellulaires provient également du fait que l'on retrouve parmi leurs substrats des facteurs de transcription comme AP-2 α (Activator Protein 2 α), BTF3 (Basic Transcription Factor 3), NFATc1 et NFATc2 (Nuclear Factor of Activated T-cells 1-2),

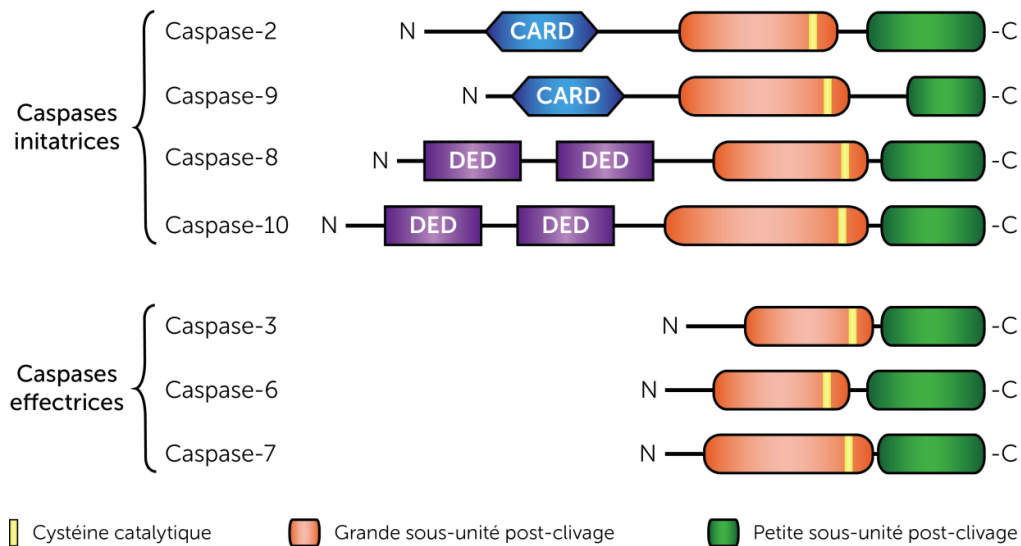


Figure 16 : Structure des caspases

Les caspases sont constituées en C-terminal d'un domaine formant après clivage la petite sous-unité (en vert), d'un domaine central formant après clivage la grande sous-unité (en rouge) et en N-terminal d'un pro-domaine plus ou moins long. Chez les caspases initiatrices, ce pro-domaine contient un domaine CARD ou deux domaines DED permettant le recrutement des caspases au sein de complexes activateurs comme le DISC ou l'apoptosome. Adapté de (Shalini *et al.*, 2015).

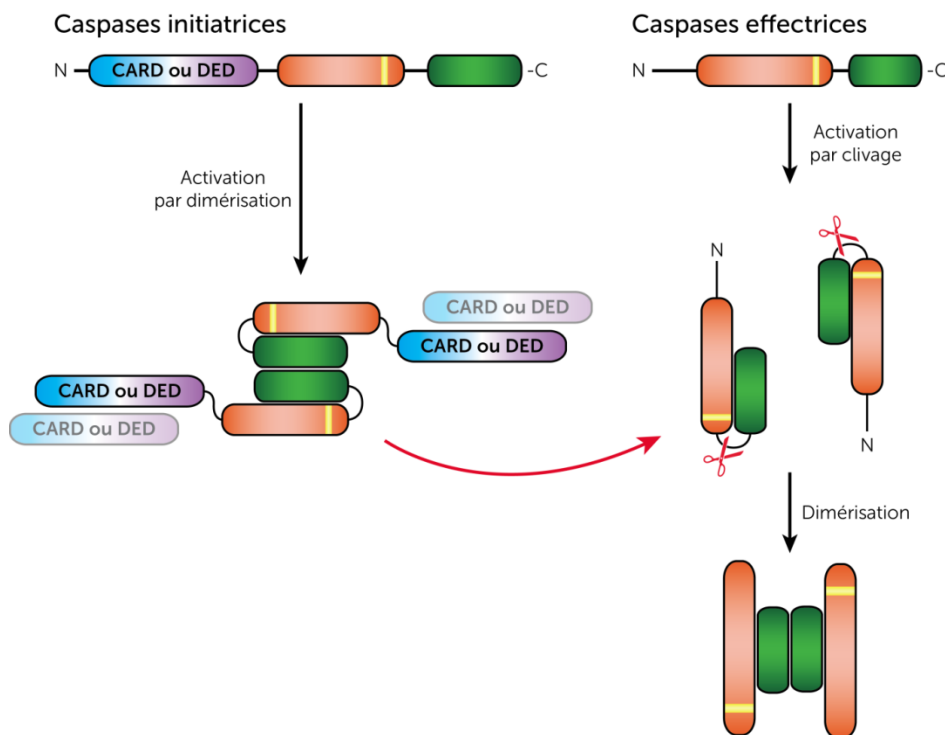


Figure 17 : Activation protéolytique des caspases

Les caspases initiatrices sont recrutées par interactions homotypiques *via* leurs domaines CARD ou DED au sein de complexes activateurs (domaines CARD/DED estompés) permettant leur homodimérisation. Les caspases effectrices sont activées par clivage *via* les caspases initiatrices matures (flèche rouge), et se dimérisent.

NFκBp65 ou SP1, des facteurs d'initiation de la traduction comme eIF2a, eIF3, eIF4B, eIF4E, eIF4G et eIF4H (Eukaryotic translation Initiation Factor) ou encore des protéines ribosomiques comme RPP0 et p70S6K (Lüthi and Martin, 2007), ce qui provoque une extinction relativement précoce de la transcription et de la traduction lors du processus apoptotique (Taylor *et al.*, 2008). Des protéines kinases comme la PKCδ ou les MAPK sont également touchées (Ghayur *et al.*, 1996; Widmann *et al.*, 1998), ainsi que des régulateurs du cycle cellulaire comme Rb ou p21 (Donato, 1998; Rincheval *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 1997).

Les caspases peuvent également cibler des régulateurs de l'apoptose. Elles inactivent par clivage des protéines anti-apoptotiques comme BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2 protein), BCL-x_L, XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis), ou activent des protéines pro-apoptotiques comme BID (BH3 Interacting-Domain death agonist) ou d'autres pro-caspases effectrices (Fischer *et al.*, 2003).

c) Inhibition des caspases par les IAPs

Les protéines de la famille des IAPs ont été identifiées pour la première fois par un crible génétique chez un baculovirus (Crook *et al.*, 1993). Cette famille comporte 8 membres chez les mammifères, dont les plus décrits sont XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis), c-IAP1 et 2 (Cellular Inhibitor of Apoptosis 1 et 2) et la survivine (Chaudhary *et al.*, 2016). Les IAPs possèdent un ou trois domaines BIR (Baculoviral IAP Repeat), et éventuellement un domaine RING (Really Interesting New Gene) qui leur confère une activité E3 ubiquitine ligase (**Figure 18**). Cela leur permet de s'auto-ubiquitinyler, d'ubiquitinyler d'autres IAPs, et d'ubiquitinyler leurs substrats que sont les caspases (Cheung *et al.*, 2008; Silke *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2001b; Yang *et al.*, 2000).

Les IAPs induisent la dégradation des caspases par le protéasome grâce à leur activité E3 ubiquitine ligase. XIAP participe ainsi à la dégradation des caspases-3 et -9 (Morizane, 2005; Suzuki *et al.*, 2001b). De plus, XIAP peut inhiber l'activité des caspases par interaction directe soit en empêchant la dimérisation et donc leur activation, soit en bloquant l'accès du site catalytique aux substrats. XIAP inhibe les caspases -3, -7 *via* son domaine BIR2, et inhibe la caspase-9 *via* son domaine BIR3 (Chai *et al.*, 2001; Riedl *et al.*, 2001; Shiozaki *et al.*, 2003).

L'activité des IAPs peut être régulée par des protéines mitochondriales pro-apoptotiques comme Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with Low PI). Lorsque Smac/DIABLO est relarguée dans le cytosol, sa liaison aux IAPs inhibe l'interaction de ces dernières avec les caspases et active la cascade apoptotique (**cf. Voie intrinsèque de l'apoptose** – p. 62).

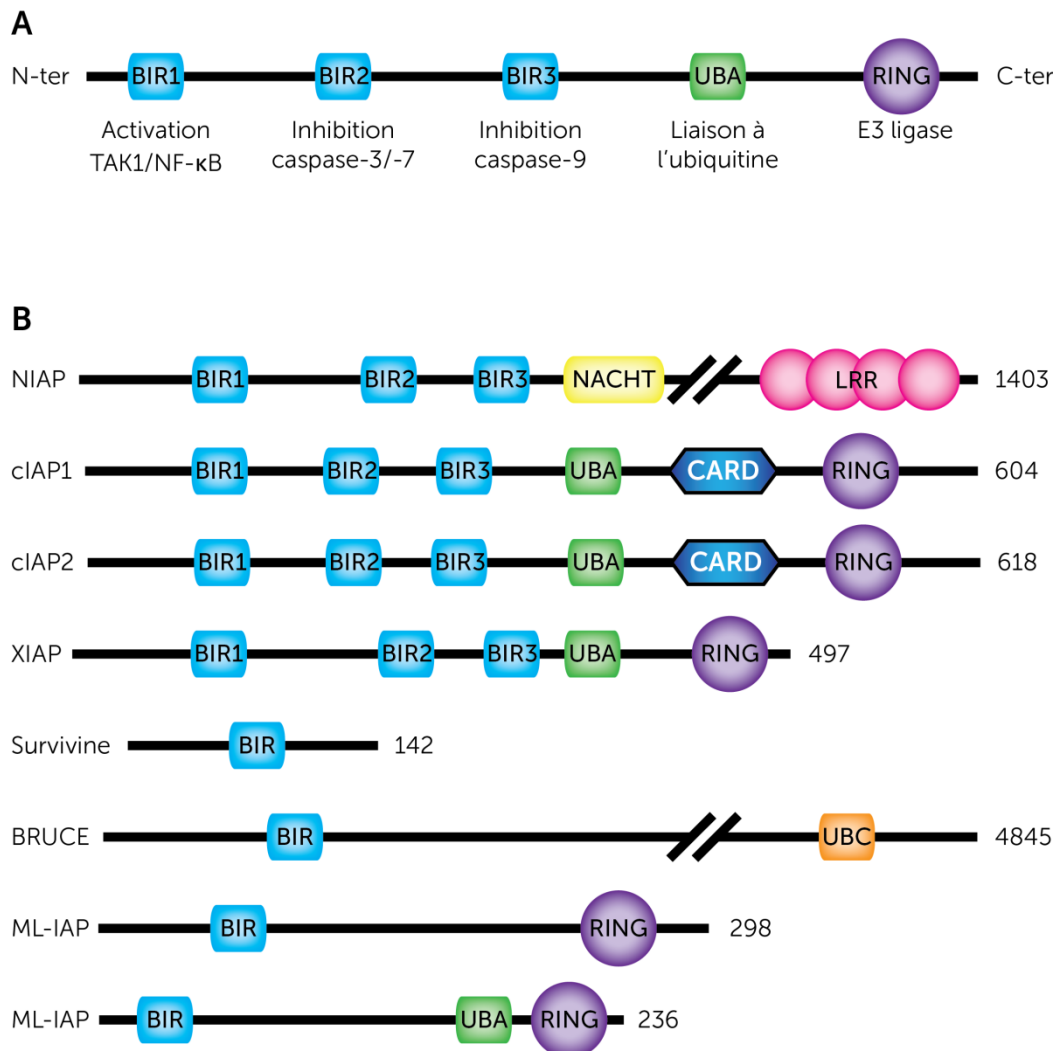


Figure 18 : Structure des IAPs

A : Les IAPs possèdent différents domaines fonctionnels nécessaires à leurs activités. **B** : Les IAPs présentent un ou trois domaines BIR, et peuvent posséder un domaine NACHT/NOD (Nucleotide-binding and Oligomerization Domain), UBA (Ubiquitin-Associated domain), UBC (UBiquitin-Conjugating domain), RING (Really Interesting New Gene domain), CARD (recrutement de caspases), ou LRR (Leucine-Rich Repeats). La longueur en acides aminés figure à l'extrémité droite de chaque protéine. Adapté de (Chaudhary *et al.*, 2016).

3 - Voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque de l'apoptose est médiée par des récepteurs à domaine de mort membranaires de la famille des TNF-R (Tumor Necrosis Factor Receptor) suite à la liaison de ligands aux récepteurs à domaine de mort membranaires comme FasL/Fas, TNF α /TNF-R et TRAIL/TRAIL-R (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) (Li *et al.*, 2013). Ces récepteurs contiennent un domaine de mort (DD pour death domain) dans leur région cytoplasmique qui leur permet de recruter des protéines adaptatrices comme FADD (Fas-Associated Death Domain factor) ou TRADD (TNF-R-Associated Death Domain protein) (Itoh and Nagata, 1993; Nagata, 1997; Tartaglia *et al.*, 1993). Ces protéines adaptatrices contiennent également des DD grâce auxquels elles interagissent homotypiquement avec les récepteurs à domaine de mort (Park *et al.*, 2007). Elles participent à la formation de complexes activateurs de caspases comme le DISC ou le complexe II.

3.1 - Fas

La liaison de FasL à son récepteur Fas entraîne la trimérisation de Fas et le recrutement de la protéine adaptatrice FADD. En plus de son domaine DD lui permettant d'interagir avec les domaines DD des récepteurs, FADD contient un domaine effecteur de mort (DED) homologue à celui des caspases et permettant ainsi leur recrutement. Le complexe ainsi formé est le DISC (**Figure 19A**) et permet de déclencher la cascade apoptotique *via* l'activation des caspases initiateuses -8 et -10 (Boldin *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1995; Kischkel *et al.*, 1995).

3.2 - TNF

La liaison du TNF α à son récepteur TNF-R1 entraîne la trimérisation du récepteur et le recrutement de la protéine adaptatrice TRADD *via* son interaction entre son propre domaine DD et celui du récepteur. TRADD recrute les protéines TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2) et la kinase RIPK1 (Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1), ce qui forme le complexe I. Ce complexe induit la survie cellulaire en activant la voie de signalisation NF- κ B (Nuclear Factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells). Celle-ci induit notamment l'expression de l'inhibiteur de caspase FLIP (FLICE Inhibitory Protein) dont le recrutement au DISC inhibe l'apoptose en bloquant le relargage de la caspase-8 activée (Irmeler *et al.*, 1997). Le complexe I peut être modifié et dissocié du TNF-R1. Le domaine DD de TRADD et/ou RIPK1 est libéré et lie FADD, qui recrute la caspase-8 initiateuse pour former le complexe II et déclencher ainsi l'apoptose (**Figure 19B**) (Hsu *et al.*, 1996; Micheau and Tschopp, 2003).

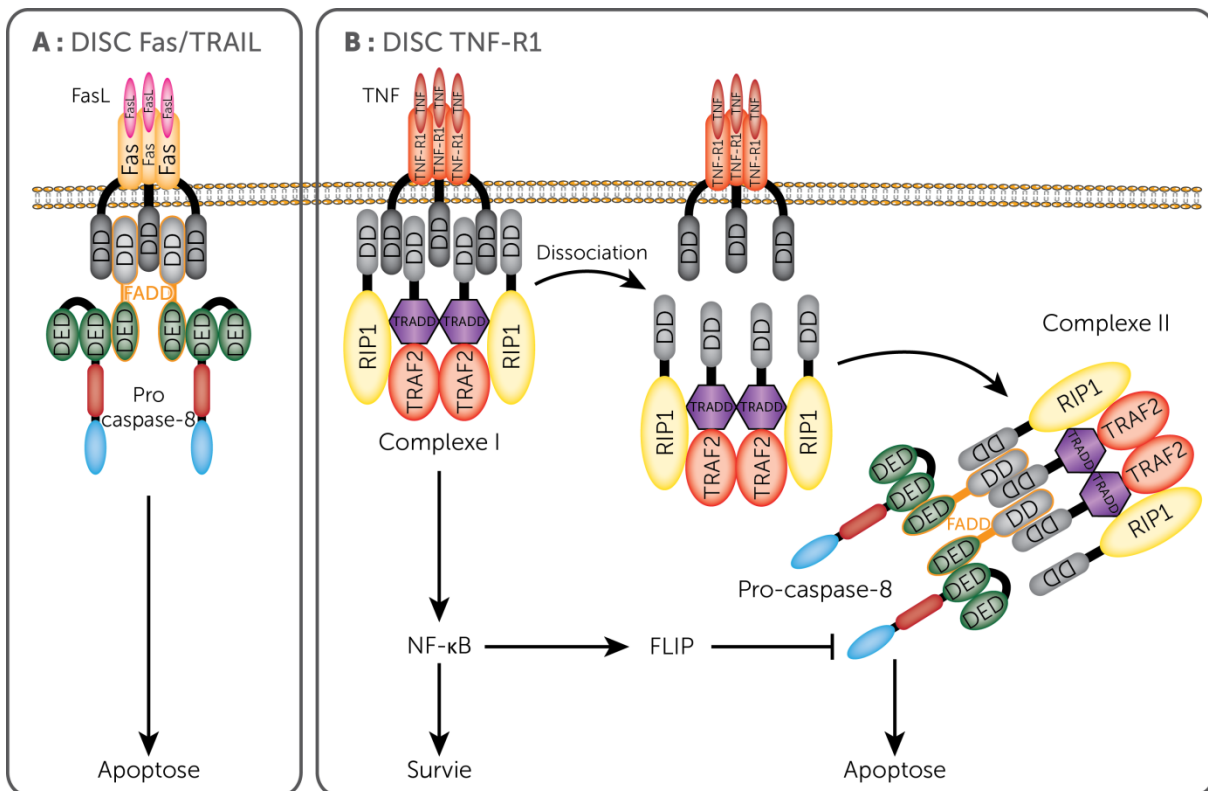


Figure 19 : Les complexes activateurs de la voie extrinsèque de l'apoptose (DISCs)

A : DISC des récepteurs Fas et TRAIL. Le domaine de mort du récepteur Fas recrute la protéine adaptatrice FADD. FADD recrute et active la caspase-8 *via* son domaine DED. **B : DISC du TNF-R1.** Suite à la liaison du TNF à son récepteur TNF-R1, les protéines TRADD, RIP1 et TRAF2 sont rapidement recrutées et forment le complexe I. Le complexe I peut induire la survie en activant la voie NF- κ B et en induisant l'expression de l'inhibiteur de caspase-8 FLIP. Le complexe I peut se dissocier de TNF-R1, et le domaine DD de TRADD et/ou RIP1 est libéré et lie FADD qui recrute la caspase-8 et forme le complexe II. La caspase-8 est activée et induit l'apoptose. Adapté de (Li and Yuan, 2008).

4 - Voie intrinsèque de l'apoptose

La voie mitochondriale de l'apoptose peut être activée par une grande variété de stimuli comme un stress génotoxique, une privation en facteurs de survie ou encore un stress oxydant. Les dommages à l'ADN vont principalement activer p53, un facteur de transcription régulant un grand nombre de gènes impliqués notamment dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, comme les membres de la famille BCL-2. Au cours de la voie mitochondriale de l'apoptose, ces derniers participent à la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) ainsi qu'à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Des protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire mitochondrial comme le cytochrome c sont alors relarguées dans le cytosol et participent à la formation du complexe activateur de la caspase-9, l'apoptosome (Estaquier *et al.*, 2012; Gupta, 2003).

4.1 - Apoptosome

Le relargage du cytochrome c dans le cytosol lui permet de s'associer à la protéine d'échafaudage APAF-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor 1). APAF-1 possède un domaine CARD à son extrémité N-terminale qui lui permet de recruter la pro-caspase-9, un domaine central NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain) permettant son oligomérisation, ainsi qu'un domaine WD40 répété en C-terminal. L'interaction du cytochrome c avec le domaine WD40 permet l'heptamérisation d'APAF-1 en présence d'ATP *via* son domaine NOD, puis le recrutement de la pro-caspase-9 *via* leurs domaines CARD respectifs (**Figure 20**) (Hu, 1998; Li *et al.*, 1997). La pro-caspase-9 est libérée par Smac/DIABLO de son interaction avec l'inhibiteur XIAP et s'autoactive au sein de l'apoptosome. Elle active par clivage les caspases effectrices 3, 6 et 7 et déclenche ainsi l'apoptose (Acehan *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 1997).

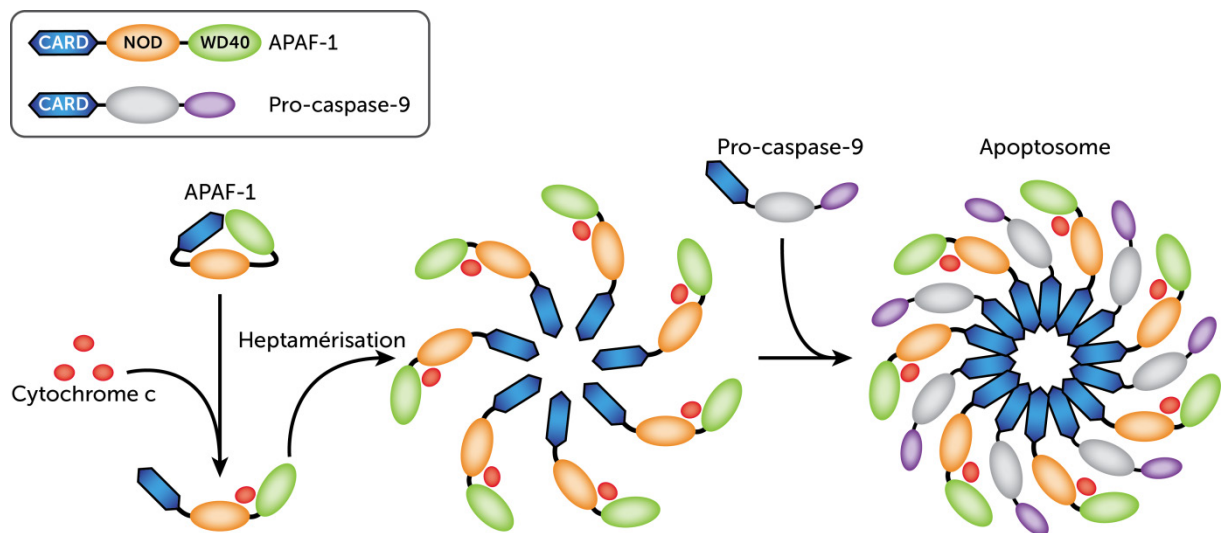


Figure 20 : Formation de l'apoptosome

L'interaction du cytochrome c avec le domaine WD40 d'APAF-1 induit une modification de la conformation d'APAF-1 et son heptamérisation *via* son domaine NOD. La pro-caspase-9 est recrutée par APAF-1 grâce à leurs domaines CARD respectifs, et le complexe APAF-1/Cytochrome c/Caspase-9 forme l'apoptosome, capable d'activer les caspases effectrices 3, 6 et 7.

4.2 - La famille BCL2 : régulateurs des évènements mitochondriaux

Les évènements mitochondriaux de l'apoptose sont régulés par les membres de la famille BCL-2 qui partagent des domaines d'homologie (BH pour BCL-2 Homology) (**Figure 21**). Cette famille peut être divisée en trois catégories :

- les membres anti-apoptotiques comme BCL-2, BCL-x_L ou MCL-1, qui possèdent un domaine transmembranaire et de deux à quatre domaines BH ;
- les effecteurs de l'apoptose comme BAX et BAK, qui possèdent un domaine transmembranaire et trois domaines BH (BH1, 2 et 3) ;
- les protéines dites « BH3-only » comme PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis) ou NOXA ne possédant qu'un seul domaine BH3 médient les signaux pro-apoptotiques, et pouvant posséder un domaine transmembranaire.

Les effecteurs de l'apoptose BAX et BAK induisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et permettent ainsi la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial et la libération dans le cytosol de facteurs apoptogéniques (cytochrome c, Smac/DIABLO...) qui activeront la cascade des caspases. L'activité de ces effecteurs est positivement régulée par les protéines pro-apoptotiques BH3-only, et négativement par les membres anti-apoptotiques comme BCL-2, BCL-x_L ou MCL-1. Il existe une balance entre les membres anti- et pro-apoptotiques de la famille BCL-2, responsable du destin de la cellule et soumise à de nombreuses régulations (**Figure 22**) (Czabotar *et al.*, 2013a; Delbridge *et al.*, 2016).

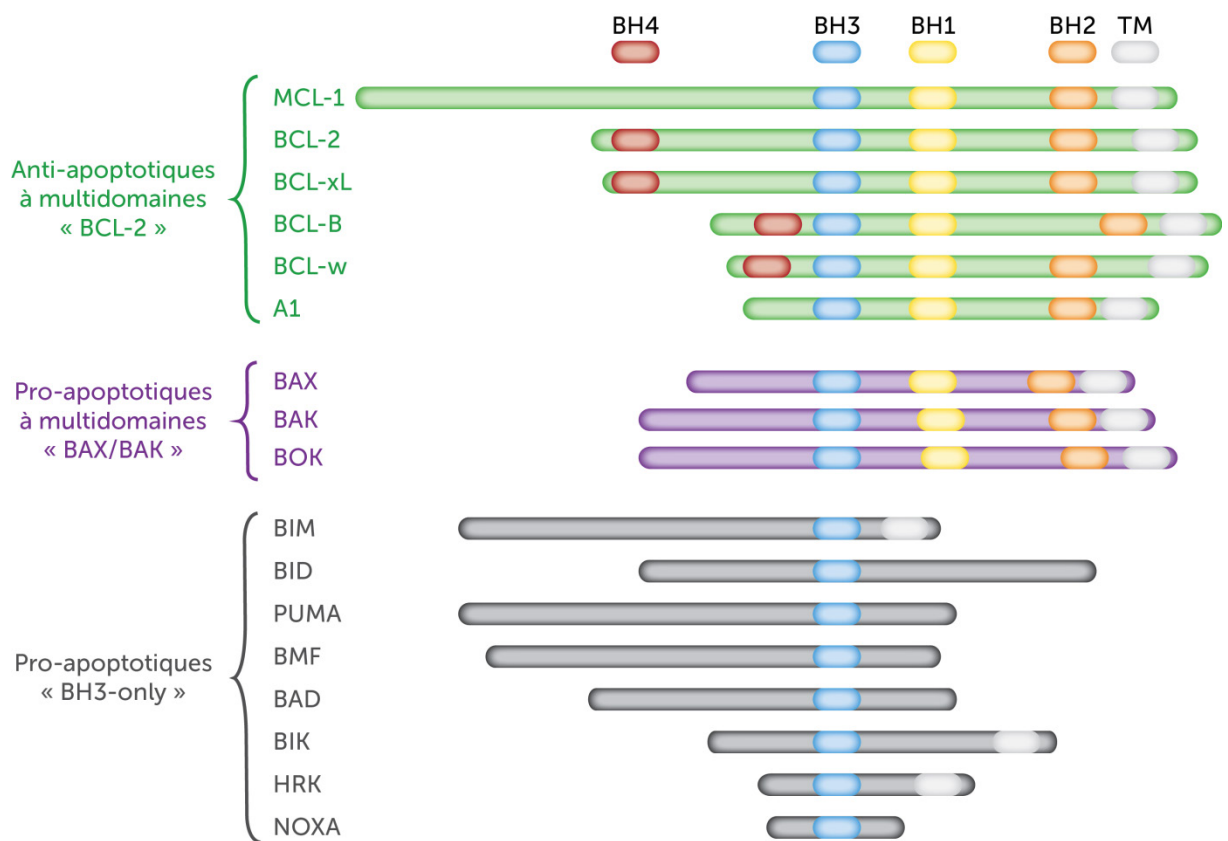


Figure 21 : La famille BCL-2

La famille BCL-2 est divisée en trois groupes : les **protéines anti-apoptotiques à multidomaines BH** comme BCL-2, BCL-x_L ou MCL-1 ; les **protéines pro-apoptotiques à multidomaines BH** comme BAX et BAK ; les **protéines pro-apoptotiques à domaine BH3-only** comme PUMA, NOXA, BID ou BAD. Ces protéines peuvent posséder un domaine TM (transmembranaire) leur permettant de s'ancrer dans la membrane mitochondriale. Adapté de (Gimenez-Cassina and Danial, 2015).

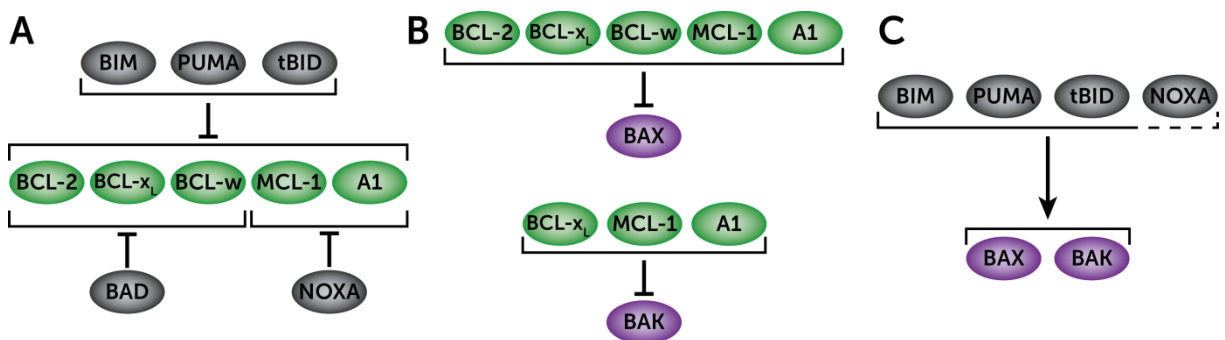


Figure 22 : Les régulations au sein de la famille BCL-2

A : Les protéines pro-apoptotiques BH3-only BIM, PUMA et tBID peuvent inhiber l'activité de tous les membres anti-apoptotiques, tandis que BAD et NOXA n'en inhibent qu'une partie. **B** : La protéine effectrice pro-apoptotique BAK est préférentiellement inhibée par BCL-x_L, MCL-1 et A1, tandis que BAX est inhibé par tous les membres anti-apoptotiques. **C** : Les protéines pro-apoptotiques BH3-only BIM, PUMA, tBID et probablement NOXA activent directement les effecteurs pro-apoptotiques BAX et BAK. D'après (Czabotar *et al.*, 2013a; Dai *et al.*, 2016).

a) La sous-famille anti-apoptotique BCL-2

BCL-2 a été le premier acteur de la mort cellulaire à avoir été découvert en 1984 (Tsujimoto *et al.*, 1984), en analysant les translocations chromosomiques impliquées dans le lymphome folliculaire humain. Son identification comme un inhibiteur de la mort cellulaire a établi une nouvelle caractéristique du cancer : la capacité à échapper à l'apoptose (Hanahan and Weinberg, 2000).

Les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 comme BCL-2, BCL-x_L, MCL-1, ont en commun un domaine transmembranaire, les domaines BH1 et BH2, et peuvent également posséder les domaines BH3 et/ou BH4. La surexpression de BCL-2 inhibe l'apoptose déclenchée par des stress comme la privation de facteurs de survie ou l'irradiation, dans des lignées cellulaires issues de lymphoblastome ou des cultures primaires de lymphocytes ou thymocytes (Hockenbery *et al.*, 1990; Nunez *et al.*, 1989, 1990; Sentman *et al.*, 1991; Strasser *et al.*, 1990; Tsujimoto, 1989). BCL-2 est localisé à la membrane mitochondriale externe, ainsi que dans la membrane du RE et l'enveloppe nucléaire, l'essentiel de la protéine étant exposé à la face cytosolique (Lithgow *et al.*, 1994; Monaghan *et al.*, 1992).

Les membres de cette sous-famille (BCL-2, BCL-x_L, MCL-1...) peuvent interagir avec les membres pro-apoptotiques (BAX/BAK, BH3-only) et les séquestrer pour empêcher l'activation des effecteurs BAX et BAK par les BH3-only, ou inhiber la relocalisation à la mitochondrie de BAX (**Figure 22 A-B**).

b) La sous-famille pro-apoptotique des effecteurs BAX/BAK

BAX est le premier membre pro-apoptotique de la famille BCL-2 à avoir été identifié, initialement découvert pour son interaction avec BCL-2 (Oltvai *et al.*, 1993). Plus tard, deux autres membres pro-apoptotiques à multi-domaines BH ont été découverts, BAK (Farrow *et al.*, 1995; Kiefer *et al.*, 1995) et le moins connu BOK (BCL-2-related Ovarian Killer) (Hsu *et al.*, 1997). Les cellules issues de souris doublement déficientes *Bax*^{-/-}; *Bak*^{-/-} résistent à de nombreux stimuli apoptotiques (Lindsten *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001; Zong *et al.*, 2001), ce qui a établi un rôle essentiel de BAX et BAK dans le déclenchement de la phase effectrice de la voie de l'apoptose mitochondriale. Ainsi l'activation de BAX et BAK est généralement suffisante pour déclencher la mort cellulaire et constitue un point de non-retour dans la signalisation de l'apoptose mitochondriale (Delbridge *et al.*, 2016).

BAX et BAK sont activés par les BH3-only tBID, BIM et PUMA (Dai *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2011; Letai *et al.*, 2002). BIM active préférentiellement BAX, tandis que tBID active préférentiellement BAK (Sarosiek *et al.*, 2013). Des études *in vitro* ont montré que NOXA pouvait également être un activateur direct de BAX et BAK (Dai *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2011), mais des études structurales n'ont montré aucune interaction directe entre le peptide BH3 de NOXA et BAX ou BAK (Brouwer *et al.*,

2014; Czabotar *et al.*, 2013b; Moldoveanu *et al.*, 2013). Il a cependant été observé que NOXA interagissait directement avec BAX et BAK au niveau des mitochondries de cellules vivantes, ce qui suggère que la forme entière de NOXA pourrait être un activateur direct (Vela *et al.*, 2013) (**Figure 22C**).

BAK est constitutivement localisé à la membrane externe mitochondriale dans des cellules saines, tandis que BAX est cytosolique (Griffiths *et al.*, 1999; Wolter *et al.*, 1997). Leur activation induit la relocalisation et l'ancrage à la membrane externe mitochondriale de BAX (Wolter *et al.*, 1997). BAX et BAK s'oligomérisent et forment des pores (Annis *et al.*, 2005; Desagher *et al.*, 1999), induisant la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial et le relargage du cytochrome c et de Smac/DIABLO dans le cytosol.

Récemment, il a été montré que la surexpression de BOK induit fortement l'apoptose, accompagnée de l'oligomérisation de BAX et BAK. L'expression de BOK dans des cellules de cancer colorectal humain ou des cellules épithéliales rénales murines *Bax*^{-/-}; *Bak*^{-/-} est également capable d'induire le relargage du cytochrome c et la mort de ces cellules (Einsele-Scholz *et al.*, 2016). D'autre part, les délétions de *Bok* sont fréquentes dans les cancers du sein et des ovaires (Beroukhim *et al.*, 2010). La déplétion de BOK dans des cellules de cancer ovarien diminue leur sensibilité aux chimiothérapies, soulignant un rôle inhibiteur de BOK dans les mécanismes de chimiorésistance (Einsele-Scholz *et al.*, 2016).

c) La sous-famille pro-apoptotique BH3-only

Les protéines BH3-only sont les médiateurs des signaux pro-apoptotiques. Elles possèdent un domaine BH3 unique, et éventuellement un domaine transmembranaire C-terminal. Les BH3-only sont toutes capables de se lier aux membres anti-apoptotiques et ainsi induire l'activation indirecte de BAX et BAK en inhibant leur séquestration. Certaines d'entre elles comme tBID, BIM et PUMA peuvent aussi activer BAX et BAK par liaison directe (Cartron *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Kuwana *et al.*, 2005; Willis *et al.*, 2007).

La famille BCL-2 peut également participer à la régulation de la voie extrinsèque de l'apoptose. La protéine BH3-only BID peut être clivée par la caspase-8 suite à l'activation de la voie des récepteurs à domaine de mort. La forme tronquée de BID (tBID) transloque au niveau de la mitochondrie où elle interagit avec les différents membres de la famille BCL-2 et induit le relargage du cytochrome c (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998).

L'activation des BH3-only est régulée à plusieurs niveaux. PUMA et NOXA peuvent être transcriptionnellement régulées par le facteur de transcription p53 (Nakano and Vousden, 2001;

Schuler *et al.*, 2003). Les facteurs de survie comme l'interleukine 3 (IL-3), le PDGF, l'EGF ou l'IGF1 inhibent l'activité pro-apoptotique de BAD en induisant la phosphorylation de résidus sérine dans ou à proximité de son domaine d'interaction BH3, libérant ainsi les membres anti-apoptotiques comme BCL-2 ou BCL-x_L (Datta *et al.*, 2000, 2002; LIZCANO *et al.*, 2000; Zha *et al.*, 1996). Leur activité peut également être régulée par leur localisation subcellulaire qui est mitochondriale dans les cellules apoptotiques, et peut varier dans les cellules saines où par exemple BAD est cytosolique et BIM est associé aux microtubules (Shamas-Din *et al.*, 2011).

4.3 - L'apoptose dépendante de p53

a) p53 : découverte et généralités

La protéine p53 a été découverte en 1979 par plusieurs équipes par des expériences de co-immunoprécipitation à partir de cellules de souris, singe, hamster ou humaines, infectées ou transfectées par le virus simien SV40. Les anticorps dirigés contre l'antigène grand T du SV40 co-immunoprécipitaient avec une protéine de 53 kDa (Kress *et al.*, 1979; Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979). Indépendamment et parallèlement à cette découverte, la protéine p53 a été identifiée par son fort niveau d'expression dans des sarcomes induits chimiquement ou des fibroblastes murins issus de transformation spontanée (DeLeo *et al.*, 1979). Initialement identifiée à tort comme un oncogène, il a finalement été montré que la protéine p53 était un puissant oncosuppresseur. Ce paradoxe a été résolu lorsqu'il a été montré que les ADNc p53 utilisés dans les premières expériences contenaient en réalité des mutations faux-sens à effet dominant dans des régions conservées et importantes pour la conformation et les activités biologiques de la protéine (Lane and Benchimol, 1990). À ce titre, *p53* est le gène le plus communément muté dans les cancers humains.

p53 agit principalement comme un facteur de transcription sous forme de tétramère (Balagurumorthy *et al.*, 1995; Friedman *et al.*, 1993) et régule un grand nombre de processus cellulaires comme l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'apoptose (**Figure 23**) (Brady and Attardi, 2010; Millau *et al.*, 2009). La protéine p53 peut être activée en réponse à différents stress cellulaires comme l'hypoxie ou les dommages à l'ADN. Ses activités sont modulées par des interactions avec des protéines comme MDM2, ou par des modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations, ubiquitinations ou acétylations (Meek, 2015).

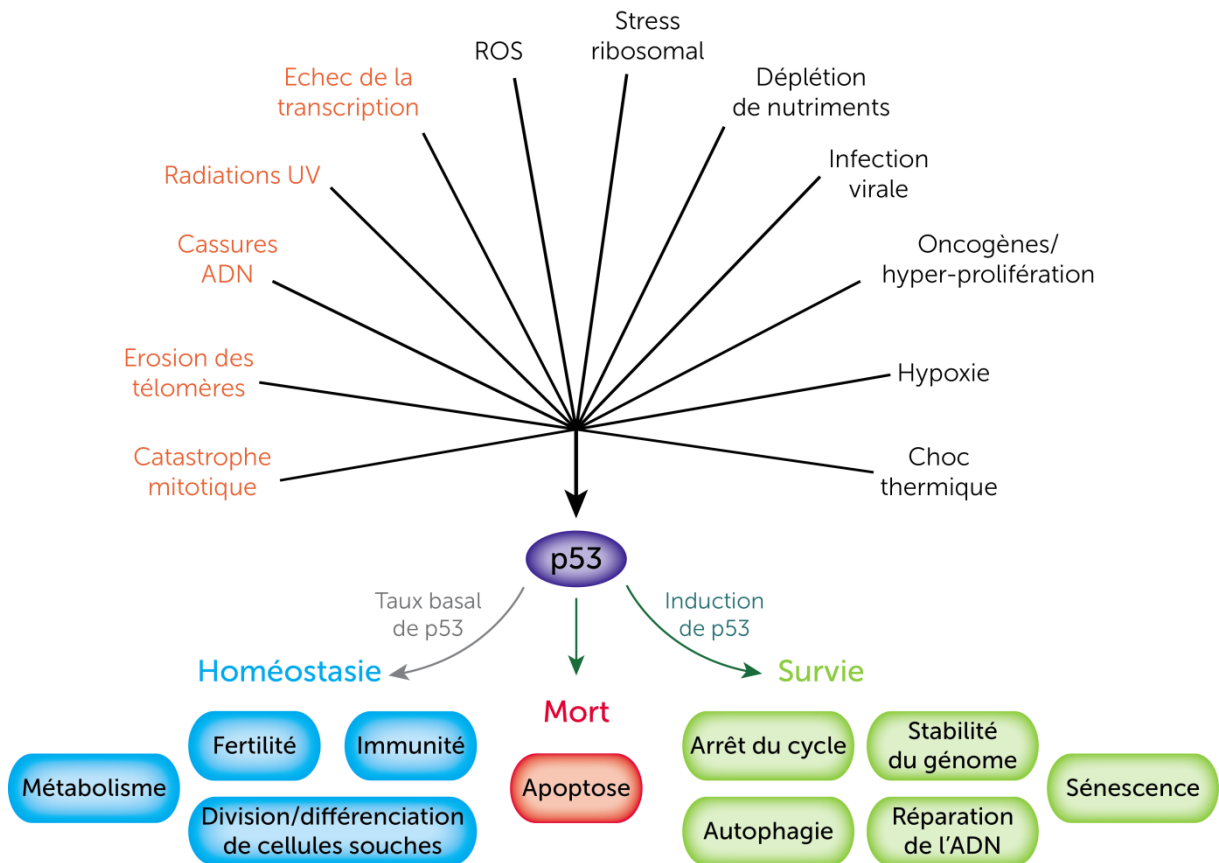


Figure 23 : Activités de p53

Un grand nombre de stress cellulaires peuvent activer p53, conduisant à des modifications coordonnées de l'expression de nombreux gènes et touchant différents processus biologiques selon le type cellulaire concerné ainsi que la durée, l'intensité et le type du stress activateur. Les événements activant p53 *via* la voie de réponse aux dommages de l'ADN sont indiqués en orange sur la gauche. ROS : espèce réactive de l'oxygène. Adapté de (Meek, 2015)

b) Structure et localisation de p53

La protéine p53 est constituée de 393 acides aminés et peut être divisée en trois régions contenant les domaines nécessaires à ses activités : une région N-terminale qui contient les domaines d'activation de la transcription, une région centrale contenant le domaine de liaison à l'ADN et enfin une région C-terminale contenant des régions régulatrices importantes pour sa tétramérisation et son trafic intracellulaire (**Figure 24**).

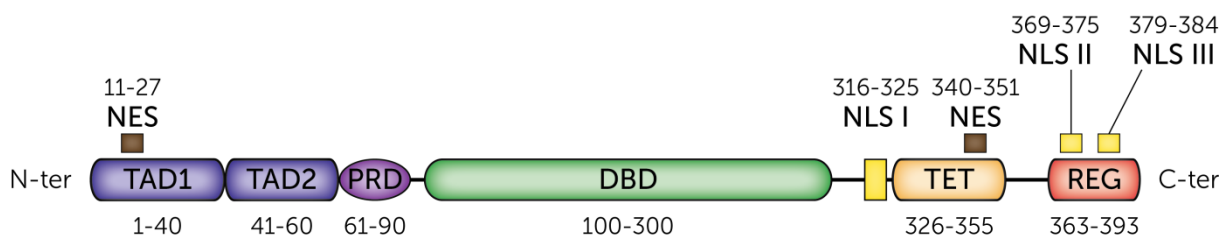


Figure 24 : Structure de la protéine p53

La protéine p53 est constituée de 393 acides aminés. Elle possède à son extrémité N-terminale deux domaines d'activation de la transcription (TAD1 et 2) et un domaine riche en proline (PRD). Sa région centrale contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD). À son extrémité C-terminale se trouve une région permettant sa tétramérisation (TET), ainsi qu'une région régulatrice (REG). p53 possède deux séquences d'exportation nucléaire (NES) en N- et C-terminal, ainsi que trois séquences NLS dans sa région C-terminale, NLS I, NLS II et NLS III. Les positions en acides aminés sont indiquées pour chaque région.

i. Région N-terminale : domaines TAD et PRD

La région N-terminale de p53 contient deux domaines d'activation de la transcription contigus, TAD1 (acides aminés 1 à 40) et TAD2 (acides aminés 41 à 60) (Transcriptional Activation Domain 1 et 2) (Chang *et al.*, 1995). TAD2 chevauche un domaine PRD riche en proline (Proline Rich Domain) (acides aminés 61 à 90) de cinq répétitions du motif PXXP, important pour l'induction de l'apoptose (Baptiste *et al.*, 2002; Walker and Levine, 1996), l'arrêt du cycle cellulaire (Toledo *et al.*, 2006) et la réponse aux dommages à l'ADN causés par les irradiations gamma (Campbell *et al.*, 2013). Cette région contient également une séquence NES (acides aminés 11 à 27) (Zhang, 2001).

ii. Région centrale : domaine DBD

La région centrale de p53 contient un long domaine DBD de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain) (acides aminés 100 à 300) (Bargonetti *et al.*, 1993; Kern *et al.*, 1991; Pavletich *et al.*, 1993), essentiel à la transactivation ou la répression de nombreux gènes cibles et à l'activité oncosuppressive de p53. Le gène *p53* est le plus communément muté dans les cancers humains, et la majorité des mutations touchent le domaine de liaison à l'ADN, abolissant ainsi sa fonction oncosuppressive (Caron de Fromentel and Soussi, 1992; Olivier *et al.*, 2010).

iii. Région C-terminale : domaine TET et séquences régulatrices

La région C-terminale contient un domaine TET (acides aminés 326 à 355) qui permet la tétramérisation de p53 nécessaire à sa liaison à ses gènes cibles (Chène, 2001; Halazonetis and Kandil, 1993; Hupp *et al.*, 1992). Elle contient également à l'extrémité C-terminale un domaine régulateur (acides aminés 363 à 393) requis pour la liaison non-spécifique à l'ADN, qui permet à p53

de diffuser le long de l'ADN et d'identifier ses séquences cibles (McKinney *et al.*, 2004). Cette région contient également quatre séquences régulant le trafic nucléo-cytoplasmique de p53 : trois séquences de nucléarisation NLS I (acides aminés 316 à 325), NLS II (acides aminés 369 à 375) et NLS III (acides aminés 379 à 384), et enfin une séquence NES (acides aminés 340 à 351) (Shaulsky *et al.*, 1990; Stommel *et al.*, 1999).

iv. Localisation de p53

La protéine p53 peut être localisée dans le cytosol, le noyau ou les mitochondries. Le trafic nucléo-cytoplasmique de p53 participe à la régulation de ses activités. Il est modulé par les trois séquences NLS C-terminales, dont la NLS I semble la plus importante (Dang and Lee, 1989; Liang and Clarke, 1999; Shaulsky *et al.*, 1990), et par les deux séquences NES N- et C-terminales (Stommel *et al.*, 1999; Zhang, 2001). Il est à noter que la NES C-terminale se situant dans le domaine de tétramérisation, cette séquence est masquée lorsque la protéine p53 est tétramérisée et active, ce qui participe à la rétention nucléaire de la forme active de p53. La protéine p53 peut également, indépendamment de son activité de facteur de transcription, être localisée à la mitochondrie (Bergeaud *et al.*, 2013; Ferencu *et al.*, 2009; Marchenko, 2000), bien qu'à ce jour aucune séquence classique d'adressage à la mitochondrie n'ait été identifiée dans la séquence de p53.

c) Régulation de p53 : modifications post-traductionnelles

Les activités et le niveau de la protéine p53 sont finement régulées : p53 est par exemple stabilisée après des dommages à l'ADN mais doit être rapidement dégradée pour permettre la survie lorsque ce stress est résolu. Le gène *p53* peut être transcriptionnellement activé par des facteurs de transcription comme CREB (cAMP Responsive Element Binding protein), Myc (Okoshi *et al.*, 2009; Reisman *et al.*, 1993), ou par lui-même (Deffie *et al.*, 1993). En plus de son promoteur classique, le gène *p53* possède un promoteur alternatif intronique et génère plusieurs isoformes de la protéine p53 dont les activités transcriptionnelles diffèrent (Bourdon, 2005). L'activité de ce promoteur interne peut également être modulée par des isoformes de p63 et p73, membres de la famille p53 (Marcel *et al.*, 2012). Cependant, ces régulations transcriptionnelles ne représentent qu'une faible part de la modulation de son niveau d'expression et ne seront pas développées ici.

p53 est une protéine instable qui possède *in vivo* une demi-vie d'environ 30 minutes (Itahana *et al.*, 2007; Oren *et al.*, 1981; Pant *et al.*, 2011). Le turnover de la protéine p53 est essentiellement régulé au niveau post-traductionnel : p53 est la cible de très nombreuses modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, l'ubiquitination ou l'acétylation (**Figure 25**). Ces modifications peuvent induire la stabilisation et l'activation de p53, ou au contraire sa dégradation (Kumari *et al.*, 2014; Lavin and Gueven, 2006; Olsson *et al.*, 2007).

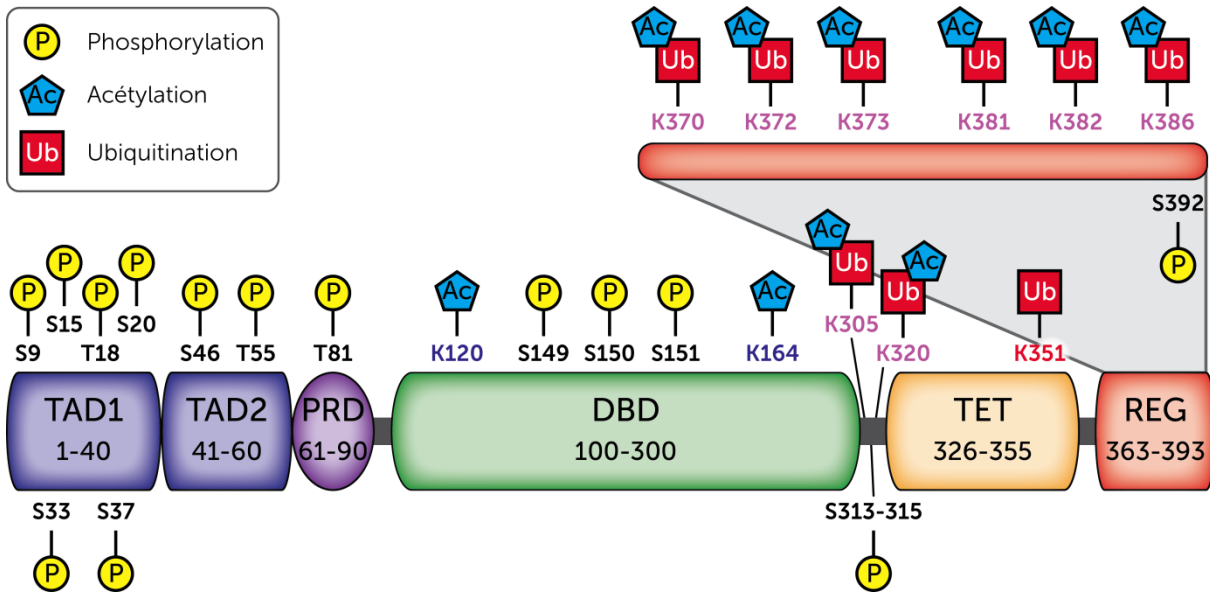


Figure 25 : Modifications post-traductionnelles de la protéine p53

Un grand nombre d'acides aminés de la protéine p53 peut être modifié post-traductionnellement. Les sites majeurs de phosphorylation, acétylation et ubiquitination de p53 sont représentés de façon non exhaustive. TAD : Domaine transactivateur ; PRD : domaine riche en proline ; DBD : domaine de liaison à l'ADN ; TET : domaine de tétramérisation ; REG : domaine régulateur. D'après (Kruse and Gu, 2009; Meek, 2015; Olsson *et al.*, 2007)

i. Ubiquitination de p53 : rôle de MDM2

En absence de stress cellulaire, le niveau de la protéine p53 est maintenu à un niveau faible grâce à sa courte demi-vie et à l'induction de sa dégradation *via* son ubiquitination. La protéine MDM2 à activité E3 ligase en est un régulateur majeur. MDM2 ubiquitine préférentiellement six résidus lysine de la région C-terminale (Rodriguez *et al.*, 2000). Lorsque son niveau est faible, MDM2 va préférentiellement mono-ubiquitiner p53 et induire son export nucléaire (**Figure 26A**). En revanche, la présence d'un fort niveau de MDM2 induit la poly-ubiquitination de p53 et sa dégradation par le protéasome (**Figure 26B**) (Li, 2003; Pant and Lozano, 2014). Suite à l'activation d'oncogènes, l'oncosuppresseur ARF (Alternative Reading Frame) (p14^{ARF} chez l'Homme, p19^{ARF} chez la souris) peut se lier à MDM2, sans affecter son interaction avec p53. ARF inhibe l'activité E3 ubiquitine ligase de MDM2, et donc la dégradation de p53 (**Figure 26B**) (Honda and Yasuda, 1999). En se liant à la région N-terminale de p53 contenant ses domaines de transactivation, MDM2 peut également inhiber l'activité transcriptionnelle de p53 en bloquant la liaison de co-activateurs comme CBP/p300 (**Figure 26C**) (Kobet *et al.*, 2000; Wadgaonkar and Collins, 1999). MDM2 est également une cible transcriptionnelle de p53 et fait ainsi partie d'une boucle de rétrocontrôle négatif (**Figure 26D**) (Wu *et al.*, 1993).

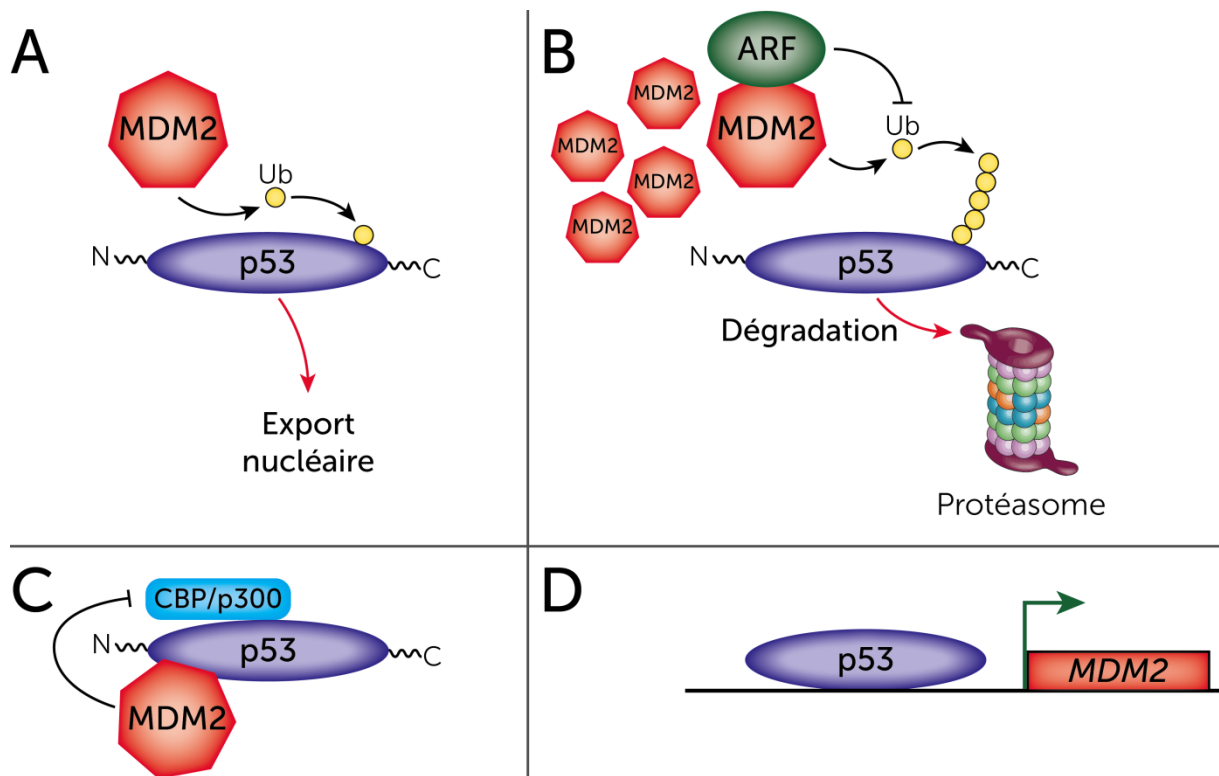


Figure 26 : Régulation négative de p53 par MDM2

A : Lorsque son niveau est faible, MDM2 mono-ubiquitine p53 à son extrémité C-terminale et induit son export nucléaire. **B :** Lorsque son niveau est important, MDM2 poly-ubiquitine p53 et induit ainsi sa dégradation par le protéasome. La liaison de l'oncosuppresseur ARF à MDM2 inhibe son activité E3 ligase et la dégradation de p53. **C :** La liaison de MDM2 à la région N-terminale de p53 inhibe la liaison de co-activateurs comme CBP/p300 à p53. **D :** Le gène *MDM2* est une cible transcriptionnelle de p53, ce qui forme une boucle de rétrocontrôle négatif.

ii. Acétylation de p53

L'acétylation d'une ou plusieurs lysines au sein d'une protéine peut affecter sa fonction en modifiant sa conformation ou ses interactions avec d'autres protéines. L'acétylation a initialement été identifiée sur les queues N-terminales des histones, neutralisant leur charge positive et induisant ainsi la décondensation de la chromatine et des modifications des profils d'expression géniques (Allfrey *et al.*, 1964; Swygert and Peterson, 2014). La découverte de l'acétylation de p53 en 1997 en a fait la première protéine décrite comme subissant cette modification en dehors des histones (Gu and Roeder, 1997).

L'acétylation de p53 augmente sa stabilité, sa liaison aux promoteurs, son association avec d'autres protéines, ses activités antivirales, et est requise pour sa réponse aux dommages à l'ADN et à l'activation d'oncogènes (Ito *et al.*, 2001; Munoz-Fontela *et al.*, 2011; Pearson *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2008). L'acétylation de p53 peut être déclenchée par la voie de réponse de dommages à l'ADN ou

encore par l'oncosuppresseur ARF en réponse à une activité mitogénique anormale (Brooks and Gu, 2011; Mellert *et al.*, 2007). Six acétyltransférases ont été décrites comme pouvant modifier p53, préférentiellement à son extrémité C-terminale ou sur son domaine de liaison à l'ADN, comme notamment CBP/p300. La perte de huit sites majeurs d'acétylation (K120, 164, 370, 372, 373, 381, 382 et 386) abolit l'activité transcriptionnelle de p53 et inhibe sa capacité à induire l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose (Tang *et al.*, 2008). À l'inverse, l'inhibition d'histones désacétylases (HDACs) ciblant p53 comme HDAC1 ou SIRT1 provoque une augmentation de l'acétylation de p53 ainsi qu'une activation de l'apoptose et de la sénescence p53-dépendantes (Brooks and Gu, 2011).

iii. Phosphorylation de p53

La protéine p53 peut être phosphorylée sur de nombreux résidus sérine et thréonine, et notamment dans sa région N-terminale (TAD) et C-terminale. Sous l'effet de différents stress activateurs, de nombreuses kinases peuvent phosphoryler p53, comme ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related), CHK1 (Checkpoint Kinase 1), CHK2, CK1 (Casein Kinase 1) (Bode and Dong, 2004). La plupart des sites phosphorylés induisent la stabilisation de la protéine p53 et donc l'augmentation de son activité, et/ou affectent la spécificité de la liaison de p53 à ses séquences cibles génomiques.

Les sites de phosphorylation les plus étudiés sont ceux des résidus Ser15, Thr18 et Ser20, appartenant au TAD N-terminal de p53, qui est aussi un site d'interaction de p53 avec MDM2. Le résidu Ser15 est phosphorylé précocément par la kinase ATM en réponse aux irradiations γ : cette phosphorylation stimule l'activité transactivatrice de p53 ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose p53-dépendants en réponse aux dommages à l'ADN (Dumaz *et al.*, 1999; Fiscella *et al.*, 1993; Khanna *et al.*, 1998; Shieh *et al.*, 1997). La phosphorylation de la Ser15 permet également de masquer la séquence NES N-terminale de p53 et contribue ainsi à sa rétention nucléaire (Zhang, 2001). La phosphorylation d'autres résidus incluant Thr18 par CK1 et Ser20 par CHK2, elles-mêmes activées par ATM, a lieu plus tardivement dans la réponse aux dommages de l'ADN et dépend de la phosphorylation initiale de la Ser15 (Dumaz *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2003). Le changement de conformation du domaine N-terminal induit par la phosphorylation des Thr18 et Ser20 bloque l'interaction de p53 avec MDM2, inhibant ainsi l'ubiquitination de p53 et augmentant sa stabilité (Chehab *et al.*, 1999; Unger *et al.*, 1999).

D'autres résidus peuvent réguler les activités de p53 par leur phosphorylation. La phosphorylation de la Ser392 du domaine régulateur C-terminal par CK2 stabilise la conformation tétramérique active de p53, promeut la liaison à l'ADN site-spécifique et la capacité de p53 à

supprimer la croissance de colonies dans des cultures cellulaires (Hupp *et al.*, 1992; Keller *et al.*, 2001; Milne *et al.*, 1992; Sakaguchi *et al.*, 1997).

d) Activités oncosuppressives de p53

p53 agit principalement comme un facteur de transcription en activant ou réprimant l'expression d'une multitude de gènes cibles impliqués dans des processus comme l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'induction de l'apoptose. En effet, en réponse à différents stress comme des dommages à l'ADN, p53 peut induire un arrêt transitoire du cycle cellulaire et activer la réparation de l'ADN, ou bien induire la sénescence ou l'apoptose pour circonscrire ou éliminer la cellule devenue dangereuse si les dommages sont trop importants. p53 a également été impliqué dans la régulation de processus qui ne seront pas détaillés ici comme la protection contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS), ou plus récemment l'autophagie, le métabolisme énergétique ou les miRNAs (micro ARNs) (Hermeking, 2007; Humpton and Vousden, 2016; Liu *et al.*, 2008; White, 2016).

i. Induction de l'arrêt du cycle cellulaire

p53 régule l'arrêt du cycle cellulaire en activant l'expression de gènes comme *p21*, *GADD45* (Growth Arrest and DNA Damage 45) ou *14-3-3 σ* (el-Deiry *et al.*, 1993; Hermeking *et al.*, 1997; Kastan *et al.*, 1992) (**Figure 27**). p21 induit l'arrêt du cycle en phase G₁/S et inhibe la réplication de l'ADN en liant et inhibant les complexes cycline E/Cdk2 et cycline D/Cdk4 (kinases cycline-dépendantes), et le facteur prolifératif PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Harper *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 1995). p21 peut également induire l'arrêt du cycle en phase G₂/M en inhibant le complexe cycline B/Cdk1, tout comme 14-3-3 σ et GADD45 (Hermeking *et al.*, 1997; Niculescu *et al.*, 1998; Zhan *et al.*, 1999).

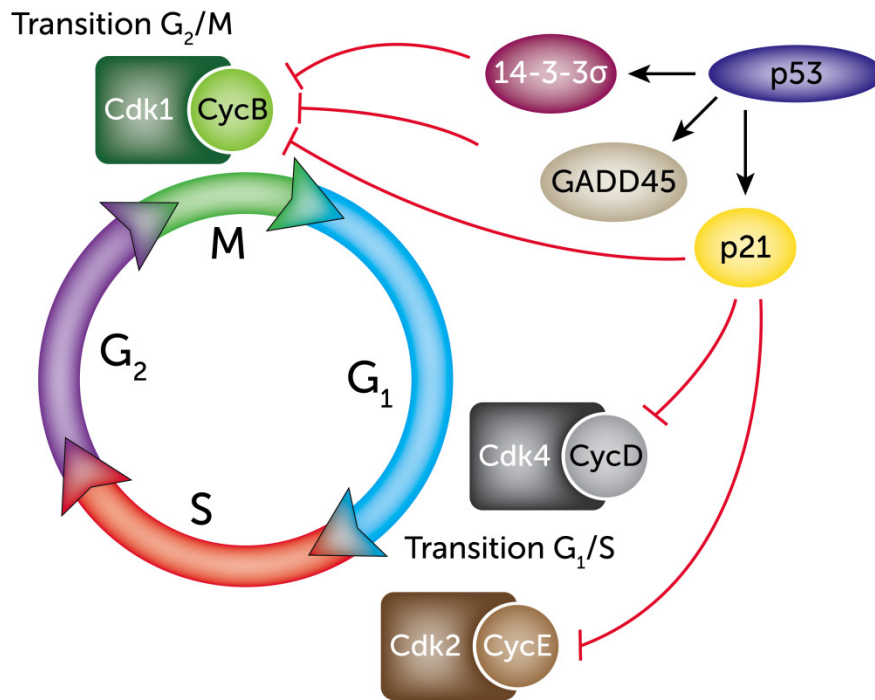


Figure 27 : Induction de l'arrêt du cycle cellulaire par p53

La protéine p53 active l'expression des gènes *14-3-3σ*, *GADD45* et *p21*. Ces trois protéines sont des inhibiteurs des complexes Cyclines/Cdk (Cycline Dependent Kinase), qui régulent la progression du cycle cellulaire. *14-3-3σ*, *GADD45* et *p21* inhibent le complexe Cycline B/Cdk1 responsable de la transition G_2/M . *p21* peut également inhiber les complexes Cycline D/Cdk4 et Cycline E/Cdk 2, responsables de la transition G_1/S .

ii. Réparation de l'ADN

Des séquences consensus d'éléments de réponse à p53 (p53 RE) ont été retrouvés dans les séquences régulatrices de gènes impliqués dans la réparation par excision de nucléotide (NER pour Nucleotide Excision Repair), dans la réparation des mésappariements (MMR pour MisMatch Repair) ou encore la recombinaison homologue (HR pour Homologous recombination) (Wei *et al.*, 2006).

La NER est impliquée dans la réparation de dommages à l'ADN à travers tout le génome et en particulier les lésions induites par les ultraviolets (UV) ou les adduits chimiques volumineux (Marteijn *et al.*, 2014). Suite à une irradiation aux UV, p53 augmente l'expression de *XPC* (Xeroderma pigmentosum group C) et *DDB2* (DNA Damage Binding protein 2) (Adimoolam and Ford, 2002; Hwang *et al.*, 1999; Tan and Chu, 2002). Les protéines codées par ces deux gènes reconnaissent les dommages à l'ADN et initient la NER.

La MMR permet de reconnaître et réparer les insertions erronées, les délétions et les mauvaises incorporations de bases au cours de la réplication de l'ADN (Kunkel and Erie, 2005). p53 induit

l'expression de *PMS2* (PostMeiotic Segregation increased 2) et *MLH1* (MutL Homolog 1) (Chen and Sadowski, 2005), dont les protéines forment le complexe MutL α , central à la MMR.

La recombinaison homologue permet de réparer les cassures double brin de l'ADN et implique notamment la formation de foci de RAD51 impliqués dans la recombinaison (Haaf *et al.*, 1995; Tham *et al.*, 2016). De façon surprenante, p53 se lie au promoteur de *RAD51* et diminue son expression (Arias-Lopez *et al.*, 2006). Or ce résultat est en accord avec l'idée que l'induction de l'apoptose dans des cellules ayant subi des dommages à l'ADN abondants requiert la répression de la HR, et que la surexpression de *RAD51* confère une radiorésistance (Collis *et al.*, 2001; Ivanov, 2003).

iii. Induction de l'apoptose dépendante de p53

Grâce à son activité de facteur de transcription, p53 peut activer la voie mitochondriale de l'apoptose en régulant différents gènes cibles de la famille BCL-2. Il active l'expression de membres pro-apoptotiques comme BAX, BAD, BID, PUMA ou NOXA (Jiang *et al.*, 2006; Miyashita and Reed, 1995; Nakano and Vousden, 2001; Sax *et al.*, 2002; Schuler *et al.*, 2003), et réprime l'expression de membres anti-apoptotiques comme BCL-2 et MCL-1 (Pietrzak and Puzianowska-Kuznicka, 2008; Wu *et al.*, 2001). Plus en aval, p53 active l'expression du facteur pro-apoptotique et composant de l'apoptosome APAF-1 (Moroni *et al.*, 2001; Robles *et al.*, 2001). p53 peut transactiver les caspases effectrices 6 et 7, dont les gènes contiennent des p53 RE dans leur premier intron (MacLachlan and El-Deiry, 2002; Yang *et al.*, 2008), et réprimer l'expression de la survivine (IAP) (Hoffman *et al.*, 2002).

p53 peut également réguler la voie extrinsèque de l'apoptose en activant l'expression des récepteurs à domaine de mort Fas (Müller *et al.*, 1998; Owen-Schaub *et al.*, 1995), ou encore DR4 et DR5 (Death Receptor 4 et 5) de la superfamille des TNF-R (Liu *et al.*, 2004; Takimoto and El-Deiry, 2000). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré une liaison directe de p53 au sein du locus du gène de la caspase-10 initiatrice, dont les niveaux transcriptionnels sont augmentés après activation de p53, suggérant qu'il s'agit également d'une cible transcriptionnelle directe de p53 (Rikhof *et al.*, 2003).

p53 réprime l'expression de facteurs anti-apoptotiques comme les facteurs de croissance FGF1 et FGF2 (Bouleau *et al.*, 2005; Ueba *et al.*, 1994) ou le récepteur à l'IGF (IGFR, Insulin-like Growth Factor Receptor) (Ohlsson *et al.*, 1998).

p53 peut réguler l'apoptose indépendamment de son activité transcriptionnelle en interagissant directement avec des membres de la famille BCL-2 lorsqu'il est localisé dans le cytoplasme ou à la mitochondrie. La protéine p53 mitochondriale peut interagir avec la protéine pro-apoptotique BAK, dissocier ainsi le complexe inhibiteur BAK/MCL-1 et induire l'oligomérisation de BAK et le relargage

du cytochrome c (Leu *et al.*, 2004). En plus d'être transcriptionnellement activé par la protéine p53 nucléaire, BAD peut interagir avec la protéine p53 cytoplasmique, ceci induit une relocalisation du complexe BAD/p53 à la mitochondrie et ainsi facilite l'oligomérisation de BAK (Jiang *et al.*, 2006). La protéine p53 cytosolique interagit et active BAX et induit ainsi la perméabilisation de la mitochondrie et l'apoptose (Chipuk, 2004). p53 peut également interagir avec les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 comme BCL-2 et BCL-x_L, activant de façon indirecte l'oligomérisation de BAK et participant ainsi à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et au relargage du cytochrome c (Mihara *et al.*, 2003; Tomita *et al.*, 2006). La protéine p53 cytoplasmique possède une forte affinité pour les ARN (Oberosler *et al.*, 1993) et peut réprimer la traduction de l'ARNm du FGF2 en modifiant la conformation de l'ARNm et en bloquant ainsi l'initiation de la traduction (Galy *et al.*, 2001a, 2001b).

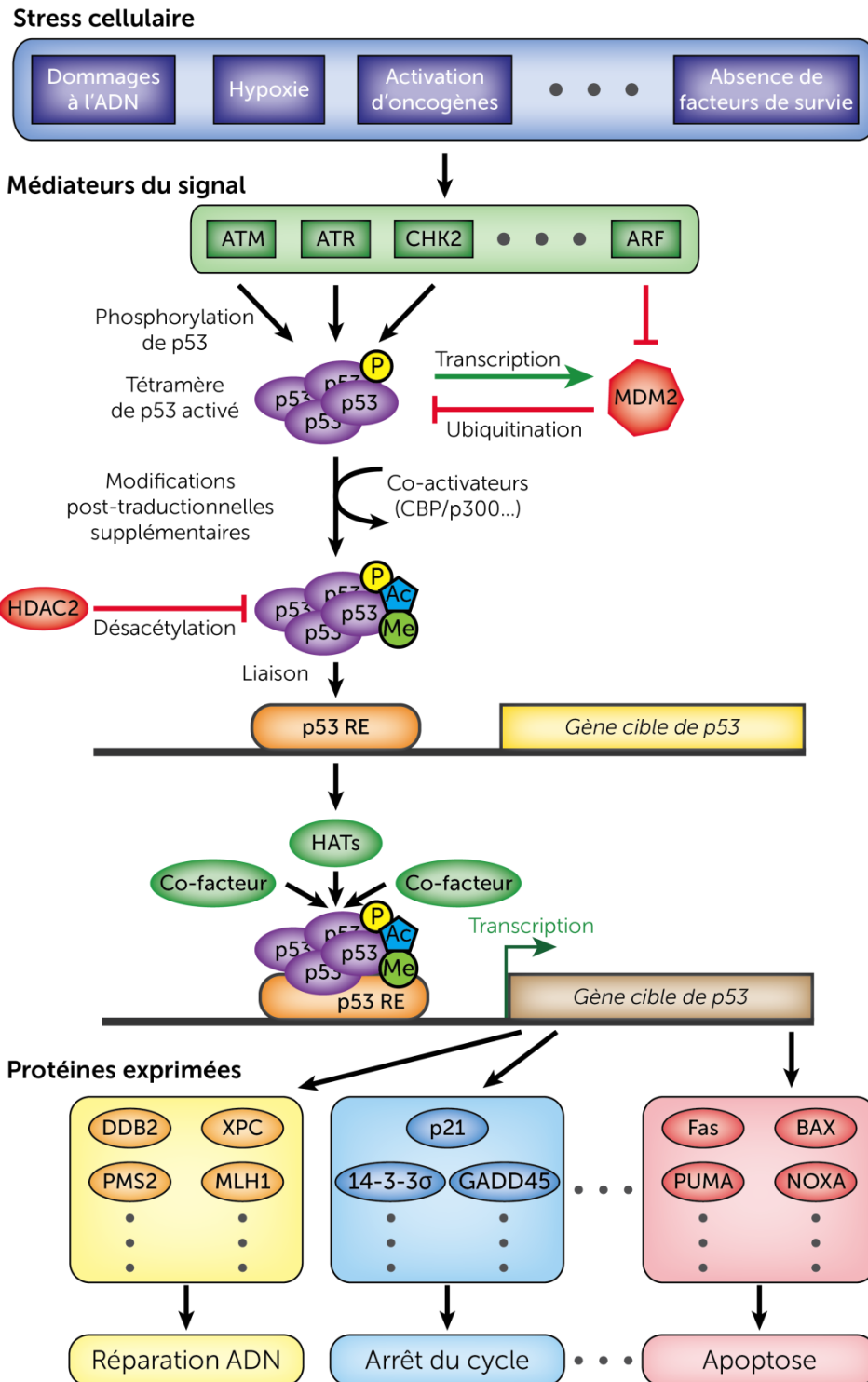


Figure 28 : Mécanismes d'activation de p53 et de régulation de ses cibles transcriptionnelles

Lorsque la cellule subit un stress, des protéines médiant ce signal activent p53 en phosphorylant certains résidus ou en inhibant l'activité ubiquitine-ligase de MDM2. p53 est stabilisé et activé en se tétramérisant. D'autres modifications participent à la stabilisation de p53 (acétylation par CBP/p300...), qui peut être inhibée par la désacétylase HDAC2. p53 recrute des co-facteurs, des histones-acétyltransférases (HATs) et se lie à un élément de réponse (p53 RE) pour réguler la transcription du gène cible (ici pour les transactiver). p53 transactive de nombreux gènes dont les protéines résultantes sont impliquées dans des processus variés comme principalement la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Adapté de (Riley *et al.*, 2008).

V Les neuroblastomes : modèle d'étude

1 - Généralités

Le neuroblastome est la tumeur solide extra-crânienne la plus fréquente chez les jeunes enfants, chez qui elle représente 15% des décès dûs aux cancers (Cheung and Dyer, 2013; Croce *et al.*, 2015). Elle dérive de cellules de la crête neurale et touche le système nerveux sympathique. Elle est principalement retrouvée dans la glande médullosurrénale mais peut survenir dans tout le système nerveux sympathique. Le neuroblastome est une maladie hétérogène, et les lignées cellulaires issues de neuroblastomes présentent une hétérogénéité de morphologie. Il existe deux types de lignées : l'une dite de type N (pour neuroblastique) présentant une morphologie neuroblastique avec des extensions neuritiques et exprimant des enzymes de biosynthèse noradrénergiques ainsi que des récepteurs muscariniques, opiacés ou du NGF ; l'autre dite de type S (pour Schwann) présentant une morphologie épithéliale ou fibroblastique mais pas de propriétés neuronales. Cependant, une interconversion d'un type cellulaire vers l'autre peut être observée (Ciccarone *et al.*, 1989).

L'oncogène *MYCN* est amplifié dans 20% des neuroblastomes et son expression ciblée dans les cellules neuroectodermiques de souris transgéniques y induit le développement de neuroblastomes (Schwab, 2004; Weiss *et al.*, 1997). Son amplification est le marqueur clinique le plus communément utilisé dans le neuroblastome, il est généralement associé à un mauvais taux de survie. En revanche, et bien que *p53* soit le gène le plus communément muté dans les cancers humains, il est rarement muté dans les neuroblastomes au moment du diagnostic (Volter *et al.*, 2010).

2 - L'apoptose dans les neuroblastomes

Plusieurs axes thérapeutiques sont développés pour lutter contre la prolifération anarchique des cellules tumorales, comme l'induction de l'apoptose *via* l'activation du complexe DISC en ciblant des ligands de récepteurs à domaine de mort comme TRAIL, la caspase-8 ou son inhibiteur FLIP ; l'inhibition de membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 comme BCL-2 ou MCL-1, ou au contraire l'utilisation de mimétiques de BH3-only ; ou encore en ciblant et en activant des membres de la famille des IAPs comme XIAP ou la survivine (Fulda and Debatin, 2003; Goldsmith and Hogarty, 2005). La voie de signalisation de *p53* est également une cible de choix dans la thérapie du neuroblastome, puisqu'il y est rarement muté. Ainsi, les thérapies actuelles combinent une stratégie cytotoxique comme les dommages à l'ADN pour activer *p53* d'une part, et l'inhibition de voies de survie comme PI3K/Akt/mTOR d'autre part (Westhoff *et al.*, 2014).

2.1 - L'apoptose induite par les dommages à l'ADN

La majorité des inducteurs de mort analysés dans les neuroblastomes activent de façon directe ou indirecte p53 et la voie mitochondriale de l'apoptose, p53 y étant rarement muté. Il a été initialement proposé que p53 bien que sauvage pouvait être inactivé dans les neuroblastomes en étant retenu dans le cytoplasme, permettant ainsi la progression tumorale (Moll *et al.*, 1995). Cependant de nombreuses études ont montré que l'induction de dommages à l'ADN (par exemple par irradiation aux rayons gamma), un stimulus activateur majeur de p53, induisait bien sa translocation nucléaire et son activation (Goldman *et al.*, 1996; McKenzie *et al.*, 1999; Tweddle *et al.*, 2001, 2003). Par exemple, l'induction de dommages à l'ADN dans les cellules SH-SY5Y par ajout d'étoposide induit l'accumulation de p53, la transactivation des membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2, comme *BOK* et *NOXA*, puis leur relocalisation à la mitochondrie concomitamment au relargage du cytochrome c dans le cytosol, l'activation de la caspase-3 et finalement l'apoptose. Dans ces cellules, l'inhibition de l'expression de *BAX* par siRNA montre que *BAX* n'est pas requis pour l'apoptose induite par l'étoposide, contrairement à p53 et à la caspase-9 ; la surexpression de mutants dominant négatif de la caspase-9 ou de p53 inhibe l'apoptose induite par l'étoposide dans ces cellules (Cui *et al.*, 2002; Yakovlev *et al.*, 2004). L'apoptose induite par la staurosporine, un inhibiteur de kinases non-spécifique, requiert également la présence de caspase-9 fonctionnelle mais ne dépend pas de p53 (Yakovlev *et al.*, 2004). Dans ces mêmes cellules SH-SY5Y, et contrairement à l'apoptose induite par l'étoposide, la staurosporine induit la relocalisation mitochondriale de *BAX* et le relargage concomitant du cytochrome c (McGinnis *et al.*, 1999).

Dans un modèle murin de neuroblastome, les cellules N2a, le traitement par l'agent chimiothérapeutique MPTQ (intercalant de l'ADN) induit la fragmentation de l'ADN, la phosphorylation de p53 (Ser15), l'augmentation du niveau protéique de *BAX* et sa relocalisation à la mitochondrie, ainsi que l'activation des caspases-9, -7 et -3 et le clivage de leur substrat PARP (Sahu *et al.*, 2013).

2.2 - L'apoptose induite par la production de ROS

L'apoptose a été étudiée dans des lignées cellulaires de neuroblastome suite à des stress oxydants et la production de ROS. L'ajout de chlorure de cobalt (CoCl₂) mime l'hypoxie et génère la production de ROS. Le rôle de p53 dans l'apoptose induite par la production de ROS a été étudié dans les cellules SH-SY5Y où p53 est sauvage, et dans les cellules SK-N-BE(2c) où p53 est muté sur son domaine de liaison à l'ADN et a ainsi perdu son activité de facteur de transcription. Dans les cellules SH-SY5Y, la production de ROS induit l'accumulation et l'activation précoce de p53 (phosphorylé sur son résidu Ser15) et sa translocation nucléaire, l'augmentation des niveaux protéiques de p21 et

PUMA, cibles transcriptionnelles de p53, ainsi que l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose (perte de $\Delta\psi_m$ et activation des caspases-9 et -3). En revanche, les cellules SH-SY5Y transfectées par des siRNA dirigés contre p53 ou les cellules SK-N-BE(2c) présentent une mort cellulaire plus tardive et indépendante des caspases, impliquant la translocation nucléaire de AIF et l'activation de la cathepsine B (Stenger *et al.*, 2011).

2.3 - L'apoptose induite par les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques naturels issus de plantes, possédant une fonction anti-oxydante, dont l'aptitude à induire sélectivement l'apoptose des cellules tumorales fait l'objet de plusieurs études. Le traitement des cellules SH-SY5Y par l'épigallocatechine (EGC) ou l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) induit l'activation de la caspase-8 et le clivage de BID en tBID, l'augmentation du ratio BAX:BCL-2, un relargage du cytochrome c et l'activation de la caspase-9, montrant l'activation des voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. Ces agents induisent également une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et l'activation de la calpaïne, protéase Ca^{2+} -dépendante. La caspase-8, la calpaïne et la caspase-9 activent la caspase-3 effectrice, qui clive alors ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated DNase) permettant ainsi la translocation de la DNase CAD (Caspase-3-Activated DNase) au noyau. L'apigénine (APG) et la génistéine (GST, inhibiteur de tyrosine kinase) induisent une augmentation de la concentration calcique intracellulaire et de l'activité de la calpaïne. Le ratio BAX:BCL-2 est également augmenté, le cytochrome c relargué et la caspase-9 activée. La calpaïne active la caspase-12 qui, avec la caspase-9 et la calpaïne participe à l'activation de la caspase-3 et à la translocation nucléaire de CAD (Das *et al.*, 2006). Le traitement de cellules SH-SY5Y ou SK-N-DZ (portant une amplification de *MYCN*) par la GST combinée au sorafénib (inhibiteur de sérine/thréonine et tyrosine kinases) induit l'activation de la caspase-8, le clivage protéolytique de BID en tBID, l'augmentation de l'expression de *p53* et *p21*, la diminution de l'expression de l'anti-apoptotique *MCL-1*, l'augmentation du ratio BAX:BCL-2, le relargage du cytochrome c et SMAC dans le cytosol, et l'activation de la caspase-3 et de la calpaïne (Roy Choudhury *et al.*, 2010).

2.4 - L'apoptose induite par la voie extrinsèque

L'expression de la caspase-8 est fréquemment inactivée dans les neuroblastomes primaires par délétion ou par hyperméthylation de séquences régulatrices du promoteur du gène de la caspase-8, préférentiellement dans les tumeurs portant une amplification de *MYCN* (Fulda *et al.*, 2001; Teitz *et al.*, 2000). La restauration de son expression par transfert de gène ou déméthylation restaure la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par les ligands de récepteurs à domaines de mort (Fulda *et al.*, 2001). L'étude de 18 lignées de neuroblastome a montré que la caspase-8 n'était exprimée que

dans 5 d'entre elles, la perte de l'expression de la caspase-8 corrélant à une résistance à l'apoptose induite par TRAIL (Eggert *et al.*, 2001). Dans les cellules SH-SY5Y, le pré-traitement à l'actinomycine D, un inhibiteur de la synthèse des ARN, sensibilise ces cellules à l'apoptose induite par TRAIL en inhibant l'expression de *BCL-2* et *BCL-x_L*, en stimulant la production de ROS et en augmentant l'expression d'AIF (Wang *et al.*, 2007).

La doxorubicine est un agent chimiothérapeutique qui induit des dommages à l'ADN *via* l'inhibition de la topoisomérase I, mais qui peut aussi induire l'augmentation de l'expression du récepteur à domaine de mort Fas dans des cultures primaires de cellules endothéliales, de façon dépendante de p53, et qui induit l'apoptose dépendante de Fas dans des cardiomyocytes (Jeremias *et al.*, 2005; Lorenzo *et al.*, 2002). Dans la lignée de neuroblastome SH-EP, l'ajout de doxorubicine induit l'augmentation des niveaux de transcrits et de protéines du récepteur Fas et de son ligand FasL (Fulda *et al.*, 1997). Cette augmentation n'est pas modifiée par la surexpression des gènes anti-apoptotiques *BCL-2* ou *BCL-x_L* et semble ainsi avoir lieu en amont des événements mitochondriaux de l'apoptose. Le traitement par la doxorubicine induit l'activation de la caspase-8 initiatrice en amont de la voie mitochondriale, tandis que l'activation de la caspase-3 effectrice et le clivage de son substrat PARP sont inhibés par la surexpression de *BCL-2* ou *BCL-x_L* (Fulda *et al.*, 1998).

2.5 - La modulation des voies d'activation de p53

Dans les neuroblastomes, le gène *p53* est rarement muté, suggérant que cette voie de contrôle peut être contournée soit par une inhibition des mécanismes activateurs, soit par une inhibition d'acteurs essentiels de cette voie. La voie p53 peut être inactivée indépendamment de mutations de *p53*. En effet, il existe un polymorphisme de *MDM2* (SNP309) touchant son promoteur et augmentant son affinité pour le facteur de transcription SP1 et donc induisant l'augmentation du niveau de la protéine MDM2, régulateur clé du niveau de p53. Ce polymorphisme est associé à une prédisposition au développement du neuroblastome, à une agressivité accrue et un pronostic plus sévère (Cattelani *et al.*, 2008; Perfumo *et al.*, 2008). Des amplifications du gène *MDM2* ont également été retrouvées dans certaines lignées de neuroblastomes (Tweddle *et al.*, 2003). La protéine p14^{ARF} est un régulateur de l'interaction MDM2-p53 : elle active p53 en inhibant l'action de MDM2, soit par liaison directe avec MDM2 en inhibant sa fonction ubiquitine-ligase, soit en séquestrant MDM2 dans le nucléole et en empêchant son interaction avec p53 (Gallagher *et al.*, 2006; Honda and Yasuda, 1999). Le gène *p14^{ARF}* est délété ou inactivé par méthylation de son promoteur dans plusieurs lignées cellulaires de neuroblastomes établies après rechute, et participe ainsi à l'inactivation de la voie p53 (Carr *et al.*, 2006). Une étude portant sur une vingtaine de tumeurs issues de patients et prélevées avant ou après traitement chimiothérapeutique ou après

rechute montre que 15% de ces patients présentaient un défaut d'activation de p53 essentiellement après rechute (mutation de p53), tandis que 35% présentaient des altérations en amont de l'activation de p53 sous forme d'amplification de MDM2 et/ou d'inactivation de p14^{ARF} au moment du diagnostic et après rechute (Carr-Wilkinson *et al.*, 2010), suggérant ainsi que les thérapies visant à réactiver p53 pourraient bénéficier à un grand nombre de patients. L'étude de 38 lignées cellulaires de neuroblastome traitées par la nutlin-3A, un inhibiteur de l'interaction p53-MDM2 et activateur de p53, montre que celle-ci a des effets anti-prolifératifs et cytotoxiques dans 23 des 25 lignées sauvages pour p53, et que cette réponse apoptotique est positivement modulée par le niveau d'expression de p14^{ARF} (Van Maerken *et al.*, 2011).

La famille p53 comprend trois membres : p53, p63 et p73. Ils possèdent tous les trois deux promoteurs qui sont sujets à des mécanismes d'épissage alternatif conduisant entre autres à des isoformes longues (TA, pour Transcriptionally Active) ou tronquées (Δ N) dépourvues de leur région N-terminale. Les isoformes Δ Np73 et Δ Np63 agissent comme des dominants négatifs sur les protéines p53, p63 et p73 TA en interférant avec leur oligomérisation et en formant des tétramères inactifs, ou par compétition de liaison aux séquences ADN cibles (Wolter *et al.*, 2010). La région chromosomique 1p36 (région distale du bras court du chromosome 1) est fréquemment délétée dans les neuroblastomes (White *et al.*, 2005) et p73 est localisé dans la région chromosomique 1p36.3 (Kaghad *et al.*, 1997). L'étude de 272 tumeurs neuroblastiques primaires montre que la perte d'hétérozygotie de p73 (LOH, Loss Of Heterozygosity) résultant d'une délétion chromosomique est associée à un stade avancé de la tumorigenèse et à une amplification de *MYCN*, tandis que les mutations de p73 sont très peu fréquentes (Ichimiya *et al.*, 1999). D'autre part, le niveau d'expression de Δ Np73 est élevé dans les neuroblastomes à haut risque, l'élévation du niveau de Δ Np73 est associé avec une réduction de l'apoptose dans les neuroblastomes et est un biomarqueur d'un mauvais pronostic pour les patients (Casciano *et al.*, 2002; Douc-Rasy *et al.*, 2002). En effet, la surexpression de Δ Np73 dans une lignée cellulaire de lymphoblaste inhibe l'apoptose induite par le cisplatine ou un anticorps anti-Fas (Fillippovich *et al.*, 2001). L'isoforme longue pro-apoptotique TAp73 active directement la transcription de l'isoforme courte Δ Np73 dans les cellules SH-SY5Y et SK-N-BE, et la surexpression de Δ Np73 dans les cellules SH-SY5Y induit la survie cellulaire en entrant en compétition avec p53 et TAp73 (Nakagawa *et al.*, 2003). Dans les cellules SH-SY5Y, la déplétion de Δ Np73 par siRNA induit une augmentation de l'expression du gène pro-apoptotique *PUMA*, la translocation mitochondriale de BAX, l'activation de la caspase-3, une augmentation de la fragmentation de l'ADN et finalement une augmentation de l'apoptose (Simoes-Wust *et al.*, 2005).

2.6 - Rôle de l'amplification de MYCN

L'oncogène *MYCN* est amplifié dans 20% des neuroblastomes et son expression ciblée induit le développement de neuroblastomes chez des souris transgéniques (Schwab, 2004; Weiss *et al.*, 1997). Son amplification est le marqueur clinique le plus communément utilisé dans le neuroblastome pour pronostiquer un mauvais taux de survie. Les tumeurs portant une amplification de *MYCN* co-expriment fréquemment le récepteur TrkB et son ligand BDNF (Nakagawara *et al.*, 1994). À l'inverse, l'expression du NGF et de son récepteur de haute affinité TrkA est négativement corrélée à l'amplification de *MYCN* et est associée à des tumeurs différenciées et à un bon pronostic (Nakagawara *et al.*, 1992, 1993). De plus, le traitement des lignées cellulaires de neuroblastomes SMS-KCNR ou LA-N-5 par l'acide rétinoïque induit la répression de l'expression de *MYCN* et leur différenciation neuronale (Amatruda *et al.*, 1985; Thiele *et al.*, 1985). Ainsi, la voie de signalisation de N-Myc semble être importante pour le maintien d'un phénotype non-différencié, lui-même corrélé à une agressivité plus importante (Mohlin *et al.*, 2011; Westermarck *et al.*, 2011).

N-Myc est un facteur de transcription qui peut directement transactiver le gène *MDM2*. Cette transactivation peut inhiber l'apoptose dépendante de p53 dans des lignées cellulaires portant une amplification de *MYCN* (Slack *et al.*, 2005). Cependant, il a également été montré une corrélation entre l'amplification de *MYCN* et une augmentation du niveau de p53. Le gène *p53* est également une cible transcriptionnelle de N-Myc (Chen *et al.*, 2010). De plus, l'étude de 18 lignées de neuroblastome montre que l'amplification ou la surexpression de *MYCN* sensibilise les cellules à l'apoptose dépendante de p53 induite par la nutlin-3A (Gamble *et al.*, 2012). De même, le traitement concomitant de lignées cellulaires neuroblastiques portant une amplification de *MYCN* ou surexprimant *MYCN* par la nutlin-3A, et le cisplatine ou l'étoposide, inducteurs de dommages à l'ADN, augmente l'accumulation de p53 ainsi que l'apoptose par rapport aux traitements génotoxiques seuls (Barbieri, 2006). Par contre, l'amplification de *MYCN* ne semble pas avoir d'effet sur l'apoptose induite par les dommages à l'ADN suite aux irradiations (Tweddle *et al.*, 2001).

p53 et MDM2 sont tous les deux régulés par N-Myc, et la protéine MDM2 est un régulateur post-transcriptionnel de *MYCN*. En effet, MDM2 se lie à la région 3' UTR de l'ARNm de *MYCN* et augmente sa stabilité et sa traduction (Gu *et al.*, 2012). Dans des lignées cellulaires de neuroblastome présentant une amplification de *MYCN*, la surexpression de *MDM2* induit la prolifération, tandis que l'extinction de l'expression de *MDM2* par siRNA inhibe la prolifération, le tout indépendamment de p53 (He *et al.*, 2011). L'interaction entre MDM2 et *MYCN* pourrait ainsi contribuer de façon significative à la croissance et à l'agressivité des tumeurs portant une amplification de *MYCN*, indépendamment de p53.

2.7 - L'inhibition de la voie de survie PI3K/Akt/mTOR

La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR est une voie de survie majeure. Après la liaison de facteurs de croissance, les récepteurs tyrosine kinase (RTK) transmembranaires sont activés par auto- et trans-phosphorylation, ils recrutent et activent la kinase PI3K à la membrane plasmique. La PI3K induit à son tour le recrutement à la membrane de la kinase Akt *via* la génération de PIP₃ (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate). Akt est ensuite activé par phosphorylation *via* les PDKs (Phosphoinositide-Dependent Kinases). Le suppresseur de tumeur PTEN est le régulateur négatif majeur de cette voie, il déphosphoryle PIP₃ *via* son activité de phosphatase et inhibe la signalisation PI3K/Akt (Carracedo and Pandolfi, 2008; Fulda, 2009). Akt est un médiateur clé de cette voie, il permet d'une part la survie cellulaire en inhibant les processus apoptotiques à différents niveaux et stimule d'autre part la prolifération cellulaire, le métabolisme cellulaire et l'angiogenèse (Manning and Cantley, 2007; Song *et al.*, 2005; Vara *et al.*, 2004). La voie PI3K/Akt/mTOR est une des voies les plus fréquemment altérée dans les cancers, et est touchée à tous les niveaux. On retrouve notamment des mutations activatrices des RTKs, des amplifications de *PI3K* ou d'*AKT* ou des mutations leur conférant une activité constitutive, ou encore des mutations perte de fonction ou des délétions de *PTEN* (Yuan and Cantley, 2008).

Dans les neuroblastomes, l'activation d'Akt est un marqueur de mauvais pronostic et corrèle avec d'autres marqueurs négatifs comme l'amplification de *MYCN* ou la délétion chromosomique 1p36 (Opel *et al.*, 2007). L'oncosuppresseur *PTEN* est rarement muté dans les neuroblastomes mais peut être fréquemment inactivé par l'hyperméthylation de son promoteur (Hoebeeck *et al.*, 2009).

Le traitement des cellules SH-SY5Y par ajout du peptide 1-42 amyloïde- β , par H₂O₂ ou par déplétion de sérum induit l'apoptose, et cet effet est inhibé par un pré-traitement au bilobalide qui induit l'augmentation de l'activité PI3K et de la phosphorylation d'Akt (Shi *et al.*, 2010). L'inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR par un traitement à la rapamycine (inhibiteur de mTOR) diminue la prolifération de plusieurs lignées cellulaires de neuroblastomes portant une amplification de *MYCN* (SK-N-AS, , SK-N-FI, SH-SY5Y, SK-N-SH) ou non (IMR-32, SK-N-DZ, SK-N-BE(2)). L'amplification ou la surexpression de *MYCN* sensibilise les cellules à l'effet anti-prolifératif de la rapamycine. Dans les cellules SH-SY5Y et SK-N-AS, la rapamycine induit l'apoptose et le clivage de la caspase-3 et de son substrat PARP mais pas de la caspase-9, suggérant l'implication de la voie extrinsèque de l'apoptose. Le traitement combiné des lignées SK-N-AS et SK-N-BE(2) par la rapamycine et un inhibiteur de PI3K a un effet cytotoxique synergique ou additif sur ces cellules, indépendamment du statut de *MYCN*, et augmente l'effet anti-prolifératif. Cet effet est confirmé *in vivo* par une réduction de la croissance

tumorale de souris nude ayant subi des xénogreffes de cellules SH-SY5Y et traitées par la rapamycine, par rapport aux souris non traitées (Johnsen *et al.*, 2008).

Dans les lignées SK-N-SH, SK-N-BE(2c), LAN-1 et IMR-32, l'inhibition de PI3K induit la diminution de l'expression des IAPs cIAP1 et survivine. La combinaison de l'inhibition de PI3K et d'un traitement par le ligand de récepteur à domaine de mort TRAIL augmente l'apoptose induite par TRAIL seul dans les cellules SK-N-SH (Kim *et al.*, 2004b). De la même façon, la combinaison d'un traitement à la doxorubicine et d'un inhibiteur de PI3K diminue la prolifération cellulaire dans les lignées SH-SY5Y et SK-N-BE(2) *via* un arrêt du cycle en phase G₁. Dans les cellules SH-SY5Y, l'inhibiteur de PI3K seul n'a pas d'effet sur l'apoptose, et la combinaison de l'inhibiteur de PI3K avec un traitement à la doxorubicine augmente très fortement l'apoptose induite par la doxorubicine seule, ainsi que le clivage de BID, l'activation de BAX et de la caspase-3. *In vivo*, les souris nude portant des xénogreffes de cellules SK-N-BE(2) et traitées par la thérapie combinée (inhibiteurs PI3K et doxorubicine) présentent une croissance tumorale fortement réduite par rapport aux souris soumises aux monothérapies (Geng *et al.*, 2015).

Dans les cellules SH-SY5Y, l'apoptose induite par la doxorubicine est inhibée par la voie BDNF-TrkB et l'activation de la voie de survie PI3K/Akt/mTOR (Ho *et al.*, 2002; Jaboin *et al.*, 2002). L'inhibition d'Akt *via* l'expression d'un mutant dominant négatif ou l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique sensibilise les cellules SH-SY5Y à l'apoptose induite par la doxorubicine et bloque l'effet anti-apoptotique du BDNF (Li *et al.*, 2005). Dans les cellules SH-SY5Y, la surexpression du récepteur TrkB induit une forte augmentation du niveau d'Akt constitutivement phosphorylé et une chimiorésistance aux traitements génotoxiques (Ho *et al.*, 2002).

Dans les cellules SH-EP, la combinaison d'un inhibiteur de PI3K et de la doxorubicine diminue l'expression du gène anti-apoptotique *MCL-1*, diminue la phosphorylation de BIM, et augmente l'expression des gènes pro-apoptotiques *NOXA* et *BIM*. Cette modification du ratio pro- et anti-apoptotiques induit la perte du potentiel membranaire mitochondrial, le relargage du cytochrome c, l'activation des caspases-9 et -3 et l'apoptose caspase-dépendante (Bender *et al.*, 2011).

3 - Neuroblastomes & FGFs

L'effet neurotrophique et mitogénique des FGFs a été étudié dans plusieurs lignées cellulaires de neuroblastomes, le plus communément étudié étant le FGF2. Le traitement par du FGF2 recombinant ajouté au milieu de culture induit la prolifération des lignées de neuroblastome humaines SH-SY5Y (Babajko *et al.*, 1997; Janet *et al.*, 1995; Lavenius *et al.*, 1994; Scheil *et al.*, 1994), SK-N-SH et IMR-32, en absence ou présence de sérum pour cette dernière (Janet *et al.*, 1995;

Lüdecke and Unsicker, 1990; Scheil *et al.*, 1994). Le FGF2 induit également la prolifération de la lignée de type S SH-EP, uniquement lorsque *MYCN* y est amplifié (Schweigerer *et al.*, 1991). Du fait de l'hétérogénéité des lignées cellulaires, le FGF2 peut avoir des effets opposés selon les lignées considérées. Il a ainsi un effet anti-prolifératif sur les lignées neuroblastiques SK-N-MC (Gentilella *et al.*, 2008; Russo *et al.*, 2004), CHP100 et GIMEN (Janet *et al.*, 1995). Dans la lignée GIMEN, cet effet antiprolifératif du FGF2 est inhibé par l'ajout d'interféron γ et augmenté par l'ajout d'interleukine 1β (Scheil *et al.*, 1994). Dans la lignée SK-N-MC, le FGF2 inhibe la prolifération induite ou non par l'IGF1 en augmentant l'expression des régulateurs négatifs du cycle p21 et Id-1 (Inhibitor of differentiation-1) et en promouvant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G_1/G_0 . Le FGF2 induit la différenciation de ces cellules notamment *via* l'activation de l'expression des métalloprotéases MMP2 et MMP9, impliquées dans la différenciation neuronale et la formation d'extensions neuritiques, ou du marqueur de différenciation neuronale TUBB3 (neuron-specific class III β -tubulin) (Higgins *et al.*, 2009; Passiatore *et al.*, 2011; Russo *et al.*, 2004).

Le FGF2 induit la différenciation des lignées humaines NB69 (Mena *et al.*, 1995), IMR-32 en absence de sérum (Lüdecke and Unsicker, 1990) et SK-N-MC en absence ou présence de sérum (Kim *et al.*, 2004a; Russo *et al.*, 2004). Le traitement de la lignée humaine SH-SY5Y par le TPA (Tetradecanoyl Phorbol Acetate, ou PMA pour Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), un inducteur de ROS et activateur des PKC, induit leur différenciation en présence ou en absence de sérum (Fagerström *et al.*, 1996; Lavenius *et al.*, 1994; Parrow *et al.*, 1995). L'ajout de FGF2 et de TPA en absence de sérum induit la différenciation des cellules SH-SY5Y (Lavenius *et al.*, 1994). Le traitement de ces cellules par le FGF2 en combinaison avec l'IGF1 en présence de sérum (Fagerström *et al.*, 1996) induit également leur différenciation et implique les PKC, puisque cette différenciation est fortement diminuée par l'inhibiteur de PKC GF 109203X (Fagerström *et al.*, 1996). Dans la lignée murine cholinergique N2a, la surexpression de l'antigène neuronal BM88 induit leur différenciation. L'ajout de FGF2 dans les N2a-BM88 augmente leur activité choline acétyltransférase (ChAT), tandis qu'il n'a pas d'effet sur les cellules N2a non transfectées (Gomez *et al.*, 1998). Le FGF2 induit la différenciation des cellules N2a par un mécanisme requérant la palmitoylation des NCAM140 et NCAM180, et impliquant les PKC (Ponimaskin *et al.*, 2008).

Le FGF2 ainsi que le FGF4 ont un effet anti-apoptotique dans la lignée SH-SY5Y où ils protègent les cellules de l'apoptose induite par le monoxyde d'azote (NO) (Wagle and Singh, 2000). Dans les lignées SH-SY5Y et SK-N-BE2, le knockdown de la survivine (IAP) par shRNA en combinaison avec l'agent chimiothérapeutique EGCG (Epigallocatechin-3-gallate, cible Fas, les voies des MAPK et NF- κ B) d'une part, ou bien le traitement par le 4-HPR (4-hydroxy(phenyl)retinamide, inducteur de ROS) et la génistéine (activateur épigénétique de gènes suppresseurs de tumeurs comme PTEN ou p53

(Kikuno *et al.*, 2008)) d'autre part, active les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose, ce qui corrèle avec une diminution du niveau protéique du FGF2 (Hossain *et al.*, 2012; Janardhanan *et al.*, 2009). En revanche, le FGF2 semble avoir un rôle pro-apoptotique dans la lignée SK-N-MC : l'ajout de FGF2 aggrave l'apoptose induite par l'absence de sérum, et inhibe le rôle protecteur de l'IGF1 (Russo *et al.*, 2004).

Le FGF1 recombinant ajouté au milieu de culture peut induire la prolifération ainsi que la différenciation de la lignée humaine NB69, tandis que le mutant FGF1^{K132E} recombinant n'a pas d'effet (Mena *et al.*, 1995). Dans les cellules SH-SY5Y, le FGF1 recombinant induit leur prolifération en absence ou en présence de sérum (Babajko *et al.*, 1997; Lavenius *et al.*, 1994), et son ajout en combinaison avec le TPA en absence de sérum induit leur différenciation (Lavenius *et al.*, 1994). L'ajout de FGF1 recombinant en absence de sérum induit la différenciation des cellules SH-SY5Y et les protège de la mort induite par l'absence de sérum. Dans les mêmes conditions, la surexpression de FGF1 induit les mêmes effets, et en particulier induit l'augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (Raguenez *et al.*, 1999). Pour les lignées murines de neuroblastome, le FGF1 recombinant induit la prolifération des cellules NIE115 (Barritault *et al.*, 1981), mais n'a pas d'effet sur les lignées N18 ou N4TG1 (Lim *et al.*, 1990; Lu and Chang, 1991).

4 - Les autres facteurs de croissance dans les neuroblastomes

Parmi les facteurs de croissance les mieux caractérisés dans les neuroblastomes, IGF1 et IGF2 stimulent la prolifération de nombreuses lignées comme les SH-SY5Y (Babajko *et al.*, 1997; Mattsson *et al.*, 1986). L'IGF1, et dans une moindre mesure l'IGF2, peuvent induire la différenciation des cellules SH-SY5Y en combinaison avec le TPA *via* l'IGF-RI (Pahlman *et al.*, 1991). Dans la lignée murine N4TG1, l'ajout d'IGF1 induit la prolifération sur des temps courts (1-2 jours) mais potentialise la différenciation induite par le Bt₂cAMP sur des temps longs (3-7 jours) (Lu and Chang, 1991). L'amplification de l'oncogène *MYCN*, qui est la mutation la plus communément retrouvée dans les neuroblastomes, conduit à l'augmentation de l'expression du récepteur IGF-IR (Chambéry *et al.*, 1999). L'IGF1 protège les cellules SH-EP1 (neuroblastome humain) de l'apoptose induite par le MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium) *via* l'activation de la voie de survie PI3K/Akt (Wang *et al.*, 2010a). Le traitement de la lignée SH-SY5Y pendant 24h par l'IGF1, l'IGF2 ou l'insuline induit un effet mitogénique, tandis que le FGF2 n'induit cet effet que plus tardivement (72h) (Babajko *et al.*, 1997).

Le NGF et l'EGF induisent de façon comparable au FGF2 la prolifération des lignées IMR-32, SK-N-SH et SH-SY5Y ; le NGF induit la prolifération des lignées GICAN et GIMEN, et l'EGF induit la prolifération des lignées NMB, SK-N-MC et SH-EP (Ho, 2005; Janet *et al.*, 1995). Il est à noter que pour certaines lignées comme GIMEN, le NGF induit leur prolifération tandis que l'EGF et le FGF2

l'inhibent. En présence de sérum, le NGF induit la prolifération de la lignée IMR-32 comme le FGF2, et induit leur différenciation en absence de sérum (Lüdecke and Unsicker, 1990). L'ajout combiné d'acide rétinoïque et de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) en absence de sérum induit la différenciation terminale de cellules SH-SY5Y en neurones (Encinas *et al.*, 2000). De plus, le BDNF protège les cellules SH-SY5Y exprimant le récepteur TrkB de l'apoptose induite par différents agents thérapeutiques comme l'étoposide, le cisplatine ou la vinblastine, et ce en activant la voie de survie PI3K/Akt (Jaboin *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005).

VI Projet de recherche

Le FGF1 est un facteur de croissance qui présente la particularité de pouvoir agir par deux voies distinctes : d'une part une voie extracrine impliquant les FGFRs et mettant en jeu l'activation de différentes voies de signalisation ; et d'autre part par son absence de séquence de sécrétion ainsi que ses séquences de nucléarisation, une voie d'action intracrine et en particulier nucléaire dont les mécanismes sont à ce jour très peu décrits. De nombreux types de cancer présentent une surexpression de la protéine FGF1, ce qui peut parfois être corrélé à une chimiorésistance. Les thérapies combinent une action cytotoxique avec une inhibition de voies de survie comme PI3K/Akt/mTOR mettant en jeu les récepteurs tyrosine kinase. L'activité intracrine du FGF1 et indépendante des RTKs pourrait donc expliquer la résistance aux chimiothérapies dans les tumeurs présentant une surexpression du FGF1.

L'activité intracellulaire du FGF1 intéresse particulièrement notre laboratoire qui travaille sur la régulation des mécanismes d'apoptose impliquant la protéine p53. Le gène *p53* est un oncosuppresseur muté dans plus de la moitié des cancers humains. C'est l'un des régulateurs majeurs du devenir cellulaire et de la prévention de la tumorigenèse. La mise en évidence de régulations de la voie p53 par des facteurs de croissance intracellulaires comme le FGF1 permettra de mieux comprendre les interactions existant entre les voies d'actions des oncogènes et oncosuppresseurs qui sont dérégulées lors de la progression tumorale. Ceci, combiné à une meilleure caractérisation des voies de signalisation intracellulaire et nucléaire médiées par le FGF1, permettra de proposer de nouveaux traitements chimiothérapeutiques plus efficaces et mieux ciblés.

1 - Travaux précédemment menés dans l'équipe

Notre équipe étudie depuis plusieurs années le rôle du FGF1 intracellulaire principalement dans les cellules PC12 (modèle de cellules neuroendocriniennes issues d'un phéochromocytome de rat), ainsi que dans les cellules REtsAF (fibroblastes embryonnaires de rat). Dans ces cellules, le FGF1 intracellulaire induit la survie des cellules en absence de sérum ou suite à l'induction de l'apoptose dépendante de p53, où le FGF1 régule notamment la stabilité et l'activité de facteur de transcription de la protéine p53 au cours de la voie mitochondriale de l'apoptose (Bouleau *et al.*, 2005; Renaud *et al.*, 1996b; Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009).

Dans les cellules REtsAF, l'équipe a montré que le gène *FGF1* était un nouveau gène cible de p53 qui induit la répression de son expression lors de l'induction de la voie mitochondriale de l'apoptose. A l'inverse, la surexpression du FGF1 inhibe les activités pro-apoptotique et anti-proliférative de p53, en induisant l'accumulation de son inhibiteur MDM2 et en accélérant ainsi la dégradation de p53. Le

FGF1 diminue la stabilité de p53 et modifie certaines de ses activités transactivatrices : l'activation de l'expression du gène pro-apoptotique *BAX* induite par p53 est diminuée en présence de FGF1 (Bouleau *et al.*, 2005). Dans les cellules REtsAF, l'activité anti-apoptotique du FGF1 passe donc à la fois par une régulation de la stabilité et du niveau de p53, mais également par une modulation de ses activités transcriptionnelles (**Figure 29**).

Dans les cellules PC12, le FGF1 présente une activité anti-apoptotique ainsi qu'une activité neurotrophique. En effet, sous l'action de FGF1 recombinant ou bien d'une surexpression de FGF1 intracellulaire, les cellules PC12 se différencient en neurones de type sympathique (Renaud *et al.*, 1996b). La surexpression de FGF1 dans un contexte d'induction de l'apoptose dépendante de p53 par ajout d'étoposide (agent chimiothérapeutique) conduit à une diminution de l'activation de p53, reflétée par une baisse de sa phosphorylation ainsi qu'une diminution de la transactivation de son gène cible *PUMA*. Cette inhibition de p53 par le FGF1 conduit à une forte diminution de l'activité des caspases ainsi qu'à une diminution de l'apoptose dépendante de p53 en amont des événements mitochondriaux et nucléaires (Bouleau *et al.*, 2007; Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009). De plus, la nucléarisation du FGF1 dans ces cellules est un événement crucial pour ses activités, puisque la surexpression d'une forme mutante du FGF1 déléetée de sa séquence de nucléarisation (FGF1^{ΔNLS}) ne permet d'induire ni la survie suite à l'induction de l'apoptose dépendante de p53, ni la différenciation neuronale (**Figure 30**).

D'autre part, l'équipe a mis en évidence pour la première fois une interaction entre la protéine p53 et le FGF1 par co-immunoprécipitation (Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009). Contrairement au FGF1 sauvage (FGF1^{WT}), le FGF1^{ΔNLS} ne co-précipite pas avec p53, ce qui suggère que l'interaction FGF1/p53 pourrait être impliquée dans la régulation des activités transcriptionnelles de p53 (**Figure 30**).

Cellules REtsAF

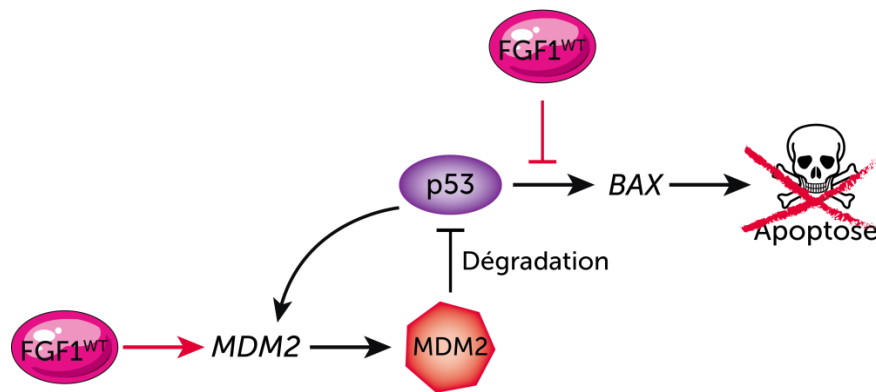


Figure 29 : Le FGF1 intracellulaire a une activité anti-apoptotique dans les cellules REtsAF

Dans les cellules REtsAF, le FGF1 intracellulaire induit l'expression de MDM2, ce qui diminue la stabilité et le niveau de p53. De plus, le FGF1 module les activités transcriptionnelles de p53 en inhibant la transactivation du gène *BAX*. D'après (Bouleau *et al.*, 2005).

Cellules PC12

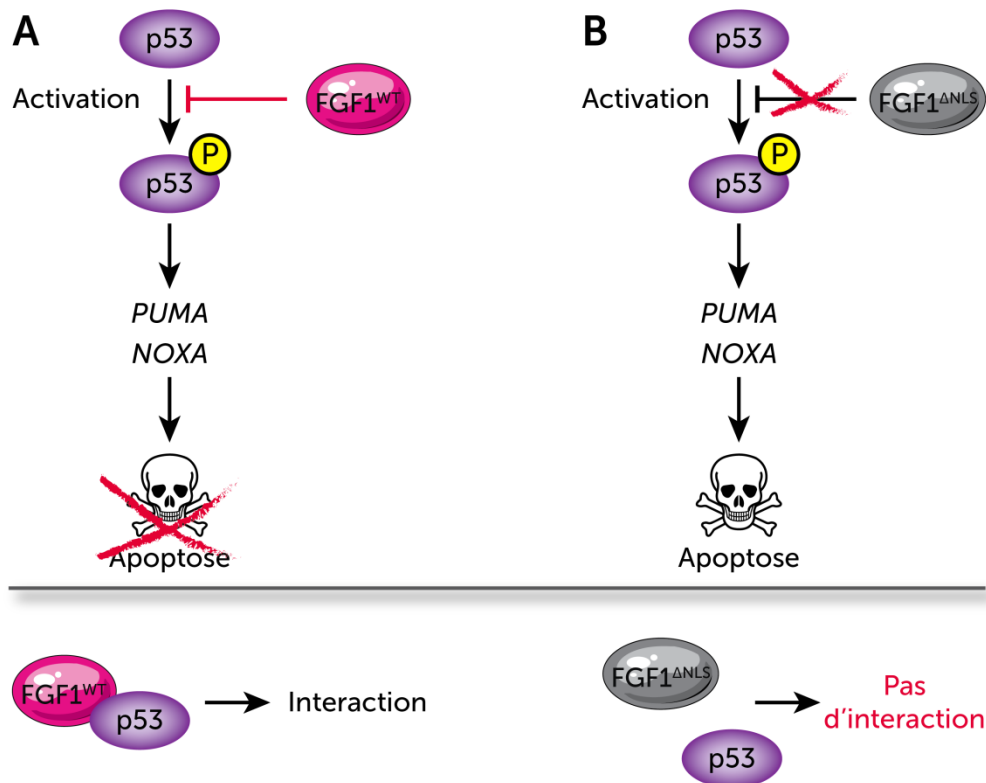


Figure 30 : La nucléarisation du FGF1 est requise pour son activité anti-apoptotique dans les cellules PC12

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

2 - Projet de thèse

Notre équipe a montré que le FGF1 intracellulaire présente une activité anti-apoptotique dans deux modèles cellulaires différents, et que la nucléarisation du FGF1 est indispensable à cette activité. Les mécanismes d'action intracellulaires et nucléaires du FGF1 étant très peu décrits, mon projet de thèse a donc eu pour but de les caractériser.

Pour cela, des formes mutantes du FGF1 mutées dans le domaine C-terminal ont été générées (FGF1^{S130A}, non-phosphorylable ; FGF1^{S130D}, mime constitutivement une phosphorylation), et le mutant FGF1^{K132E} a également été étudié. Les activités extracellulaires de ce mutant FGF1^{K132E} ont été étudiées par différentes équipes. Ce mutant présente la même capacité de liaison aux FGFRs que le FGF1^{WT}, mais une affinité plus faible pour les héparane sulfates. En réponse au FGF1^{K132E}, les FGFRs sont activés et induisent la cascade des MAPK (Klingenberg *et al.*, 1998; Renaud *et al.*, 1996b). Le FGF1^{K132E} extracellulaire peut être internalisé et nucléarisé (Klingenberg *et al.*, 1998), en revanche son activité mitogénique est fortement réduite (Burgess *et al.*, 1990), son activité neurotrophique est absente dans les cellules PC12 (Renaud *et al.*, 1996b), et, contrairement au FGF1^{WT}, n'interagit pas avec la protéine FIBP (Kolpakova *et al.*, 1998).

La lysine 132 est située à proximité de la sérine 130, qui est le seul site de phosphorylation décrit à ce jour du FGF1. La mutation de cette lysine pourrait donc modifier la phosphorylation du FGF1 et donc ses activités intracellulaires. En effet, le FGF1 est phosphorylé dans le noyau par la PKC δ , ce qui induirait son export vers le cytosol puis sa dégradation (Wiedlocha *et al.*, 2005). Les activités extracellulaires des formes non-phosphorylables ou mimant constitutivement la phosphorylation du FGF1 ont été étudiées dans des fibroblastes murins et il a été montré que celles-ci présentaient la même capacité que le FGF1^{WT} à activer la cascade des MAPK ou à être nucléarisées. Elles présentent en revanche une activité mitogénique réduite par rapport au FGF1^{WT} (Klingenberg *et al.*, 1999).

Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'étude des activités intracellulaires de ces mutants (FGF1^{S130A}, FGF1^{S130D}, FGF1^{K132E}) dans les cellules PC12 (**Article 1**). Les mécanismes d'action du FGF1 intracellulaire n'ayant jamais été étudiés chez l'Homme, j'ai utilisé un modèle de neuroblastome humain (cellules SH-SY5Y) ainsi qu'un autre modèle neuroblastique murin (cellules N2a) afin de voir si les mécanismes mis à jour dans les cellules PC12 sont communs à d'autres types cellulaires neuronaux d'une part, et s'ils sont généralisables à d'autres organismes d'autre part (**Article 2**).

D'autre part, sachant que la nucléarisation du FGF1 est nécessaire à son activité anti-apoptotique et qu'il est capable d'interagir avec le facteur de transcription p53, nous avons émis l'hypothèse que le FGF1 pourrait agir comme un facteur ou co-facteur de transcription, indépendamment ou non de

p53, en régulant l'expression de gènes impliqués dans le processus apoptotique. En effet, il a déjà été montré que d'autres facteurs de croissance et/ou leurs récepteurs peuvent agir comme des facteurs ou co-facteurs de transcription (NGF, EGFR, VEGFR2, FGFR1, **cf. Chapitre III** – p. 43). Dans ce but, j'ai initié une étude transcriptomique dans les cellules PC12 afin de pouvoir déterminer si le FGF1 intracellulaire peut réguler l'expression de gènes impliqués dans la régulation des processus de mort/survie cellulaires (**Résultats complémentaires**).

Résultats

I Article 1 : Caractérisation des activités neurotrophiques et anti-apoptotiques du FGF1 dans les cellules PC12

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

Des vecteurs permettant l'expression de ces différentes formes mutantes du FGF1 ont été générés par mutagenèse dirigée. Les cellules PC12 ont ensuite été transfectées de façon stable avec ces vecteurs d'expression possédant un promoteur inductible à la dexaméthasone et codant soit pour la forme sauvage du FGF1 soit pour les formes mutantes FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D}.

Des clones cellulaires exprimant des niveaux comparables de FGF1 ont été sélectionnés pour chaque forme étudiée. L'étude précédemment menée par l'équipe ayant montré que la localisation nucléaire du FGF1 est nécessaire à ses activités intracellulaires (Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009), la localisation subcellulaire de ces différentes formes de FGF1 a été étudiée. Toutes les formes de FGF1 mutées sont, comme le FGF1^{WT}, localisées à la fois dans le cytosol et le noyau. L'activité neurotrophique des différentes formes de FGF1 a également été étudiée. Pour cela, des populations polyclonales de cellules PC12 transfectées ont été traitées avec de la dexaméthasone pendant 12 jours, afin d'induire l'expression des différentes formes de FGF1.

Les clones présentant des extensions neuritiques longues et ramifiées, marqueur morphologique de la différenciation neuronale de ces cellules, ont été dénombrés. Nous avons ainsi pu montrer que les formes FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D} induisent la différenciation neuronale des cellules PC12. En revanche, la forme FGF1^{K132E} ne présente quant à elle aucune activité neurotrophique puisqu'elle n'induit pas la différenciation neuronale des cellules PC12 et ne les protège pas de la mort induite par l'absence de sérum (**Figure 31A**).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'activité anti-apoptotique des différentes formes de FGF1 dans les cellules PC12 suite à l'activation de l'apoptose induite par p53. Les lignées stables obtenues après transfection des cellules PC12 ont été traitées pendant 48h avec de la

dexaméthasone afin d'induire l'expression des différentes formes de FGF1, puis avec de l'étoposide pendant 40h afin d'induire l'apoptose dépendante de p53. La survie cellulaire a été analysée par un marquage des noyaux des cellules viables avec du violet cristal. Nos résultats montrent que la forme mutante FGF1^{S130A} a une activité anti-apoptotique dans les cellules PC12, tout comme le FGF1^{WT}. En revanche, ni le FGF1^{S130D} ni le FGF1^{K132E} ne permettent la survie des cellules PC12 suite à l'ajout d'étoposide. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de la phosphorylation de p53 (Ser15), la transactivation de la protéine pro-apoptotique PUMA par p53 et de l'activation de la caspase-3 par western blot. Dans les cellules exprimant les différentes formes anti-apoptotiques du FGF1 (FGF1^{WT} et FGF1^{S130A}), on observe une diminution de la phosphorylation de p53 sur son résidu sérine 15, du niveau de PUMA et du clivage de la caspase-3, ce qui est corrélé avec l'inhibition de l'apoptose observée (**Figure 31B**). Dans les cellules exprimant les formes FGF1^{K132E} et FGF1^{S130D}, la diminution de ces différents marqueurs de l'apoptose est moins importante, ce qui explique la faible survie cellulaire observée. Enfin, l'inhibition des FGFRs ou du FGF1 par un anticorps neutralisant diminue l'effet neurotrophique du FGF1 recombinant extracellulaire (rFGF1), mais pas des FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} ou FGF1^{S130D} intracellulaires, soulignant ainsi le mode d'action intracellulaire du FGF1 et de ses mutants dans les cellules PC12.

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

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

« **FGF1 C-terminal domain and phosphorylation regulate intracrine FGF1 signaling for its neurotrophic and anti-apoptotic activities** » Elisabeth Delmas, Nadège Jah, Caroline Pirou, Sylvina Bouleau, Nathalie Le Floch, Jean-Luc Vayssière, Bernard Mignotte and Flore Renaud, *Cell Death Dis.* 7, e2079.

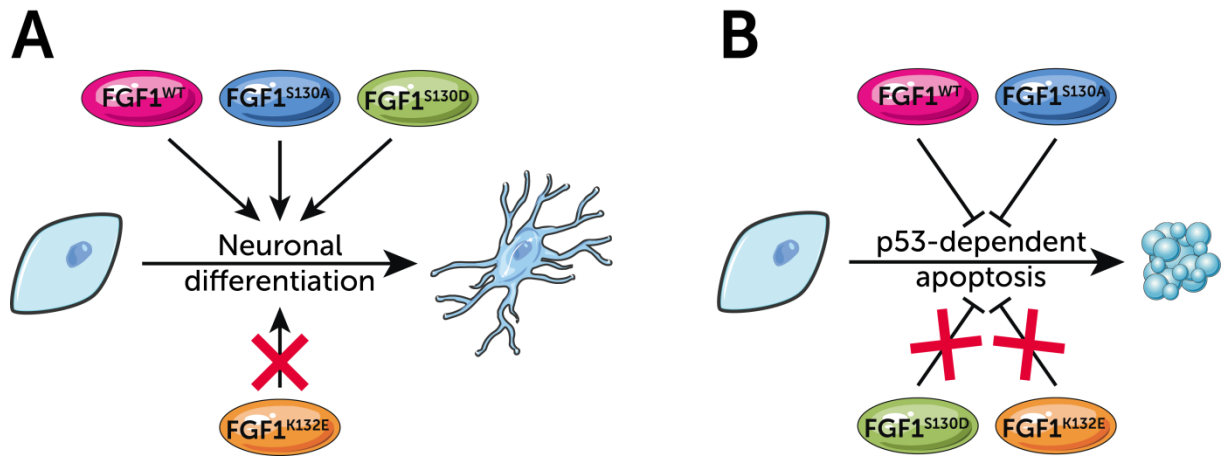


Figure 31 : Activités intracellulaires et localisation de FGF1 et de ses formes mutantes

A : Le FGF1^{WT} intracellulaire induit la différenciation neuronale des cellules PC12 en neurones de type sympathique. Seule la mutation K132E inhibe cette activité. **B :** Le FGF1^{WT} et le FGF1^{S130A} protègent les cellules PC12 de l'apoptose dépendante de p53, contrairement aux FGF1^{S130D} et FGF1^{K132E}. Toutes ces formes présentent une localisation à la fois cytosolique et nucléaire. Issu de (Delmas *et al.*, 2016).

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

E Delmas¹, N Jah¹, C Pirou¹, S Bouleau¹, N Le Floch¹, J-L Vayssière¹, B Mignotte¹ and F Renaud^{*1}

Fibroblast growth factor 1 (FGF1) is a prototypic member of the FGFs family overexpressed in various tumors. Contrarily to most FGFs, FGF1 lacks a secretion peptide signal and acts mainly in an intracellular and nuclear manner. Intracellular FGF1 induces cell proliferation, differentiation and survival. We previously showed that intracellular FGF1 induces neuronal differentiation and inhibits both p53- and serum-free-medium-induced apoptosis in PC12 cells. FGF1 nuclear localization is required for these intracellular activities, suggesting that FGF1 regulates p53-dependent apoptosis and neuronal differentiation by new nuclear pathways. To better characterize intracellular FGF1 pathways, we studied the effect of three mutations localized in the C-terminal domain of FGF1 (i.e., FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D}) on FGF1 neurotrophic and anti-apoptotic activities in PC12 cells. The change of the serine 130 to alanine precludes FGF1 phosphorylation, while its mutation to aspartic acid mimics phosphorylation. These FGF1 mutants kept both a nuclear and cytosolic localization in PC12 cells. Our study highlights for the first time the role of FGF1 phosphorylation and the implication of FGF1 C-terminal domain on its intracellular activities. Indeed, we show that the K132E mutation inhibits both the neurotrophic and anti-apoptotic activities of FGF1, suggesting a regulatory activity for FGF1 C terminus. Furthermore, we observed that both FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} mutant forms induced PC12 cells neuronal differentiation. Therefore, FGF1 phosphorylation does not regulate FGF1-induced differentiation of PC12 cells. Then, we showed that only FGF1^{S130A} protects PC12 cells against p53-dependent apoptosis, thus phosphorylation appears to inhibit FGF1 anti-apoptotic activity in PC12 cells. Altogether, our results show that phosphorylation does not regulate FGF1 neurotrophic activity but inhibits its anti-apoptotic activity after p53-dependent apoptosis induction, giving new insight into the poorly described FGF1 intracrine/nuclear pathway. The study of nuclear pathways could be crucial to identify key regulators involved in neuronal differentiation, tumor progression and resistances to radio- and chemo-therapy.

Cell Death and Disease (2016) 7, e2079; doi:10.1038/cddis.2016.2; published online 4 February 2016

The fibroblast growth factor 1 (FGF1) is one of the 22 members of the FGF family.¹ Most FGFs are secreted and mediate their activity through FGF receptors (FGFR1–4) located at the plasma membrane, which induce Ras (rat sarcoma)/mitogen-associated protein kinases, PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT and phospholipase C γ pathways.^{2,3} However, the fate of all FGF members is not always to be secreted. In particular, FGF1, FGF2, one FGF3 isoform and FGF11–14, which do not contain any secretion peptide signal, are not secreted in physiological conditions and mediate their activity by intracrine pathways. Most of these intracrine factors contain one or more nuclear localization sequences (NLS), which regulate their nuclear translocation, a process required for their activities.^{4–7} For example, FGF1 lacks a secretion peptide signal but contains a NLS (KKPK) and acts mainly in an intracellular and nuclear manner.^{4,8} Intracellular FGF1 is a neurotrophic factor for various neuronal cells both *in vitro* and

in vivo.^{9–13} It also activates DNA synthesis,^{4,14,15} exerts an anti-apoptotic activity,^{11,16,17} and its overexpression correlates with tumor development and chemotherapy resistance.^{18–20}

We have previously shown that intracellular FGF1 inhibits p53-dependent apoptosis by an intracrine pathway in both fibroblasts and neuronal-like cells.^{16,17} Using fibroblasts, we have shown that *fgf1* is a repressed target gene of p53 and that overexpression of FGF1 decreases both the pro-apoptotic and the anti-proliferative activities of p53. In these cells, intracellular FGF1 mediates its activities by two mechanisms of action: (i) FGF1 increases MDM2 (mouse double minute 2) expression, which leads to p53-degradation; (ii) FGF1 decreases p53-dependent transactivation of *bax*, which encodes a pro-apoptotic B-cell lymphoma 2 family (Bcl-2) member protein required for p53-dependent apoptosis in fibroblasts.¹⁶

FGF1 is highly expressed in central and peripheral nervous systems and its neurotrophic and anti-apoptotic activities are

¹Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589 Université de Versailles St Quentin en Yvelines (UVSQ), Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE), UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, Montigny-Le-Bretonneux 78180, France

*Corresponding author: F Renaud, Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589 Université de Versailles St Quentin en Yvelines (UVSQ), Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE), UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, 2 avenue de la Source de la Bièvre, Montigny-Le-Bretonneux 78180, France. Tel: +33 1 70 42 94 53; Fax: +33 1 70 42 95 03; E-mail: flore.renaud@uvsq.fr

Abbreviations: DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FCS, fetal calf serum; FGF, fibroblast growth factor; FGF1, fibroblast growth factor 1; FGFR, fibroblast growth factor receptor; HS, horse serum; NLS, nuclear localization sequence; PKC δ , protein kinase C delta; P-p53, phospho-p53; PUMA, p53-upregulated modulator of apoptosis; Ser 15, Serine 15

Received 09.9.15; revised 17.12.15; accepted 23.12.15; Edited by A Verkhatsky

well documented *in vitro* and *in vivo*.^{11,13,21–24} However, the mechanisms of action of FGF1 for these activities remain to be characterized. Thus, we have pursued our study in neuronal-like PC12 cells. We showed that FGF1 inhibits both p53-dependent and serum free-medium-induced apoptosis and exerts its neurotrophic activity by an intracrine pathway in PC12 cells.¹⁷ Using the FGF1^{ΔNLS} mutant that is deleted of its NLS, we showed that the FGF1 nuclear translocation is required for both its anti-apoptotic and neurotrophic activities. Intracellular FGF1 regulates p53-dependent apoptosis by decreasing p53 phosphorylation on serine 15, which is a marker of its activation, p53-dependent transactivation of *puma*, which encodes a pro-apoptotic Bcl-2 family member required for p53-dependent cell death in PC12 cells, and caspase-3 activation. All these effects of FGF1 cooperate to protect PC12 cells from p53-dependent apoptosis. The FGF1^{ΔNLS} mutant, which only presents a cytosolic localization, has no effect on p53-dependent apoptosis in PC12 cells. Altogether, these data suggest that FGF1 regulates p53-dependent apoptosis and neuronal differentiation by new intracrine/nuclear pathways.¹⁷

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

Previous studies using recombinant FGF1^{K132E} showed that it could bind FGF receptors, induced the mitogen-associated protein kinase pathway but it induced neither cell proliferation nor neuronal differentiation.^{11,15,25} However, the activity of the intracellular FGF1^{K132E} remained unknown.

We also studied two other mutants of the C-terminal domain of FGF1. Mutation of the serine 130 into an alanine or aspartic acid was performed to examine the role of FGF1 phosphorylation on FGF1 intracrine activities. Indeed, FGF1 is phosphorylated on serine 130 by the protein kinase C delta (PKCδ) in the nucleus.^{26,27} Mutation of this serine into an alanine abolishes FGF1 phosphorylation, while its mutation into an aspartic acid mimics FGF1 phosphorylation. Both recombinant FGF1 mutants could bind FGF receptors, be internalized in cells and translocated to the nucleus but they presented a reduced mitogenic activity.²⁸ In the present study, FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} were overexpressed in PC12 cells to examine their intracellular activities. We showed that all these FGF1 mutants display a nuclear and cytosolic localization. However, their activities differed. The K132E mutation inhibited both neurotrophic and anti-apoptotic activities of FGF1. Both FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} mutants could induce PC12 cells neuronal differentiation, whereas only FGF1^{S130A} protected PC12 cells from p53-dependent apoptosis. Altogether our study shows that the FGF1 C-terminal domain is involved in the regulation of both its neurotrophic and its anti-apoptotic activity and that FGF1 phosphorylation regulates its anti-apoptotic activity whereas it does not interfere with its neuronal differentiation activity.

Results

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

Stable Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines were cultured in the absence or presence of dexamethasone for 48 h to induce FGF1 expression. FGF1 protein levels were analyzed by western blot (Figure 1b). Endogenous rat FGF1 was undetectable by western blot in control cells. In the absence of dexamethasone, FGF1 is detectable in FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines, suggesting that the MMTV-LTR promoter is leaky in the absence of glucocorticoid addition. However, a threefold increase of FGF1 levels was detected in FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cells lines after dexamethasone treatment.

We previously showed that FGF1 nuclear localization is required for its intracellular activities in PC12 cells.¹⁷ To study FGF1^{K132E} subcellular localization, cytosolic and nuclear protein extracts from FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines were analyzed by western blot (Figure 1c). Enolase and Lamin A/C were used as purity controls for cytosolic and nuclear fractions, respectively. Both proteins were mainly detected in their respective fraction. In transfected PC12 cells, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} were both detected in cytosolic and nuclear fractions suggesting that FGF1^{K132E} can be translocated to the nucleus, similarly as FGF1^{WT}.

The K132E mutation inhibits FGF1 neurotrophic activity.

In PC12 cells, intracellular FGF1 induced both neuronal differentiation and cell survival in serum-free medium.^{11,17} To test if the K132E mutation could modify the intracellular FGF1 neurotrophic activity, PC12 cell lines (Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E}) were cultured for 7 days in the absence or presence of dexamethasone to induce FGF1 expression. Cell morphology was then observed by phase contrast microscopy (Figure 2a). In the absence of dexamethasone, PC12 cells (Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E}) presented an undifferentiated phenotype. In the presence of dexamethasone, only FGF1^{WT} PC12 cells presented long and ramified neuritis, which is characteristic of PC12 cells neuronal differentiation. We also analyzed the neurofilament NF-160 kDa expression by immunocytochemistry (Figure 2b). After dexamethasone treatment, this neuronal marker could only be detected in FGF1^{WT} PC12 cells. To quantify the neurotrophic activity of both FGF1 forms, the percentage of differentiated clones was determined in a large population of transfected PC12 clones in the presence of dexamethasone (Figure 2c). For each expression vector, four independent transfections were performed and the morphology of at least 100 G418-resistant transfected PC12 clones was analyzed. After 10 days of dexamethasone treatment, up to 40% of the FGF1^{WT} transfected PC12 clones presented a differentiated phenotype. However, only 4–5% of FGF1^{K132E} or Neo-transfected PC12 clones presented a differentiated

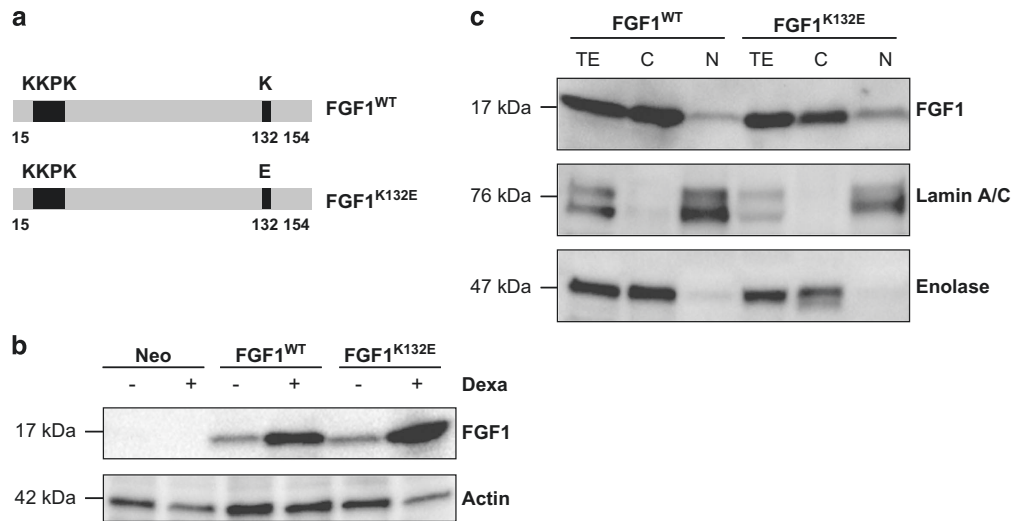


Figure 1 FGF1^{K132E} expression and subcellular localization in PC12 cells. (a) PC12 cells were transfected with pLK-FGF1^{WT} or pLK-FGF1^{K132E} dexamethasone-inducible vectors to overexpress FGF1^{WT} or FGF1^{K132E}, respectively. The pLK-FGF1^{K132E} vector was generated by site-directed mutagenesis using pLK-FGF1^{WT} (aa 15 to 154) as a DNA template. The KKKPK sequence (aa 23 to 27) is the FGF1 nuclear localization sequence. (b) Neo, FGF1^{WT}, FGF1^{K132E} PC12 cell lines were cultured in the absence or presence of 5×10^{-7} M dexamethasone for 48 h. FGF1 expression was analyzed by western blot using the actin level as a control. The presence of dexamethasone increased FGF1 levels in FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cells, no FGF1 was detected in Neo PC12 cells. (c) FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines were treated with dexamethasone for 48 h. Nuclear (N) and cytosolic (C) proteins were analyzed by western blot for FGF1, Enolase (cytosolic marker) and Lamin A/C (nuclear marker). Total protein extracts (TE) were used as controls. FGF1 was detected in all the fractions

phenotype in these conditions. Thus, in contrast to FGF1^{WT}, intracellular FGF1^{K132E} does not induce PC12 cells differentiation.

To determine if the K132E mutation inhibits all aspects of FGF1 neurotrophic activity, cell survival in the absence of serum was examined in transfected PC12 cell lines (Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E}). These cell lines were cultured in serum-free medium containing dexamethasone during 11 days (Figure 2d). Cell survival was quantified after crystal violet nuclei staining. Only FGF1^{WT} protected PC12 cells from serum-depletion-induced apoptosis. Most of FGF1^{K132E} PC12 cells died in the absence of serum, at a similar level to Neo PC12 cells. Thus, the K132E mutation inhibits the neurotrophic activity of intracellular FGF1 in PC12 cells.

The K132E mutation inhibits the FGF1 anti-apoptotic activity during p53-dependent cell death. We have previously shown that intracellular FGF1 protects PC12 cells from p53-dependent apoptosis.¹⁷ In this study, we tested the anti-apoptotic activity of the FGF1^{K132E} mutant in this cell death process. After 2 days of dexamethasone treatment, PC12 cell lines (Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E}) were treated with 50 μ g/ml etoposide to induce p53-dependent apoptosis. Cell survival after 40 h of etoposide treatment was quantified after crystal violet nuclei staining (Figure 3a). The percentages of cell survival for Neo and FGF1^{K132E} PC12 cells were of 31 and 33%, respectively, which is not significantly different. By contrast, FGF1^{WT} PC12 survival appeared to be significantly higher (64%) than FGF1^{K132E} and Neo PC12 cell survival.

We then analyzed different markers of p53-dependent apoptosis by western blot (Figure 3b). We examined the levels of serine 15-phosphorylated p53 (a marker of p53 activation), the levels of p53-upregulated modulator of

apoptosis (PUMA; a pro-apoptotic BH3-only protein encoded by a p53-transcriptional-target gene) and the cleavage of caspase-3 (i.e., the activation of this caspase). After two days of dexamethasone treatment, PC12 cell lines (Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E}) were treated with etoposide during 0, 8 and 16 h. Etoposide addition increased phospho-p53 (P-p53) (Ser15), PUMA and cleaved caspase-3 levels in all the tested cell lines. However, all three protein levels appeared lower in FGF1^{WT} PC12 cells compared with Neo and FGF1^{K132E} PC12 cells. We also analyzed the expression levels of the two other p53 target genes *noxa* and *p21* by RT-PCR (Figure 3c). Etoposide treatment increased *noxa* and *p21* mRNA levels in all the tested cell lines. However, this accumulation was lower in FGF1^{WT} PC12 cells than in native and FGF1^{K132E} PC12 cells for *noxa* mRNA, which codes for a pro-apoptotic BH3-only member of Bcl-2 family. No significant difference was detected for *p21* mRNAs in the different cell lines.

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

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

FGF1 phosphorylation does not modify its subcellular localization in PC12 cells. FGF1 can be phosphorylated on serine 130 by PKC δ in the nucleus.^{15,27} To determine if FGF1

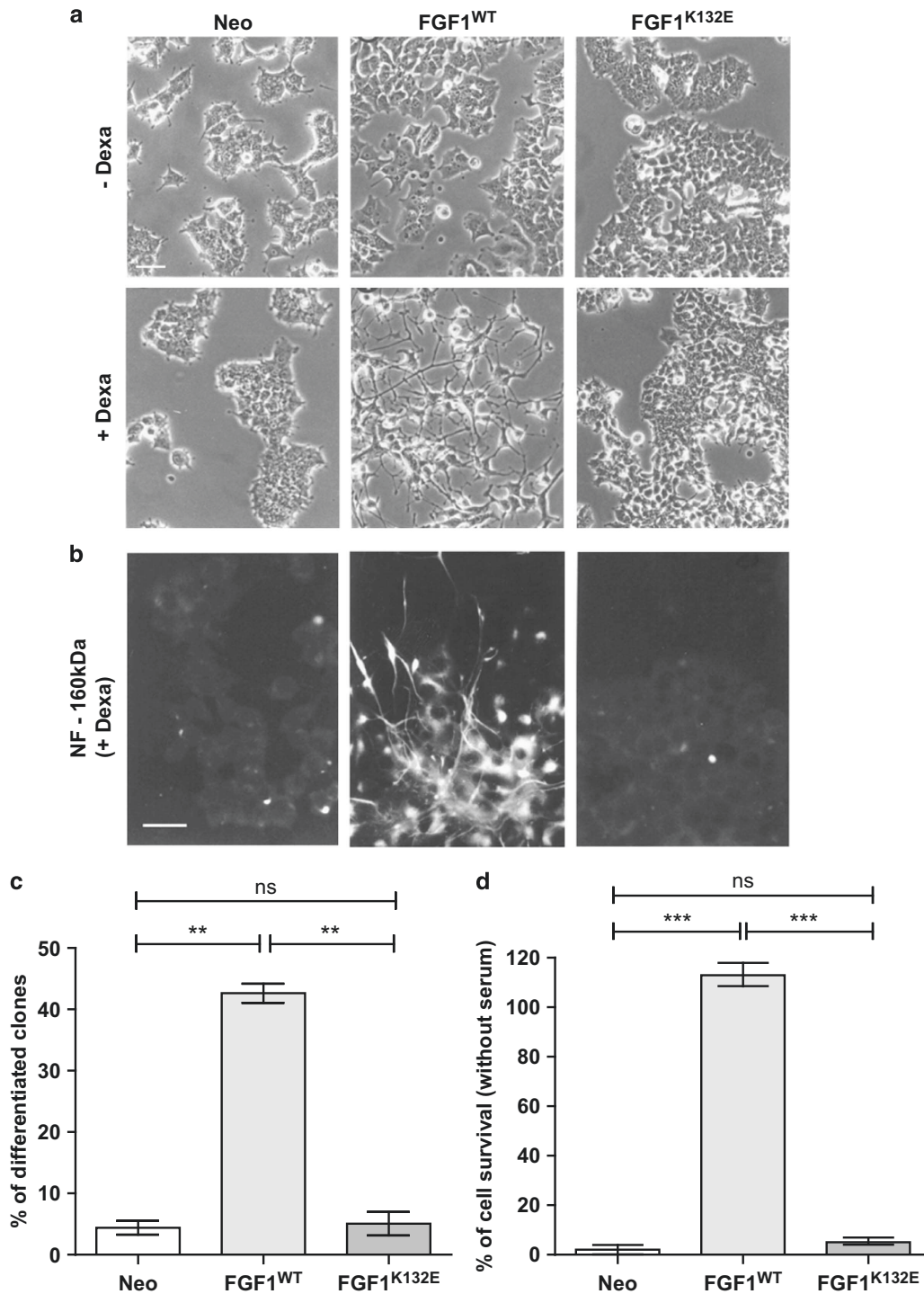


Figure 2 The K132E mutation inhibits FGF1 neurotrophic activity. (a and b) Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines were cultured in the absence or presence of dexamethasone for 7 days. Cell morphology was observed by phase contrast microscopy (a) and Neurofilament NF-160 kDa (a neuronal marker) expression was analyzed by immunocytochemistry (b). Scale bars, 50 μ m (a); 25 μ m (b). (c) PC12 cells transfected by pLK-Neo, pLK-FGF1^{WT} and pLK-FGF1^{K132E} were treated with dexamethasone for 10 days in a selection medium. The clones morphology was examined and the percentage of differentiated clones, which present neuritis longer than cell size, were quantified from four independent experiments (** $P < 0.01$). (d) Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines were cultured in the presence of dexamethasone in serum-free medium for 11 days. Cell survival was analyzed by crystal violet nuclei staining. The graph presents the mean of three independent experiments (** $P < 0.001$). In contrast to FGF1^{K132E}, FGF1^{WT} presented a neurotrophic activity

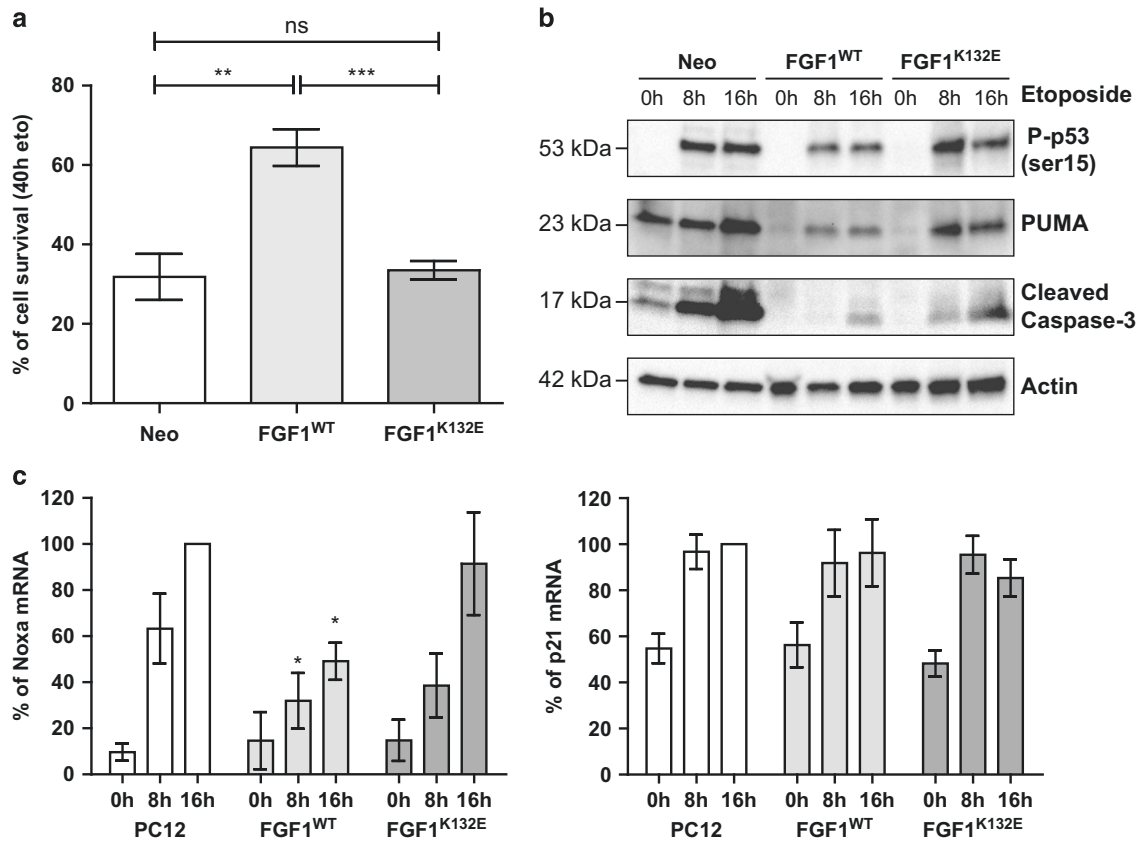


Figure 3 The K132E mutation inhibits FGF1 anti-apoptotic activity. (a) Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines were treated with dexamethasone for 48 h. Then, cell survival after 40 h etoposide treatment was estimated after crystal violet nuclei staining. FGF1^{WT} protected PC12 cells from p53-dependent apoptosis whereas FGF1^{K132E} did not (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns $P > 0.05$, $n = 4$). (b) Neo, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines cultured in the presence of dexamethasone were treated with etoposide for 0, 8 or 16 h. p53 activation (Ser 15 phosphorylation), PUMA expression and caspase-3 cleavage were analyzed by western blot. Actin detection was used as a control. Etoposide induced upregulation of P-p53 (Ser 15), PUMA and cleaved caspase-3 in all cells. However, these levels were lower in FGF1^{WT} PC12 cells compared with FGF1^{K132E} and Neo PC12 cells. (c) Noxa (left panel) and p21 (right panel) mRNA levels were analyzed by RT-PCR in native, FGF1^{WT} and FGF1^{K132E} PC12 cell lines after 0, 8 or 16 h of etoposide treatment in the presence of dexamethasone. The 18 S rRNA levels were used as a control for the quantifications. In contrast to FGF1^{K132E}, FGF1^{WT} decreased p53-dependent up-regulation of *noxa* mRNA levels (* $P < 0.5$, $n = 3$)

phosphorylation is involved in the regulation of FGF1 intracellular activities, PC12 cells were stably transfected with FGF1 phosphorylation mutant (FGF1^{S130A} or FGF1^{S130D}) encoding dexamethasone-inducible expression vectors (Figure 4a). The S130A mutation prevents FGF1 phosphorylation whereas the S130D mutation mimics constitutive phosphorylation.

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

After concentration on heparin sepharose, FGF1 was detected in cell extracts of the different cell lines but not in the conditioned media, thus showing that FGF1 is not secreted

in these cells (Figure 4c). FGF1 subcellular localization was then examined in the different PC12 cell lines to determine if phosphorylation of FGF1 could modify the protein localization. Cytosolic and nuclear proteins extracted from PC12 cell lines (FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D}) cultured in the presence of dexamethasone for 48 h were analyzed by western blot (Figure 4d). Total cell lysates were used as positive controls. Lamin A/C and Enolase detection were used as nuclear and cytosolic purity controls, respectively. FGF1 is detected in both nuclear and cytosolic fractions of all FGF1 expressing cell lines. No significant difference in the levels of nuclear FGF1 was detected between these cell lines (Figure 4e), which suggests that FGF1 phosphorylation does not modify FGF1 nuclear localization in PC12 cells.

Wild-type and phosphorylation mutant forms of FGF1 induce PC12 cell neuronal differentiation. To determine the differentiation activity of FGF1 phosphorylation mutant forms, the percentage of differentiated clones was determined from a large population of transfected PC12 clones, as described above (Figure 5a). After 12 days of

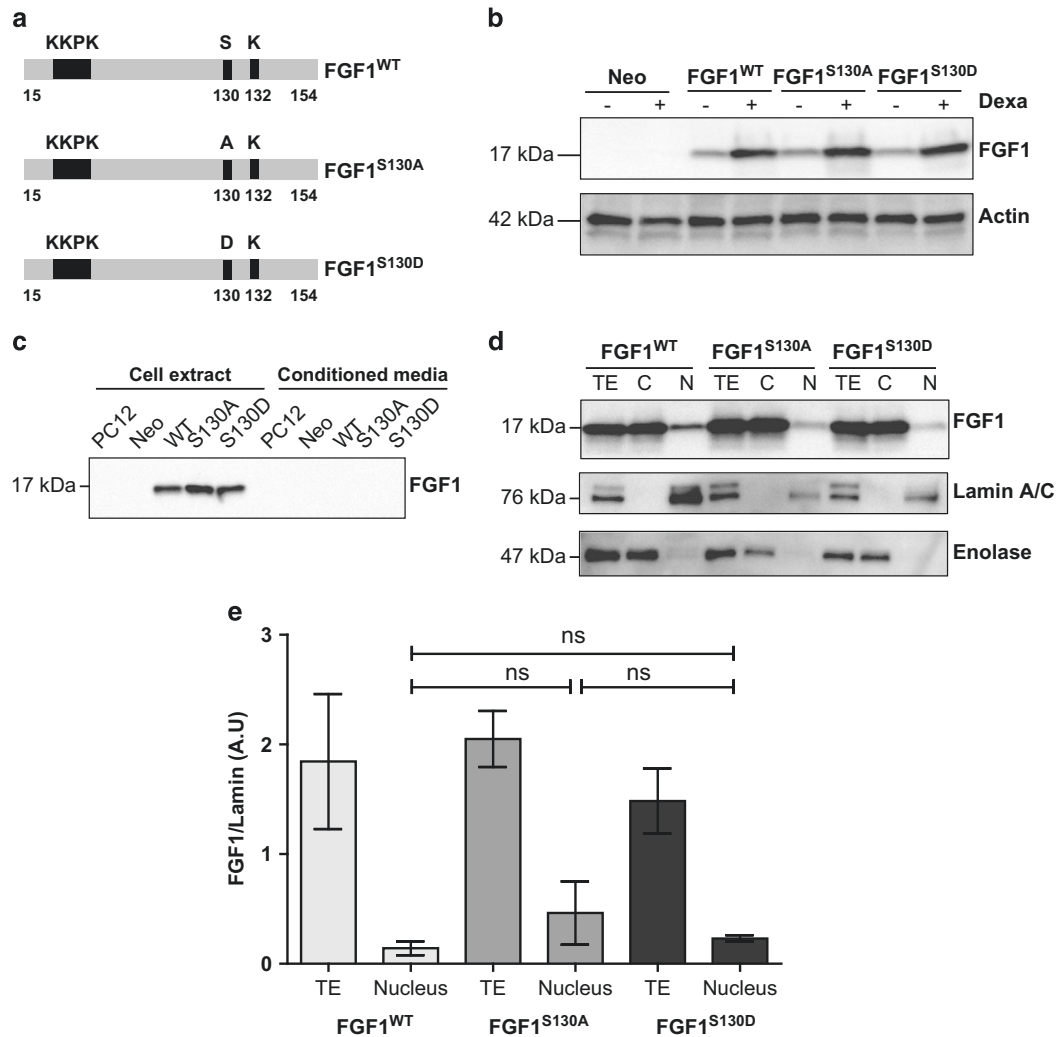


Figure 4 Expression and subcellular localization of wild-type and phosphorylation mutant forms of FGF1. (a) PC12 cells were transfected with the pLK-FGF1^{WT}, pLK-FGF1^{S130A} or pLK-FGF1^{S130D} dexamethasone-inducible vectors to respectively overexpress FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} or FGF1^{S130D}. The pLK-FGF1^{S130A} and pLK-FGF1^{S130D} vectors were generated by site-directed mutagenesis. (b) Neo, FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cell lines were cultured in the absence or presence of 5×10^{-7} M dexamethasone for 48 h. FGF1 expression was analyzed by western blot using actin level as a control. The presence of dexamethasone increased FGF1 levels at comparable levels in the different PC12 cells transfected to express one of the different FGF1 forms. (c) After heparin sepharose concentration, FGF1 levels in cell extracts and conditioned media of native, Neo, FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cells were examined. (d) FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cell lines were treated with dexamethasone for 48 h. Nuclear (N) and cytosolic (C) proteins were analyzed by western blot for FGF1, Enolase (cytosolic marker) and Lamin A/C (nuclear marker). Total protein extracts (TE) were used as controls. FGF1 was detected in all the fractions. (e) Quantification of the levels of FGF1 normalized to Lamin A/C levels in the total lysates and nuclear fractions of three independent experiments

dexamethasone treatment, about 60% of the FGF1^{WT}-, FGF1^{S130A}- and FGF1^{S130D}-transfected PC12 clones presented a differentiated phenotype, suggesting that FGF1 phosphorylation mutants could induce PC12 cell differentiation as well as wild-type FGF1.

To confirm this result, PC12 cell lines expressing FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} or FGF1^{S130D} were cultured in the absence or presence of dexamethasone for 3 days and cell morphology was observed by phase contrast microscopy (Figures 5b and c). In the absence of dexamethasone, FGF1^{WT}-, FGF1^{S130A}- and FGF1^{S130D}-expressing PC12 cell lines presented an undifferentiated phenotype. By contrast, all these cell lines presented long and ramified neuritis after dexamethasone

treatment. Overexpression of FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} or FGF1^{S130D} induced PC12 cell differentiation at a level which was comparable to the differentiation induced by the addition of recombinant FGF1 (rFGF1) in the culture medium. However, the addition of either an inhibitor of FGF receptors (PD173074) or a neutralizing antibody targeting FGF1 (AF232) in the culture medium strongly decreased rFGF1-induced PC12 cell differentiation, but had no effect on FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cell differentiation, confirming an intracellular mode of action of FGF1 and its mutants in our PC12 cell lines (Supplementary Figures 1–4). Altogether, our experiments show that the mutation of serine 130 to an alanine or aspartic acid does not modify the

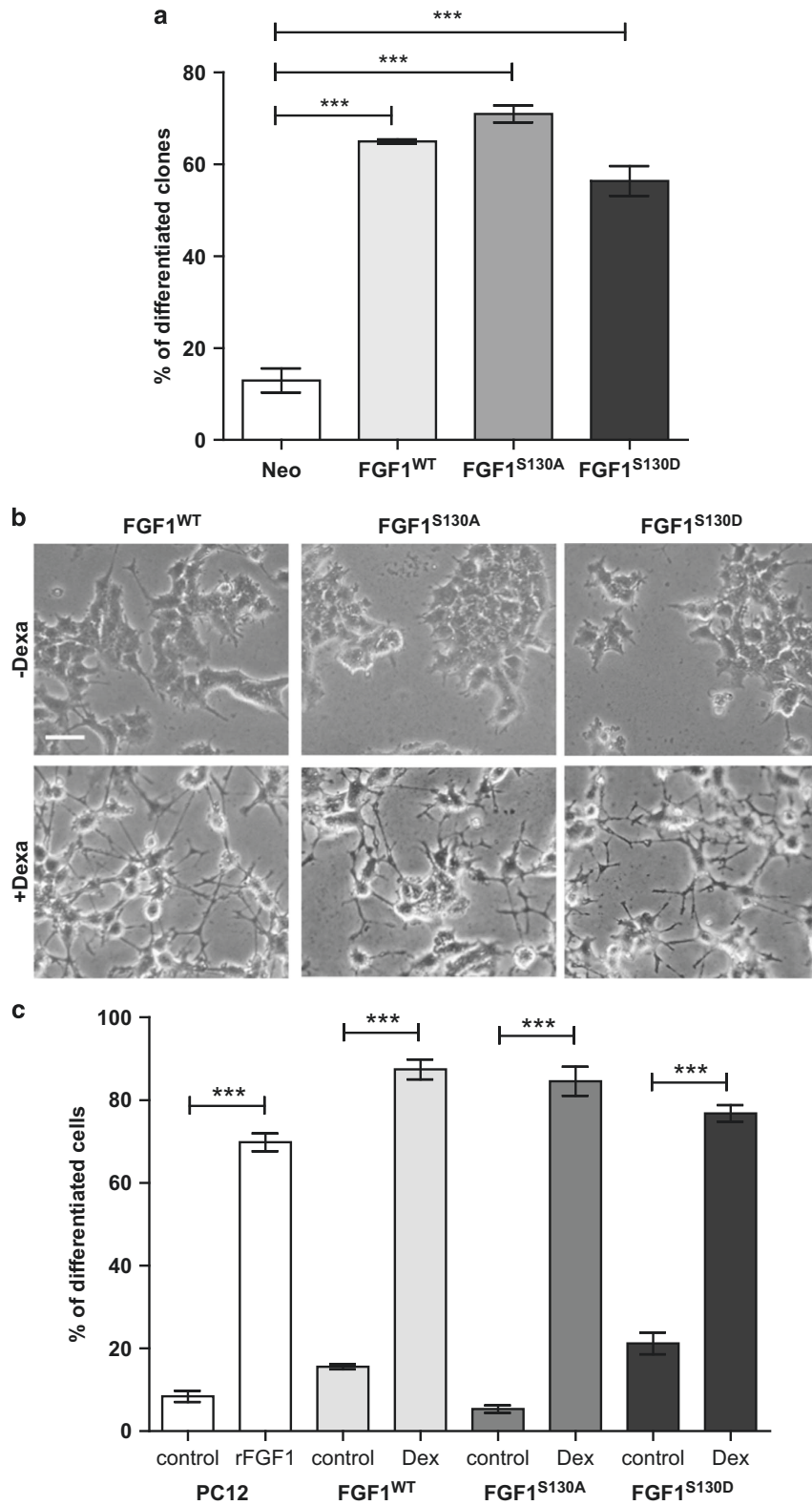


Figure 5 FGF1 phosphorylation does not modify its differentiation activity. (a) PC12 cells transfected with pLK-Neo, pLK-FGF1^{WT}, pLK-FGF1^{S130A} or pLK-FGF1^{S130D} were treated with dexamethasone for 12 days in a selection medium. The morphology of the clones was examined and the percentages of differentiated clones, which present neuritis longer than cell size, were quantified from three independent experiments ($***P < 0.001$). (b) FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cell lines were cultured in the absence or presence of dexamethasone for 3 days and the cell morphology was observed by phase contrast microscopy. Scale bar, 50 μ m. (c) Quantification of differentiation in FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cell lines in the absence or presence of dexamethasone. The differentiation of PC12 cells treated with 100 ng/ml recombinant FGF1 and 10 μ g/ml heparin (noted rFGF1) was evaluated as a control. FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} induced PC12 cell differentiation

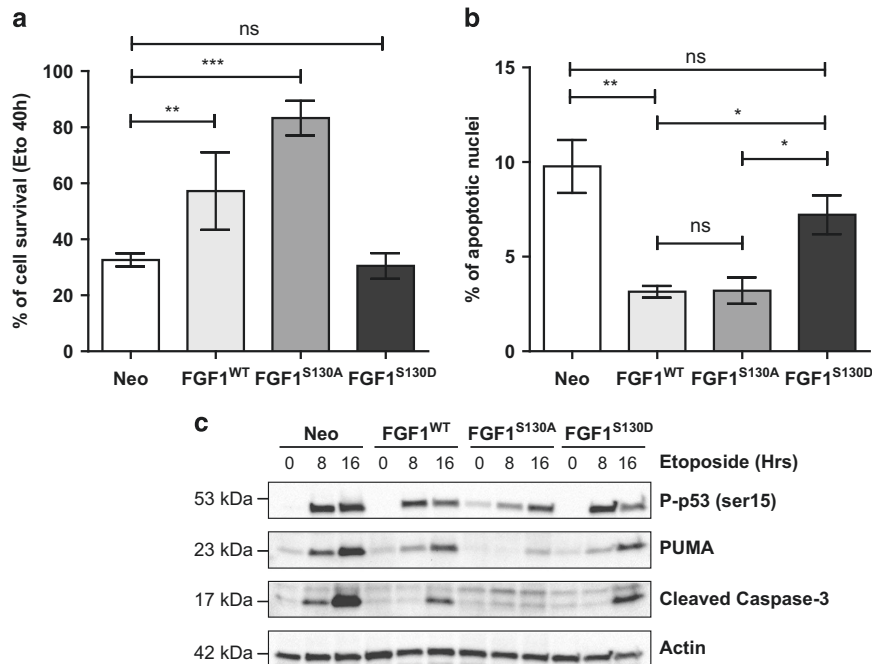


Figure 6 FGF1 phosphorylation inhibits its anti-apoptotic activity. **(a and b)** Neo, FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cell lines were treated with dexamethasone for 48 h. p53-dependent apoptosis was then induced by etoposide treatment during 40 h. **(a)** Cell survival was estimated by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

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

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

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

FGF1^{WT} and FGF1^{S130A} PC12 cell lines. It was significantly reduced in these cells when compared with Neo and FGF1^{S130D} PC12 cells. Altogether, these different experiments show that FGF1^{S130A} protects PC12 cells from etoposide-induced apoptosis, which contrasts from FGF1^{S130D}.

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

Discussion

We have previously shown that FGF1 mediates neurotrophic and anti-apoptotic activities in PC12 cells by an intracrine pathway that requires FGF1 nuclear translocation.^{11,17} In the

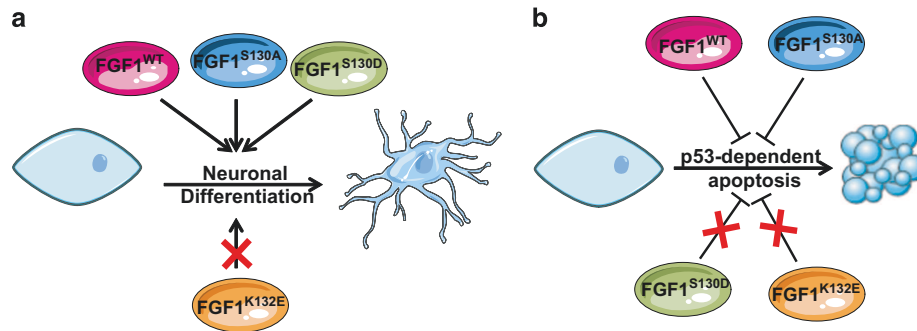


Figure 7 Intracellular activities and subcellular localization of wild-type (FGF1^{WT}) and mutant FGF1 forms (FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A}, FGF1^{S130D}). (a) Intracellular FGF1^{WT} induced PC12 cells neuronal differentiation. Only the K132E mutation inhibited this activity. (b) Intracellular FGF1^{WT}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

present study, we examined the activities of FGF1 mutant forms affected in their C-terminus (FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D}; Figure 7). We showed that all these mutants displayed a nuclear and cytosolic localization but differed in their activities. Indeed, the K132E mutation inhibited FGF1 neurotrophic and anti-apoptotic activities, whereas changing serine 130 into an alanine or aspartic acid did not alter FGF1-induced differentiation. Interestingly, the S130D mutation decreased the inhibitory activity of FGF1 on p53-dependent cell death, whereas the S130A mutation seemed to reinforce this activity. Altogether, our data show that the C-terminal domain of FGF1 is crucial for FGF1 intracellular activities. FGF1 nuclear translocation was not affected, suggesting that the observed effects are not related to differences in nucleocytoplasmic distribution of the mutated forms of FGF1. Furthermore, as FGF1 nuclear translocation is required for its neurotrophic and anti-apoptotic activities,¹⁷ these results imply that nuclear events, which are mitigated by the serine 130 and/or lysine 132 mutations, are required for FGF1 intracellular activities. These nuclear events could be FGF1 post-translational modifications and/or protein-protein interactions with regulators of cell differentiation and survival, such as transcriptional factors.

FGF1 had previously been shown to be post-translationally modified by methylation and phosphorylation. Indeed, FGF1 can be methylated on 3 of its 12 lysine residues.²⁹ *In vitro* reduction of bovine-purified FGF1 methylation reduced both FGF1 affinity for heparin and its mitogenic activity when added to the culture medium of Balb/C 3T3 cells. The lysine 132 that is mutated in our study is one of the lysines that could be methylated (referred as Lysine 118 in Harper and Lobb²⁹). The recombinant FGF1^{K132E} mutant was studied by different laboratories.^{11,25} This mutation was shown to inhibit FGF1 interaction with heparin and both FGF1 mitogenic and neurotrophic activities. However, recombinant FGF1^{K132E} could interact with FGF receptors and activate the mitogen-associated protein kinase pathway, just as recombinant wild-type FGF1.^{11,25} This suggests that the absence of activity of this mutant does not rely on an inhibition of its interaction with heparin. Moreover, recombinant FGF1^{K132E} can be internalized by cells and translocated in the nucleus, like recombinant FGF1^{WT}, but it fails to induce DNA synthesis in various cell types.¹⁵ We show here that intracellular FGF1^{K132E} can

translocate to the nuclear compartment like wild-type FGF1, but fails to induce PC12 cell differentiation and survival after serum depletion or p53-dependent apoptosis. Klingenberg *et al.*¹⁵ proposed that mutation of lysine 132 could interfere with FGF1 phosphorylation. Our study of the phosphorylation mutant forms of FGF1 (FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D}) in PC12 cells, which presented different activities from FGF1^{K132E} does not support this hypothesis. Thus, we favor the hypothesis that this mutation modifies the FGF1 ternary structure or interactions between FGF1 and nuclear proteins required for its activity. These modifications remain to be characterized.

FGF1 was previously shown to be phosphorylated on its serine 130 by PKC δ in the nucleus.^{26,27} The effect of adding recombinant FGF1^{S130A} and FGF1^{S130E} in the culture medium was previously analyzed by Wiedlocha's team.^{27,28} Both recombinant FGF1 mutants were shown to bind FGF receptors, internalize and translocate in the nucleus, as well as to promote DNA synthesis, like recombinant FGF1^{WT}. However, the phosphomimetic FGF1^{S130E} was shown to be exported to the cytosol after nuclear translocation, to be degraded. In contrast, FGF1^{S130A} remains in the nucleus, suggesting that FGF1 phosphorylation is involved in this cytosolic export process.²⁷ We showed that FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} could be translocated in the nucleus of PC12 cells. Quantification of nuclear FGF1 levels in our cell lines did not reveal any significant difference, suggesting that FGF1 phosphorylation did not interfere with FGF1 nuclear localization in PC12 cells. Different hypotheses could explain the discrepancies between both studies. Different cell types and different mutations were used to mimic FGF1 phosphorylation; another possible explanation is that recombinant internalized FGF1 and intracellular FGF1 display different regulations and fates in the cell.

The results reported here strongly suggest that phosphorylation inhibits FGF1 protection against p53-dependent apoptosis. A similar result has also been obtained using the human neuroblastoma SHSY-5Y cell line (data not shown). As FGF1 is a survival factor for a large range of cell types^{11,12,24} and is overexpressed in various tumors,^{19,30–32} it would be interesting to characterize the nuclear events involved in the FGF1 anti-apoptotic activity (i.e., nuclear protein interactions and/or transcriptional regulations) that are affected by FGF1

phosphorylation. Other growth factors (FGF2 and FGF3) and growth factor receptors (FGFR1 and EGFR (epidermal growth factor receptor)) could also mediate their activity by an intracrine/nuclear pathway.^{5,6,33–36} As most of these nuclear growth factors and/or receptors could exert oncogenic activities, the study of these nuclear pathways could be crucial to identify key regulators involved in tumor progression and/or resistance to radio- and/or chemo-therapy.

Materials and Methods

Cell culture and drugs. PC12 cells, a rat pheochromocytoma-derived cell line³⁷ (originally obtained from P. Brachet, Angers), were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 5% horse serum (HS), 100 μ g/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin and 1% Glutamax at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ as previously described.¹⁷ PC12 cells transfected with inducible FGF1 expression vectors (pLK-Neo, pLK-FGF1^{WT}, pLK-FGF1^{K132E}, pLK-FGF1^{S130A} and pLK-FGF1^{S130D}) were maintained in DMEM supplemented with serum depleted in glucocorticoid as previously described.¹⁷ FGF1 expression in transfected cells was induced by 5 \times 10⁻⁷ M dexamethasone (Tebu). Etoposide (50 μ g/ml, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, E1383) was used to induce p53-dependent apoptosis.

PC12 cells transfection. Dexamethasone-inducible mutant FGF1 expression vectors were generated using QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the protocol of the manufacturer. We used the pLK-FGF1^{WT} vector as a DNA template to generate pLK-FGF1^{K132E}, pLK-FGF1^{S130A} and pLK-FGF1^{S130D} with specific primers.

PC12 cells were transfected with 10 μ g of the different vectors and 60 μ l of Lipofectin reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in 100 mm diameter Petri dishes as previously described.¹¹ Two days after transfection, cells were trypsinized and replated in four 100 mm diameter Petri dishes with a selection medium, which contains 0.5 mg/ml G418 (Life Technologies) in a glucocorticoid-depleted culture medium. After 15 days of selection, geneticin resistant colonies appeared whatever the expression vector used. WT and mutant FGF1-transfected PC12 cell lines were isolated and amplified for further analysis.

PC12 cells neuronal differentiation. For each transfection, cells were treated with 5 \times 10⁻⁷ M dexamethasone in a selection medium to induce FGF1 expression. After 10–12 days of treatment, the cell morphology was observed by phase contrast microscopy. The number of non-differentiated clones (composed of cells with no neuritis extension or extensions smaller than the size of the soma) and differentiated clones (composed of cells extending neuritis longer than the size of the cell body) were quantified. For each expression vector, four independent experiments were performed and at least 100 clones were examined by plate.

PC12 cell neuronal differentiation was also examined in stable PC12 cell lines after 3–7 days of 5 \times 10⁻⁷ M dexamethasone treatment by phase-contrast microscopy using a Nikon TMS microscope. Pictures were taken with a Nikon D50 camera and the percentage of differentiated PC12 cells was determined. Differentiation of PC12 cells after addition of 100 ng/ml of recombinant FGF1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and 10 μ g/ml of Heparin in the culture media was performed as a control. In some of the experimental conditions, 10–100 nM of PD173074 (R&D systems) were added to inhibit FGF receptors and test the differentiation of PC12 cells after overexpressing FGF1 or treating with recombinant FGF1. We also tested the effect of an anti-FGF1 antibody (AF232, R&D Systems) added at a concentration of 12.5 and 25 μ g/ml in the culture media to measure its neutralizing potency on the differentiation activity of recombinant FGF1 (25 and 50 ng/ml) or overexpressed FGF1 in PC12 cells. We also examined the expression of the 160 kDa form of Neurofilament (NF-160, N5264, Sigma-Aldrich) by immunocytochemistry as a marker of neuronal differentiation (previously described in Rodriguez-Enfedaque *et al.*¹⁷).

Nucleo-cytoplasmic fractionation. Cell fractionation was performed with NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (Thermo Scientific). About 10⁷ cells were used, according to the protocol of the manufacturer. Fractions were then analyzed by western blot to detect FGF1, Enolase and Lamin A/C in the different fractions.

Cell survival analysis by crystal violet nuclei staining. PC12 cell lines were plated in 12-multiwell plates with 5 \times 10⁻⁷ M dexamethasone. When the cells reached 70% confluence, 50 μ g/ml etoposide was added to the medium to induce p53-dependent apoptosis (as previously described Bouleau *et al.*¹⁶). Cell viability was estimated using the crystal violet method (0.1% crystal violet, 0.1 M citric acid) after 40 h of etoposide treatment.

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

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

Western blot analysis. PC12 cell lines were plated in 60 mm dishes in the absence or presence of 5 \times 10⁻⁷ M dexamethasone. After 48 h of dexamethasone treatment, cells were incubated with 50 μ g/ml etoposide to induce p53-dependent apoptosis. After different etoposide treatment times (0, 4, 8 or 16 h), cells were harvested, lysed and frozen at -20 °C. Proteins (10–20 μ g) were analyzed by western blot (as previously described¹⁷). The primary antibodies used in this study were anti-FGF1 (AB-32-NA, R&D Systems), anti-p53-P (Ser-15) (9284, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti-PUMA α (N-19, Santa Cruz, Dallas, TX, USA), anti-cleaved Caspase-3 (Asp175, Cell Signaling), anti-actin (A2066, Sigma-Aldrich), anti-Lamin A/C (2032, Cell Signaling) and anti-Enolase (C-19, Santa Cruz).

To test the presence of FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} in the conditioned media, FGF1 heparin sepharose concentration was performed. Briefly, 120 μ g of total cell extract proteins or the equivalent fraction of conditioned media (usually about 1 ml) from dexamethasone-treated PC12 cell lines was incubated with 150 μ l of heparin sepharose (CL-6B, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) in PBS containing 0.66 M NaCl and protease inhibitors (dilution 1/100, Roche, Basel, Switzerland). After one night of fixation at 4 °C, the heparin sepharose was washed three times with the binding buffer, and the heparin-binding proteins were then eluted in 60 μ l NuPage LDS sample buffer 2 \times (Life Technologies) containing 100 mM DTT at 96 °C for 10 min.

nox and p21 mRNA analysis by RT-PCR assay. PC12 cell lines were plated in 100-mm dishes in the presence of 5 \times 10⁻⁷ M dexamethasone. After 48 h of dexamethasone treatment, cells were incubated with 50 μ g/ml etoposide to induce p53-dependent apoptosis. After different etoposide treatment times (0, 8 or 16 h), total RNAs were extracted using the guanidium isothiocyanate method. RT-PCR was performed to examine the levels of *nox* and *p21* mRNA as previously described.³⁸ The quantifications of *nox* and *p21* mRNA were normalized with respect to 18S rRNA levels.

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

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

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

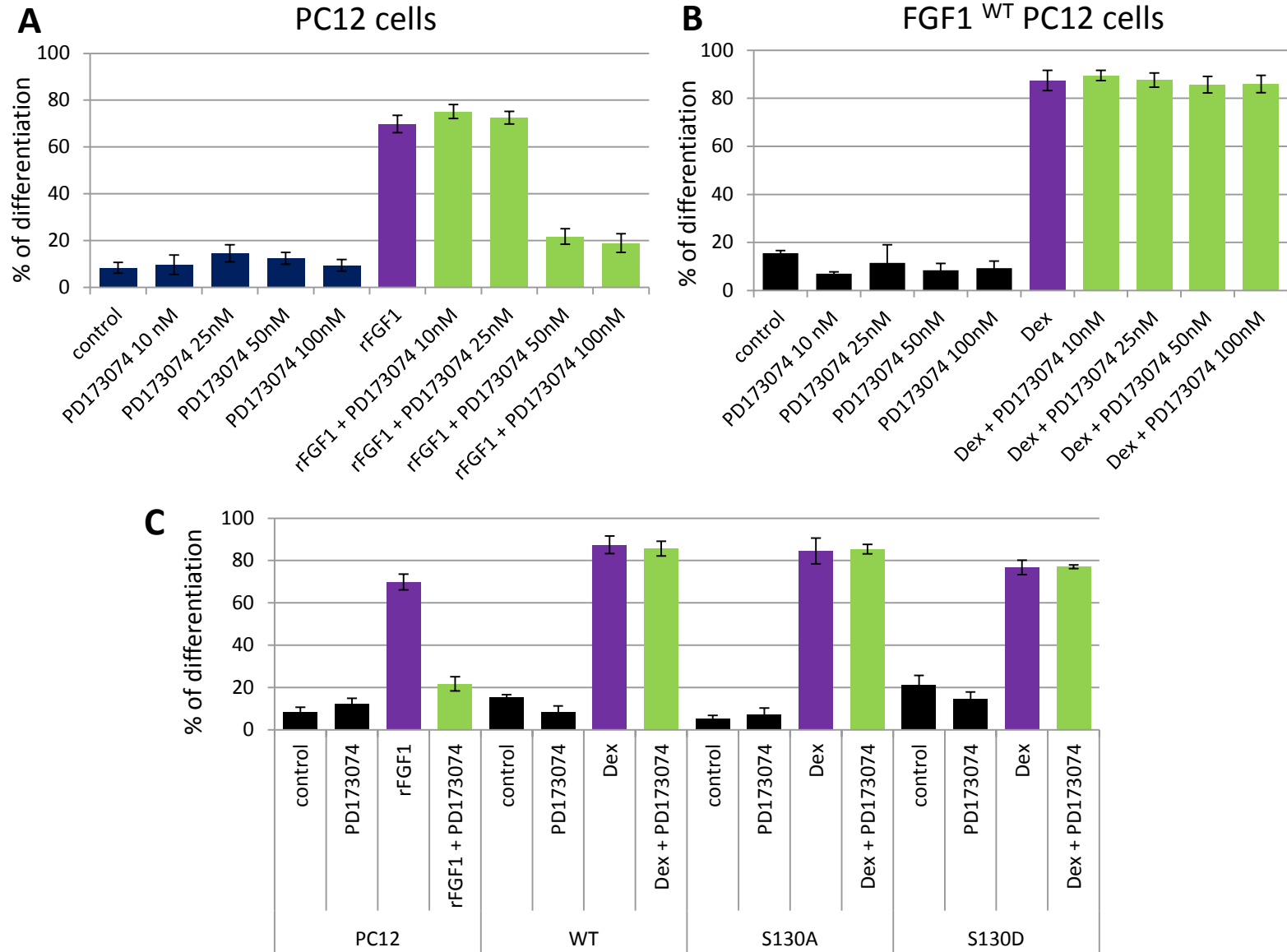
1. Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem* 2011; **149**: 121–130.
2. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 2000; **7**: 165–197.
3. Dorey K, Amaya E. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development* 2010; **137**: 3731–3742.
4. Imamura T, Engleka K, Zhan X, Tokita Y, Forough R, Roeder D *et al*. Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science* 1990; **249**: 1567–1570.
5. Sorensen V, Nilsen T, Wiedlocha A. Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. *Bioessays* 2006; **28**: 504–514.
6. Antoine M, Reimers K, Dickson C, Kiefer P. Fibroblast growth factor 3, a protein with dual subcellular localization, is targeted to the nucleus and nucleolus by the concerted action of two nuclear localization signals and a nucleolar retention signal. *J Biol Chem* 1997; **272**: 29475–29481.
7. Goldfarb M. Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; **16**: 215–220.
8. Jaye M, Howk R, Burgess W, Ricca GA, Chiu IM, Ravera MW *et al*. Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science* 1986; **233**: 541–545.
9. Walicke PA. Basic and acidic fibroblast growth factors have trophic effects on neurons from multiple CNS regions. *J Neurosci* 1988; **8**: 2618–2627.
10. Cuevas P, Carceller F, Gimenez-Gallego G. Acidic fibroblast growth factor prevents post-axotomy neuronal death of the newborn rat facial nerve. *Neurosci Lett* 1995; **197**: 183–186.
11. Renaud F, Desset S, Oliver L, Gimenez-Gallego G, Van Obberghen E, Courtois Y *et al*. The neurotrophic activity of fibroblast growth factor 1 (FGF1) depends on endogenous FGF1 expression and is independent of the mitogen-activated protein kinase cascade pathway. *J Biol Chem* 1996; **271**: 2801–2811.
12. Desire L, Courtois Y, Jeanny JC. Suppression of fibroblast growth factors 1 and 2 by antisense oligonucleotides in embryonic chick retinal cells in vitro inhibits neuronal differentiation and survival. *Exp Cell Res* 1998; **241**: 210–221.
13. Raguenez G, Desire L, Lantrua V, Courtois Y. BCL-2 is upregulated in human SH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated by overexpression of fibroblast growth factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **258**: 745–751.
14. Wiedlocha A, Falnes PO, Madshus IH, Sandvig K, Olsnes S. Dual mode of signal transduction by externally added acidic fibroblast growth factor. *Cell* 1994; **76**: 1039–1051.
15. Klingenberg O, Wiedlocha A, Rapak A, Munoz R, Falnes P, Olsnes S. Inability of the acidic fibroblast growth factor mutant K132E to stimulate DNA synthesis after translocation into cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 11164–11172.
16. Bouleau S, Grimal H, Rincheval V, Godefroy N, Mignotte B, Vayssiere JL *et al*. FGF1 inhibits p53-dependent apoptosis and cell cycle arrest via an intracrine pathway. *Oncogene* 2005; **24**: 7839–7849.
17. Rodriguez-Enfedaque A, Bouleau S, Laurent M, Courtois Y, Mignotte B, Vayssiere JL *et al*. FGF1 nuclear translocation is required for both its neurotrophic activity and its p53-dependent apoptosis protection. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793**: 1719–1727.
18. Dorkin TJ, Robinson MC, Marsh C, Neal DE, Leung HY. aFGF immunoreactivity in prostate cancer and its co-localization with bFGF and FGF8. *J Pathol* 1999; **189**: 564–569.
19. Smith G, Ng MT, Shepherd L, Herrington CS, Gourley C, Ferguson MJ *et al*. Individuality in FGF1 expression significantly influences platinum resistance and progression-free survival in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2012; **107**: 1327–1336.
20. Slattery ML, John EM, Stern MC, Herrick J, Lundgreen A, Giuliano AR *et al*. Associations with growth factor genes (FGF1, FGF2, PDGFB, FGFR2, NRG2, EGF, ERBB2) with breast cancer risk and survival: the Breast Cancer Health Disparities Study. *Breast Cancer Res Treat* 2013; **140**: 587–601.
21. Eckenstein F, Woodward WR, Nishi R. Differential localization and possible functions of aFGF and bFGF in the central and peripheral nervous systems. *Ann N Y Acad Sci* 1991; **638**: 348–360.
22. Stock A, Kuzis K, Woodward WR, Nishi R, Eckenstein FP. Localization of acidic fibroblast growth factor in specific subcortical neuronal populations. *J Neurosci* 1992; **12**: 4688–4700.
23. Bugra K, Oliver L, Jacquemin E, Laurent M, Courtois Y, Hicks D. Acidic fibroblast growth factor is expressed abundantly by photoreceptors within the developing and mature rat retina. *Eur J Neurosci* 1993; **5**: 1586–1595.
24. Renaud F, Oliver L, Desset S, Tassin J, Romquin N, Courtois Y *et al*. Up-regulation of aFGF expression in quiescent cells is related to cell survival. *J Cell Physiol* 1994; **158**: 435–443.
25. Burgess WH, Shaheen AM, Ravera M, Jaye M, Donohue PJ, Winkles JA. Possible dissociation of the heparin-binding and mitogenic activities of heparin-binding (acidic fibroblast) growth factor-1 from its receptor-binding activities by site-directed mutagenesis of a single lysine residue. *J Cell Biol* 1990; **111**: 2129–2138.
26. Mascarelli F, Raulais D, Courtois Y. Fibroblast growth factor phosphorylation and receptors in rod outer segments. *EMBO J* 1989; **8**: 2265–2273.
27. Wiedlocha A, Nilsen T, Wesche J, Sorensen V, Malecki J, Marcinkowska E *et al*. Phosphorylation-regulated nucleocytoplasmic trafficking of internalized fibroblast growth factor-1. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 794–810.
28. Klingenberg O, Wiedlocha A, Olsnes S. Effects of mutations of a phosphorylation site in an exposed loop in acidic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 1999; **274**: 18081–18086.
29. Harper JW, Lobb RR. Reductive methylation of lysine residues in acidic fibroblast growth factor: effect on mitogenic activity and heparin affinity. *Biochemistry* 1988; **27**: 671–678.
30. La Rosa S, Sessa F, Colombo L, Tibiletti MG, Furlan D, Capella C. Expression of acidic fibroblast growth factor (aFGF) and fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) in breast fibroadenomas. *J Clin Pathol* 2001; **54**: 37–41.
31. Takahashi JA, Mori H, Fukumoto M, Igarashi K, Jaye M, Oda Y *et al*. Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5710–5714.
32. Maxwell M, Naber SP, Wolfe HJ, Hedley-Whyte ET, Galanopoulos T, Neville-Golden J *et al*. Expression of angiogenic growth factor genes in primary human astrocytomas may contribute to their growth and progression. *Cancer Res* 1991; **51**: 1345–1351.
33. Lo HW, Hung MC. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer* 2006; **94**: 184–188.
34. Stachowiak MK, Maher PA, Stachowiak EK. Integrative nuclear signaling in cell development—a role for FGF receptor-1. *DNA Cell Biol* 2007; **26**: 811–826.
35. Patry V, Bugler B, Maret A, Potier M, Prats H. Endogenous basic fibroblast growth factor isoforms involved in different intracellular protein complexes. *Biochem J* 1997; **326**: 259–264.
36. Payson RA, Chotani MA, Chiu IM. Regulation of a promoter of the fibroblast growth factor 1 gene in prostate and breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; **66**: 93–103.
37. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; **73**: 2424–2428.
38. Bouleau S, Parvu-Ferecatu I, Rodriguez-Enfedaque A, Rincheval V, Grimal H, Mignotte B *et al*. Fibroblast growth factor 1 inhibits p53-dependent apoptosis in PC12 cells. *Apoptosis* 2007; **12**: 1377–1387.



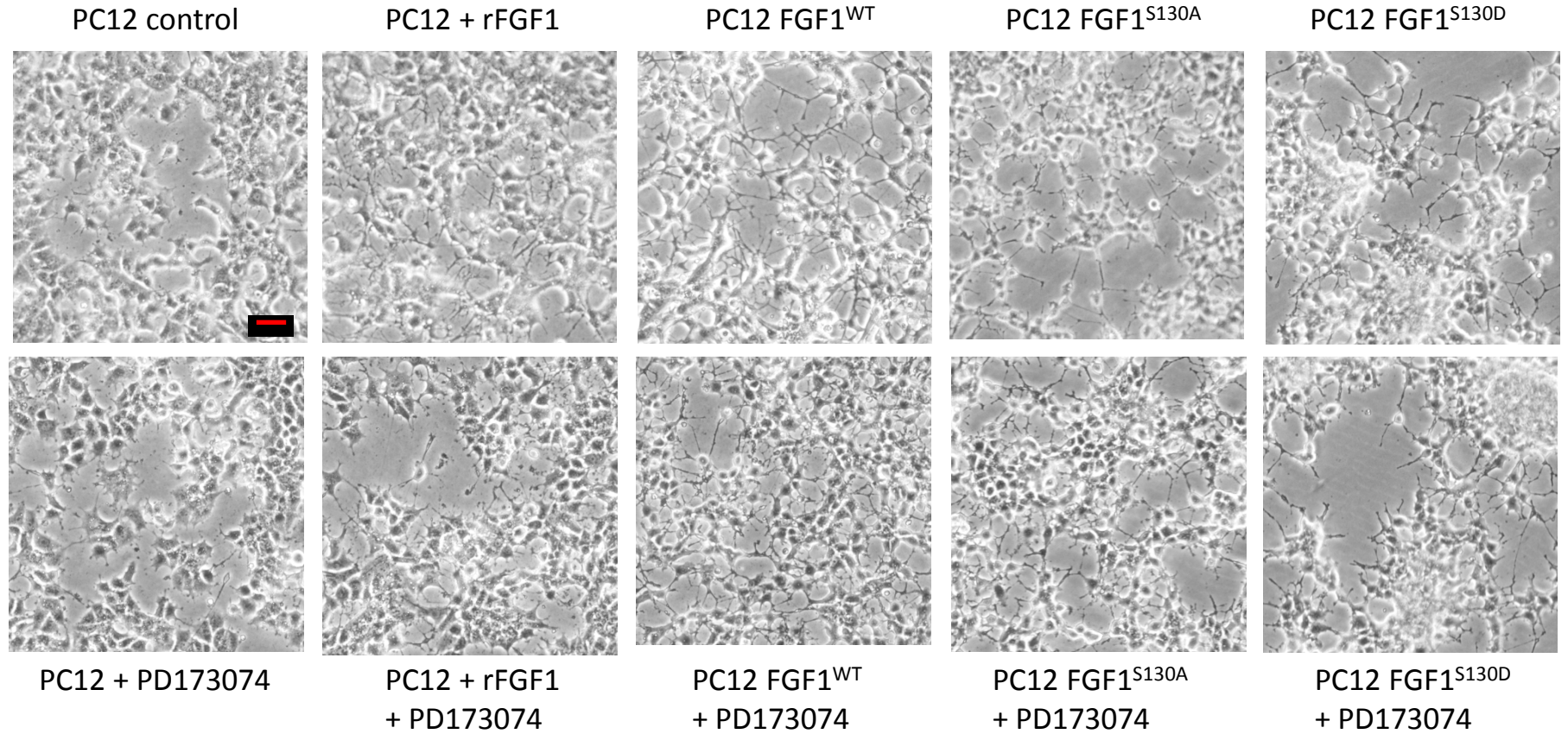
Cell Death and Disease is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)

Supplementary Figure 1

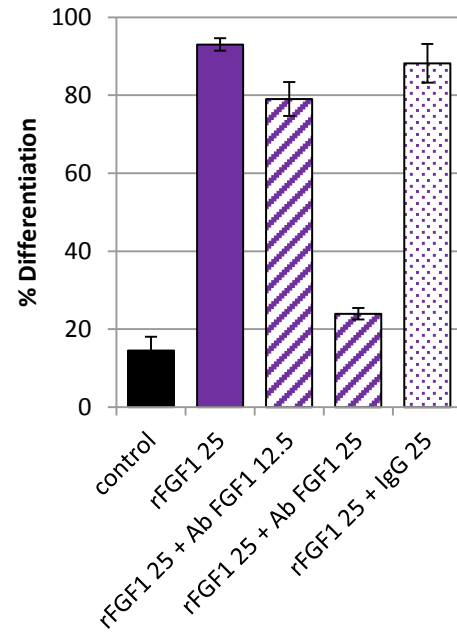


Supplementary Figure 2

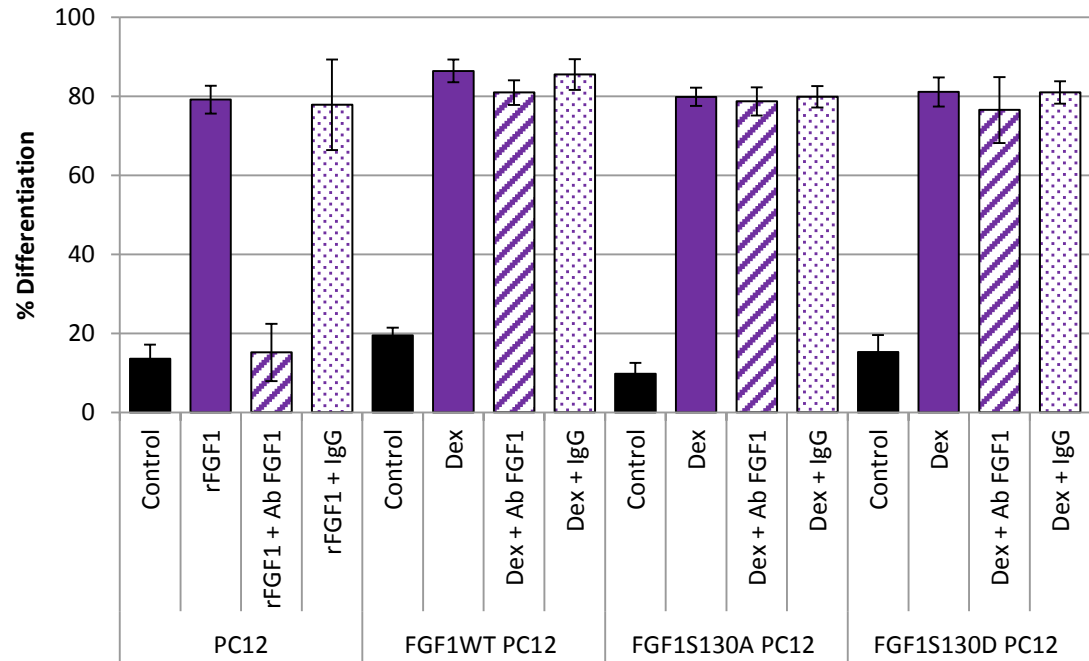


Supplementary Figure 3

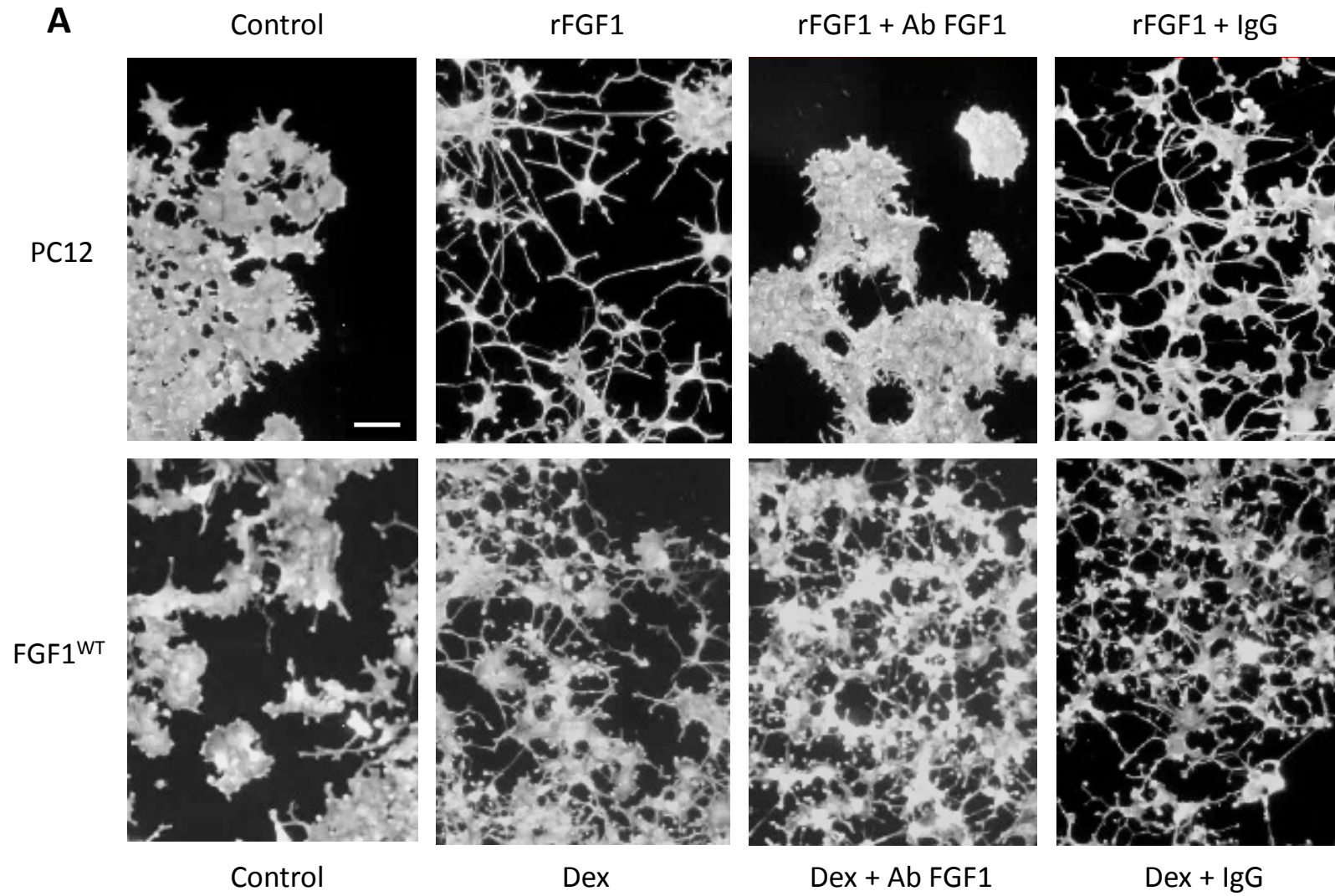
A PC12 cells



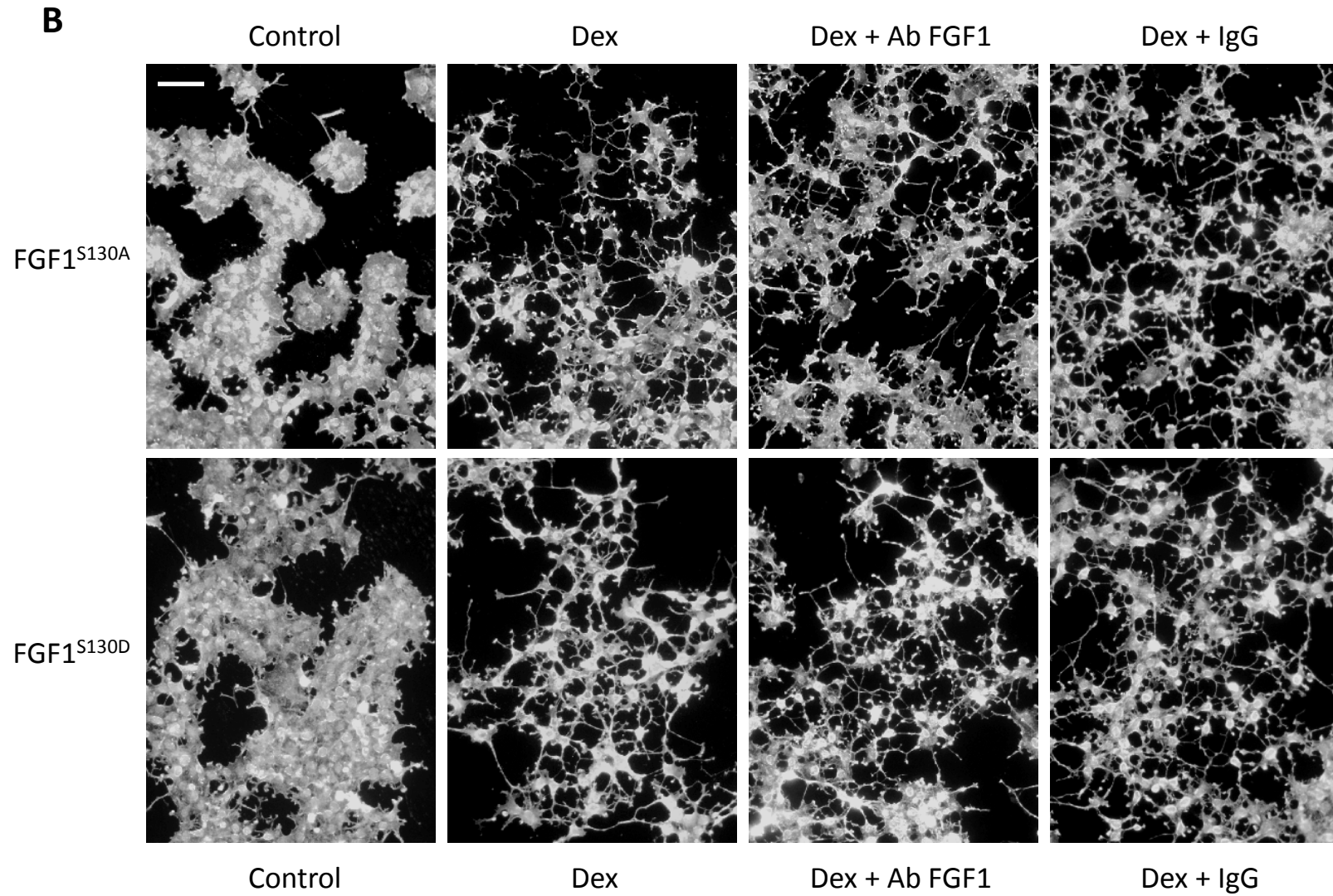
B FGF1^{WT}, FGF1^{S130A}, FGF1^{S130D} PC12 cell lines



Supplementary Figure 4 (A)



Supplementary Figure 4 (B)



Legends

Supplementary figure 1:

A) PC12 cells were treated with 0, 10, 25, 50 or 100 nM of PD173074 (an inhibitor of FGF receptors) in the absence or presence of 100 ng/ml of recombinant FGF1 and 10 µg/ml Heparin (FGF1 + Heparin is noted rFGF1).

B) FGF1^{WT} PC12 cells were treated with 0, 10, 25, 50 or 100 nM of PD173074 in the absence or presence of dexamethasone.

C) Native and FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cells were treated with 50 nM PD173074, in the presence or not of rFGF1 (PC12 cells) or in the presence of 5 10⁻⁷M dexamethasone (FGF1 transfected PC12 cells).

For A-C, cell morphology was observed after 3 days of treatment and the percentage of cells presenting long and ramified neuritis was determined for each condition.

Supplementary figure 2:

Native, FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cells were cultured in the presence or absence of 50 nM PD173074, with or without rFGF1 (PC12 cells) or in the presence of 5.10⁻⁷M dexamethasone (FGF1 transfected PC12 cells). After 3 days of treatment, cell morphology was observed by microscopy. Representative pictures are presented. Scale bar:50 µm.

Supplementary figure 3:

A) PC12 cells were cultured in 1µ-Slide 8 well ibiTreat (Ibidi GmbH) in the absence or presence of 25 ng/ml of recombinant FGF1 and 10 µg/ml Heparin (FGF1 + Heparin is noted rFGF1), 12.5 or 25 µg/ml of human FGF1 antibody (AF232, R&D systems, noted Ab FGF1) or 25 µg/ml of normal goat IgG control (AB-108-C, R&D systems, noted IgG). After three days of treatment, cells were fixed and permeabilized before performing an actin staining (Rhodamine-Phalloidin, Sigma, 1/200) in order to quantify the percentage of differentiation according to morphological criteria, *i.e.* cells presenting long and ramified neuritis.

B) Native and FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} PC12 cells were either cultured in the absence or presence of 25 ng/ml rFGF1 and 10 µg/ml of Heparin for native PC12 cells, or treated with 10⁻⁶M dexamethasone for FGF1 transfected PC12 cells. When mentioned, 25 µg/ml of Ab FGF1 or IgG were added. After two days of treatment and actin staining, cell morphology was observed by microscopy and the percentage of differentiation was determined.

Supplementary figure 4:

Native and FGF1^{WT} (A), FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} (B) PC12 cells were cultured either in the absence or presence of 25 ng/ml rFGF1 and 10 µg/ml of Heparin for native PC12 cells, or in the presence of 10⁻⁶M dexamethasone for FGF1 transfected PC12 cells. Cells were additionally treated or not with 25 µg/ml of Ab FGF1 or IgG. After two days of treatment and actin staining, cell morphology was observed by microscopy. Representative pictures are presented. Scale bar: 50 µm.

II Article 2 : Caractérisation des activités anti-apoptotiques du FGF1 dans des modèles de neuroblastomes humain et murin

1 - Article 2

Des études précédentes de notre laboratoire ont montré le rôle anti-apoptotique du FGF1 recombinant (rFGF1) ajouté au milieu de culture des cellules PC12 (cellules de type neuronal de rat), mais pas dans les cellules REtsAF (fibroblastes de rat) où seul le FGF1 intracellulaire a un rôle protecteur vis-à-vis de l'apoptose dépendante de p53 (Bouleau *et al.*, 2005, 2007). J'ai donc voulu caractériser l'activité anti-apoptotique du rFGF1 dans deux nouvelles lignées de type neuronal : une lignée neuroblastique humaine (cellules SH-SY5Y), et une lignée neuroblastique de souris (cellules N2a). L'induction de l'apoptose dépendante de p53 par dommages à l'ADN *via* un traitement à l'étoposide est inhibée par le rFGF1 dans les cellules humaines SH-SY5Y, mais pas dans les cellules murines N2a, comme le montrent l'analyse de la taille des cellules et de l'intégrité des mitochondries par cytométrie en flux (co-marquage DIOC₆(3) et iodure de propidium). Ces résultats sont confirmés au niveau protéique dans les cellules SH-SY5Y par une diminution de l'activation de p53 (phosphorylation de la Ser15), une diminution de la transactivation de *PUMA*, gène cible de p53, ainsi qu'une diminution de l'activation des caspases-9 et -3 en présence d'étoposide.

Dans les cellules PC12, notre laboratoire a montré par RT-PCR que l'ajout de rFGF1 activait l'expression du FGF1 endogène (Renaud *et al.*, 1996b). L'analyse du niveau de transcrits du FGF1 par RT-PCR dans les cellules SH-SY5Y et N2a après traitement par le rFGF1 ou l'étoposide a montré que ces traitements induisaient tous deux une augmentation de l'expression du FGF1 endogène dans les cellules SH-SY5Y, contrairement aux cellules N2a où l'étoposide induit une légère diminution de l'expression du FGF1 et où l'ajout de rFGF1 est sans effet.

Notre précédente étude, réalisée à partir de cellules de rat PC12, met en évidence le rôle central du domaine C-terminal du FGF1 dans ses activités intracellulaires anti-apoptotique (Delmas *et al.*, 2016). Afin de pouvoir déterminer si ces activités sont retrouvées dans d'autres espèces, j'ai généré des vecteurs d'expression des différentes formes du FGF1 (FGF1^{WT}, FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A}, FGF1^{S130D}) contenant un tag His/V5 à leur extrémité C-terminale, sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Dans un premier temps, le vecteur FGF1^{WT} a été transfecté dans des cellules de neuroblastome humain (SH-SY5Y) et murin (N2a). J'ai analysé l'activité anti-apoptotique du FGF1^{WT} dans les deux lignées neuroblastiques et ai montré un effet protecteur du FGF1 intracellulaire vis-à-vis de l'apoptose dépendante de p53 dans les cellules SH-SY5Y, mais pas dans les cellules N2a. De manière intéressante, la surexpression seule de FGF1^{WT} diminue significativement la proportion de cellules apoptotiques (cellules condensées et ayant perdu leur potentiel mitochondrial) par rapport aux

cellules transfectées par un vecteur vide, et l'induction de l'apoptose dépendante de p53 par ajout d'étoposide n'augmente pas le taux de cellules apoptotiques. À l'inverse, la surexpression de FGF1^{WT} dans les cellules N2a ne les protège pas de l'apoptose induite par p53. L'analyse des milieux conditionnés des cellules SH-SY5Y par western-blot après leur concentration sur billes d'héparine-sépharose ne permet pas de détecter de FGF1 dans le milieu de culture et montre donc que cet effet protecteur repose sur une voie d'action intracrine du FGF1. Ces résultats montrent que de façon comparable au rFGF1, le FGF1 intracellulaire inhibe l'apoptose dépendante de p53 en amont des événements mitochondriaux dans les cellules humaines SH-SY5Y, mais n'a pas d'effet dans les cellules N2a.

Pour caractériser les mécanismes impliqués dans l'effet anti-apoptotique du FGF1 intracellulaire dans les cellules SH-SY5Y, j'ai transfecté les vecteurs d'expression des formes mutantes du FGF1 (FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A}, FGF1^{S130D}) dans ces cellules et isolé des clones possédant des niveaux d'expression comparables. De la même façon que dans les cellules PC12, le FGF1^{S130A} non phosphorylable protège les cellules SH-SY5Y de l'apoptose dépendante de p53, à l'inverse du FGF1^{S130D} mimant constitutivement la phosphorylation ou du FGF1^{K132E} qui ne présente pas d'activité protectrice. Ainsi, ces résultats démontrent l'importance du domaine C-terminal du FGF1 dans la régulation de son activité anti-apoptotique, et la conservation de ce mécanisme dans un nouveau modèle de type neuronal, issu de neuroblastome humain.

L'ensemble de ces résultats a permis la rédaction de l'article présenté ci-après :

« **FGF1 protects neuroblastoma SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis through an intracrine pathway regulated by FGF1 phosphorylation** » [Caroline Pirou](#), Fatemeh Montazer-Torbati, Nadège Jah, Elisabeth Delmas, Christelle Lasbleiz, Bernard Mignotte and Flore Renaud.

FGF1 protects neuroblastoma SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis through an intracrine pathway regulated by FGF1 phosphorylation.

Caroline Pirou, Fatemeh Montazer-Torbati, Nadège Jah, Elisabeth Delmas, Christelle Lasbleiz, Bernard Mignotte and Flore Renaud.

Abbreviated title: FGF1 protects SH-SY5Y neuroblastoma from apoptosis

Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589 UVSQ, EPHE PSL Research University, 2 avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny-Le-Bretonneux, France

Corresponding author: Flore Renaud, Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589 UVSQ, EPHE PSL Research University, 2 avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny-Le-Bretonneux, France; flore.renaud@uvsq.fr

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements: Financial supports were obtained from the University of Versailles Saint-Quentin en Yvelines, the Ecole Pratique des Hautes Etudes and the Ligue Nationale contre le Cancer.

Abstract

Neuroblastoma, a sympathetic nervous system tumor, accounts for 15% of cancer deaths in children. In contrast to most human tumors, p53 is rarely mutated in human primary neuroblastoma, even if the p53-dependent pathway can be activated by chemotherapeutic drugs, suggesting impaired p53 activation in neuroblastoma. Various studies have shown correlations between *fgf1* expression levels and both prognosis severity and tumor chemoresistance. As we previously showed that FGF1 inhibited p53-dependent apoptosis in neuron-like PC12 cells, we initiated the study of FGF1/p53 pathways interaction in neuroblastoma. We focused on the activity of extracellular FGF1 by adding recombinant rFGF1 in media, and on intracellular FGF1 by overexpressing its gene in human SH-SY5Y and murine N2a neuroblastoma cell lines. In both cell lines, etoposide induced a classical mitochondrial p53-dependent apoptosis. FGF1 was able to inhibit p53-dependent apoptosis upstream mitochondrial events in SH-SY5Y cells by extracellular and intracellular pathways. rFGF1 addition and etoposide treatment increased *fgf1* expression in SH-SY5Y cells. On the opposite, rFGF1 or overexpressed FGF1 had no effect in p53-dependent apoptosis and *fgf1* expression in neuroblastoma N2a cells. Using mutant FGF1 (FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S30D}), we further showed that the C-terminal domain and phosphorylation of FGF1 regulate its intracrine anti-apoptotic activity in neuroblastoma SH-SY5Y cells. This is the first study on the activity of an intracrine growth factor on p53-dependent apoptosis in neuroblastoma. This study must be pursued to characterize *fgf1* expression regulations and to progress in the characterization of intracrine and/or nuclear FGF1 pathways in neuroblastoma tumors and cell lines.

Introduction

The Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1) is one of the prototypic members of the fibroblast growth factors (FGFs) family which comprises 22 members in mammals (Powers *et al.*, 2000; Ornitz and Itoh, 2015). FGF1 is an oncogene, which regulates many cellular processes including cell proliferation, differentiation and survival (Renaud *et al.*, 1996b; Chiu *et al.*, 2001; Wiedlocha and Sorensen, 2004). It has been linked to tumor development and metastasis. Indeed, FGF1 is upregulated in various types of cancers, including breast, prostate and ovarian cancers, gliomas and astrocytomas (Takahashi *et al.*, 1990; Maxwell *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 2012; Slattery *et al.*, 2013). Studies have shown correlations between *fgf1* expression levels and both prognosis severity and tumor chemoresistance (Dorkin *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2012; Slattery *et al.*, 2013). FGF1 is also highly expressed in central and peripheral nervous systems and is involved in neural development at embryonic and adult stages (Eckenstein *et al.*, 1991; Bugra *et al.*, 1993; Chiu *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2009). FGF1 neurotrophic and anti-apoptotic activities are well documented *in vitro* and *in vivo* (Cuevas *et al.*, 1995; Renaud *et al.*, 1996b; Desire *et al.*, 1998; Raguenez *et al.*, 1999; Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009; Dorey and Amaya, 2010; Delmas *et al.*, 2016). However, the mechanism of action of FGF1 for its anti-apoptotic activity is far from being fully elucidated and the putative role of FGF1 in the progression and chemoresistance of neuronal tumors remains to be characterized.

In the neuronal-like PC12 cell line that derives from a rat pheochromocytoma, we previously showed that FGF1, which lacks a secretion peptide signal and contains a nuclear localization sequence, acts by an intracrine and nuclear pathway as a neurotrophic factor, inducing neuronal differentiation and survival in the absence of serum (Renaud *et al.*, 1996b; Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009). We also showed that FGF1 protects PC12 cells from p53-dependent cell death induced by a genotoxic stress. For this anti-apoptotic activity, FGF1 also acts by an intracrine and nuclear pathway and its activity could be regulated by phosphorylation (Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009; Delmas *et al.*, 2016).

Neuroblastoma is a tumor of the sympathetic nervous system. It is the most common extracranial solid tumor and accounts for 15% of cancer deaths in children (Cheung and Dyer, 2013). In contrast to most of the human tumors, p53 is rarely mutated in human primary neuroblastoma (Volter *et al.*, 2010), suggesting that p53 oncosuppressive signaling cascade must be bypassed in these tumors, either by blocking the upstream activation of p53 or by inhibiting crucial actors of p53-dependent apoptosis. In some neuroblastoma tumors and/or cell lines, amplification of *MDM2* and hypermethylation of the *p14^{ARF}* promoter were detected, which could inhibit p53 activation; in other neuroblastoma tumors, *N-Myc* amplification, hypermethylation of the *PTEN* promoter, deletion or

hypermethylation of the *caspase-8* promoter, overexpression of survival factors and/or their receptors (*i.e.* BDNF, TrK-B, IGF-1R) were detected, which could regulate the apoptotic process whether p53-dependent or not (Teitz *et al.*, 2001; Fulda, 2009; Carr-Wilkinson *et al.*, 2010). In most neuroblastoma cell lines, the p53-dependent apoptotic process could be induced by genotoxic or oxidative stress (etoposide, doxorubicin, ROS, γ -radiation) and/or by inhibition of survival growth factor pathways (Tweddle *et al.*, 2001; Cui *et al.*, 2002; Yakovlev *et al.*, 2004; Fulda, 2009; Stenger *et al.*, 2011; Sahu *et al.*, 2013). In these cells, the genotoxic stress could induce the classical mitochondrial apoptotic pathway as well as the death-receptor extrinsic apoptotic pathway (Fulda *et al.*, 1998; Cui *et al.*, 2002; Yakovlev *et al.*, 2004). In neuroblastoma cell lines, only few studies examined growth factor anti-apoptotic activities. BDNF protected human neuroblastoma SH-SY5Y from genotoxic stress-induced apoptosis through the TrkB/PI3K/AKT survival pathway (Jaboin *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005). IGF-I protected human neuroblastoma SH-EP1 cells from neurotoxicity induced by MPP+ (1-methyl-4-phenylpyridinium) through the activation of the PI3K/AKT pathway (Wang *et al.*, 2010). For the FGF family, FGF2 and FGF4 impaired oxidant stress induced-apoptosis and FGF1 inhibited serum depletion induced-apoptosis in SHSY5Y cells (Raguenez *et al.*, 1999; Wagle and Singh, 2000). To our knowledge, no study was performed to examine the role of growth factors on p53-dependent apoptosis, which is the major cell death process in neuroblastoma.

In the present study, we examined the activity of FGF1 on the p53-dependent apoptotic pathway in the human SH-SY5Y and the murine N2a neuroblastoma cell lines. In both cell lines, we showed that etoposide induced a classical mitochondrial p53-dependent apoptosis. FGF1 inhibited p53-dependent apoptosis upstream mitochondrial events in SH-SY5Y cells by extracellular and intracellular pathways. On the opposite, it had no effect in N2a cells. Using mutant FGF1 (FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} and FGF1^{130D}), we further showed that FGF1 C-terminal domain and phosphorylation regulate FGF1 intracrine anti-apoptotic activity in neuroblastoma SH-SY5Y cells.

Materials & Methods

Cell culture & drugs

SH-SY5Y cells are a subclone of the human neuroblastoma derived cell line SK-N-SH (Ross *et al.*, 1983), and were a kind gift from Dr Alicia Torriglia. Neuro-2a (N2a) cells, a mouse neuroblastoma derived cell line (Klebe and Ruddle, 1969), were a kind gift from Dr Véronique Dubreuil. Both cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 μ g/mL penicillin-streptomycin and 1% Glutamax at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ (all reagents by Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). At 50% confluence, 100 ng/mL human recombinant FGF1 (rFGF1) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and 10 μ g/mL Heparin (Sigma-

Aldrich, St Louis, MO, USA) were added to media for 48h before further treatment (rFGF1 + heparin noted hereafter rFGF1 to simplify text and figures). When cells reached 70% confluence, 50 µg/mL etoposide (E1383, Sigma-Aldrich) was added to the medium to induce p53-dependent apoptosis.

FGF1 expression vectors

The wild-type human FGF1 coding region was subcloned into a constitutive expression vector (pcDNA3.1/V5-His, Invitrogen, Waltham, MA, USA) allowing the addition of a C-terminal V5-His tag (pcDNA3-FGF1^{WT}). Mutant FGF1 expression vectors were generated using the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. We used the pcDNA3-FGF1^{WT} vector as a DNA template to generate pcDNA3-FGF1^{S130A}, pcDNA3-FGF1^{S130D}, pcDNA3-FGF1^{K132E} with specific primers. These vectors allow the expression of C-terminal V5-His tagged wild-type or mutant FGF1 (aa 15 to 154).

Transfection

SH-SY5Y cells were stably transfected with 10 µg of wild-type or mutant FGF1 expression vectors in the presence of 60 µL of Lipofectin reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA) in 100 mm Petri dishes as previously described (Renaud *et al.*, 1996b). Geneticin-resistant (0.5 mg/mL, G418, Invitrogen, Waltham, MA, USA) cells were selected over 4 weeks. Depending on the experiment, either monoclonal or polyclonal stable transfected cell lines were further analyzed.

N2a cells were transiently transfected in 60 mm Petri dishes with either 1 µg of pcDNA3-FGF1^{WT} or pcDNA3/V5-His (mock vector) in the presence of 9 µL of Lipofectamine reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA) for protein analysis. N2a were co-transfected with pcDNA3-FGF1^{WT} or mock vector and with a GFP expression vector (pEGFP-N2, Clontech, Mountain View, CA, USA) in 12-well plates for cell death analysis (0.2 µg of each vector were transfected in the presence of 2 µL of Lipofectamine reagent per well).

Cell survival analysis by crystal violet nuclei staining assay

SH-SY5Y were plated in 12-well plates and treated with rFGF1 (added in the culture medium) for 48h. Etoposide was then added to induce p53-dependent apoptosis. Cell viability was estimated using the crystal violet method (0.1% crystal violet, 0.1 M citric acid) after 24h of etoposide treatment as previously described (Bouleau *et al.*, 2007).

Apoptosis analysis by flow cytometry assay

After appropriate treatments, adherent and non-adherent cells were harvested and double stained with propidium iodide (PI, 1:100, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and DiOC₆(3) (1:5000, Molecular Probes, Thermofisher Scientific) for SH-SY5Y and N2a cells, or stained with CMX-Ros (1:1000, MitoTracker® Red CMXRos, Life Technologies, Waltham, MA, USA) for transiently transfected N2a cells as previously described (Bouleau *et al.*, 2007). Flow cytometry analysis (PI, DiOC₆(3), CMX-Ros, GFP staining and cell size analysis) were performed with a FACS LSR Fortessa (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) in the CYMAGES facility (UVSQ, Montigny-le-Bretonneux, France). Apoptotic SH-SY5Y or N2a cells correspond to the cells with low PI and low DiOC₆(3) staining and low cell size. Apoptotic transfected N2a cells correspond to the GFP positive cells with low CMX-Ros staining and low cell size.

Western Blot analysis

After appropriate treatments, adherent and non-adherent cells were harvested and 20 µg of proteins were separated in Mini-PROTEAN TGX 4-20% gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and transferred onto PVDF membranes (Millipore, Darmstadt, Germany). As previously described (Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009), blots were incubated in 5% milk-TBST (Tris Buffer Solution, 0.1 % Tween-20, Sigma-Aldrich) with primary antibodies, washed in TBST and then incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson, West Grove, PA, USA). Chemiluminescence was detected with a ChemiDoc XRS+ system, images were acquired and analyzed with proprietary ImageLab software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The primary antibodies used in this study were: anti-FGF1 (AB-32-NA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-His tag (A00186, GenScript, Piscataway, NJ), anti-P-p53 (Ser-15) (9284S, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti-PUMAα (N-19, Santa Cruz, Dallas, TX, USA), anti-Caspase-9 (5B4, Abcam, Cambridge, UK), anti-cleaved Caspase-3 (Asp175, Cell Signaling), anti-PARP (9542S, Cell Signaling) and anti-Actin (A2066, Sigma-Aldrich).

To test the presence of FGF1^{WT}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} in the conditioned media of SH-SY5Y transfected cells, FGF1 heparin-sepharose concentration was performed. Briefly, 120 µg of total cell extract proteins or the equivalent fraction of conditioned media (usually about 1 mL) from transfected SH-SY5Y cell lines were incubated with 150 µL of heparin-sepharose (CL-6B, GE Healthcare) in PBS containing 0.66 M NaCl and protease inhibitors (1:100, Roche, Basel, Switzerland). After one night of fixation at 4°C, the heparin-sepharose was washed thrice with binding buffer, and the heparin-binding proteins were then eluted in 60 µL NuPage LDS sample buffer 2X (Life technologies, Waltham, MA, USA) containing 100 mM DTT at 96°C for 10 min.

FGF1 mRNA analysis by RT-PCR assay

SH-SY5Y and N2a cells were plated in 100 mm Petri dishes and treated with rFGF1 for 72h or with etoposide for 16h. Total RNAs were extracted using the RNA Nucleospin kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol. RT-PCR was performed to examine FGF1 mRNA and 18S rRNA as previously described (Renaud *et al.*, 1996b). Amplified products were separated in 8% acrylamide gels, stained with ethidium bromide, photographed with a GeneStore system (SynGene, Cambridge, UK) and quantified using the ImageQuant software (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). The primers used for PCR amplifications are: a forward FGF1 primer $5' \text{AAGCCCGTCGGTGTCCATGG}^3'$; a reverse FGF1 primer $5' \text{GATGGCACAGTGGATGGGAC}^3'$; a forward 18S primer $5' \text{GTAACCCGTTGAACCCCAT}^3'$; a reverse 18S primer $5' \text{CCATCCAATCGGTAGTAGCG}^3'$.

Statistical analysis

The values presented in the different graphs indicate the mean and standard error of the mean (SEM) for at least three independent experiments. Two-tailed unpaired Student's *t*-tests were performed.

Results

Extracellular FGF1 protects SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis, but does not protect N2a cells.

In an attempt to test the putative protective activity of FGF1 on p53-dependent cell death in neuroblastoma models, we first examined the effect of adding recombinant FGF1 in presence of heparin in the culture medium on human SH-SY5Y and murine N2a neuroblastoma cell lines after etoposide treatment. Etoposide is an inhibitor of topoisomerase II, which induces p53-dependent apoptosis in SH-SY5Y cells (Yakovlev *et al.*, 2004). After 48 hours of pretreatment with 100 ng/mL of recombinant FGF1 and 10 µg/mL of heparin (further noted rFGF1 to simplify text and figures), SH-SY5Y and N2a cells were treated with 50 µg/mL of etoposide with or without rFGF1 for 24h. Cell death/survival of FGF1- and etoposide-treated SH-SY5Y and N2a cells was analyzed by the crystal violet nuclei staining method and flow cytometry after DiOC₆(3) and propidium iodide (PI) staining (Figure 1A, 1B and 2A).

In SH-SY5Y cells, etoposide treatment induces cell death as assessed by the crystal violet nuclei staining method (Figure 1A). The survival rate decreased to 40% after 24h of etoposide treatment. After 48h of rFGF1-pretreatment followed by a 24h etoposide and rFGF1 treatment, SH-SY5Y cell survival increased to 70%. rFGF1 pretreatment and treatment did not modify cell survival in the absence of etoposide. Addition of rFGF1 protected SH-SY5Y from etoposide-induced cell death.

To further characterize the cell death process, SH-SY5Y treated by etoposide in the absence or presence of rFGF1 were analyzed by flow cytometry after DiOC₆(3) and propidium iodide (PI) staining. DiOC₆(3) staining allows to estimate the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). A decrease of $\Delta\Psi_m$ is characteristic of the intrinsic (or mitochondrial) pathway of apoptosis. Apoptosis is also characterized by both cell and nuclear condensation and cell membrane integrity, in contrast to necrosis. PI staining allows to discriminate between necrotic cells (*i.e.* primary and secondary necrosis are associated with plasma membrane permeabilisation and thus PI+) and the viable and apoptotic cells (PI-). Apoptotic cells correspond to the low DiOC₆(3) and low PI staining cells with reduced cell size. After 24h of etoposide treatment, 50% of SH-SY5Y cells were apoptotic (Figure 1B). Addition of rFGF1 reduced the rate of etoposide-induced SH-SY5Y apoptotic cells, 55% of protection was detected. The addition of rFGF1 alone had no effect on cell viability. Etoposide induced the intrinsic apoptotic pathway in SH-SY5Y and rFGF1 protected these cells from this apoptotic process upstream mitochondrial events.

Then, various markers of p53-dependent apoptosis were analyzed by Western-blot in rFGF1- and etoposide-treated SH-SY5Y cells (Figure 1C). The Phospho-p53 (Ser15) form that reveals p53 activation, the pro-apoptotic BH3-only protein p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) encoded by a transcriptional target gene of p53, and the cleavage of both initiator caspase-9 and effector caspase-3 were analyzed. After 6h or 17h of etoposide treatment, SH-SY5Y cells showed a marked increase of P-p53 (Ser15), PUMA and cleaved forms of caspases-9 and-3. These results confirmed that etoposide induces p53-dependent apoptosis in SH-SY5Y cells. Addition of rFGF1 decreases the levels of all these markers, indicating that rFGF1 decreases the etoposide-induced activation of p53, the transactivation of its target PUMA and the activation of both initiator caspase-9 and effector caspase-3.

In N2a cells, we also examined the activity of rFGF1 on the cell death process induced by etoposide by flow cytometry after DiOC₆(3) and propidium iodide (PI) staining (Figure 2A). After 24h of etoposide-treatment, ~45% of apoptotic N2a cells were detected. Etoposide induced the mitochondrial apoptotic pathway in these cells. However, the addition of rFGF1 did not modulate the rate of etoposide-induced apoptotic N2a cells, suggesting that rFGF1 does not protect N2a cells from p53-dependent apoptosis.

Thus, extracellular FGF1 protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis upstream mitochondrial events by decreasing p53 activation, PUMA transactivation and caspase activation. By contrast, extracellular FGF1 does not protect mouse neuroblastoma N2a cells from p53-dependent apoptosis.

Extracellular FGF1 and etoposide increase FGF1 endogenous expression in SH-SY5Y cells, in contrast to N2a cells.

Addition of rFGF1 protected SH-SY5Y cells from p53-induced apoptosis (Figure 1); however, an rFGF1-pretreatment of at least 24h is required to detect this protection (data not shown). In PC12 cells, we have previously shown that extracellular FGF1 induces the expression of endogenous *fgf1* and that intracellular FGF1 protects these cells from p53-dependent apoptosis (Renaud *et al.*, 1996b; Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009). In SH-SY5Y cells, rFGF1 addition was shown to increase *fgf1* expression in the absence of serum, and FGF1 overexpression was shown to protect these cells from serum depletion-induced cell death (Raguenez *et al.*, 1999).

Thus, we examined by RT-PCR the regulation of *fgf1* expression induced by rFGF1- or etoposide-treatment in the presence of serum in SH-SY5Y and N2a cells (Figure 3). After 3 days of rFGF1 treatment, a two-fold increase of *fgf1* mRNA was detected in SH-SY5Y cells, no regulation was detected in N2a cells. Extracellular FGF1 increases *fgf1* endogenous expression in SH-SY5Y cells but not in N2a cells. After 16h of etoposide treatment, a four-fold increase of *fgf1* mRNA was detected in SH-SY5Y cells, while a two-fold decrease of *fgf1* mRNA was detected in N2a cells. Etoposide treatment up-regulates endogenous *fgf1* expression in SH-SY5Y but down-regulates *fgf1* expression in N2a cells. Thus, the regulation of *fgf1* endogenous expression by extracellular FGF1 and etoposide differs in the two neuroblastoma cell lines. This may explain in part the difference of rFGF1 protective activity in both cell lines.

FGF1 overexpression protects SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis, no protection was detected in N2a cells.

The study of rFGF1 activity on both p53-induced cell death and *fgf1* expression in the two neuroblastoma cell lines let us hypothesize that the protective activity of extracellular rFGF1 on p53-dependent apoptosis in SH-SY5Y could be mediated by the endogenous FGF1. To test this hypothesis, we further examined the effects of intracellular FGF1 on p53-dependent apoptosis in both cell lines.

To investigate the role of intracellular FGF1, SH-SY5Y cells were stably transfected with an FGF1^{WT} expression vector to overexpress intracellular FGF1^{WT} or with an empty expression vector (mock) as control. Geneticin-resistant polyclonal transfected SH-SY5Y cells were then treated with etoposide for 16h, and the percentage of apoptotic cells was quantified by flow cytometry after DIOC₆(3) and PI staining (Figure 4A). Interestingly, FGF1^{WT} overexpression in the absence of etoposide decreased significantly the basal level of apoptotic cells compared to mock-transfected cells, less than 5% of cells expressing FGF1^{WT} displayed an apoptotic phenotype. After 16h etoposide treatment, ~ 50% of

mock transfected SH-SY5Y cells displayed an apoptotic phenotype by contrast to the only ~ 5% of FGF1^{WT} transfected SH-SY5Y cells. No significant difference in the levels of apoptotic cells in FGF1^{WT} transfected SH-SY5Y cells was detected after 16h etoposide treatment. We examined by western-blot the level of FGF1 and caspase cleavage in FGF1^{WT} and mock transfected SH-SY5Y cells after 0, 4, 8 or 16h etoposide treatment (Figure 4B). In FGF1^{WT} transfected SH-SY5Y cells, a high level of FGF1 was detected as a result of the transfection. The endogenous FGF1 level could not be detected in mock-transfected cells in these conditions. After etoposide treatment, the levels of cleaved caspase-9 and caspase-3 increased with time in mock-transfected SH-SY5Y cells. By contrast, no modification of cleaved caspase-9 and -3 levels was detected in FGF1^{WT}-transfected SH-SY5Y cells. Thus, FGF1^{WT} overexpression inhibits the etoposide-induced caspases cleavage and apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells.

We also investigated the activity of intracellular FGF1 in p53-dependent apoptosis in N2a cells. For that purpose, cells were transiently co-transfected with GFP and FGF1^{WT} or empty (mock) expression vectors and then treated or not with etoposide for 24h (Figure 2B). Following transfection and treatment, transfected apoptotic N2a cells were characterized by flow cytometry after CMX-Ros staining and GFP analysis. Transfected apoptotic cells correspond to the high GFP (transfected cells, GFP+), low CMX-Ros (low $\Delta\Psi_m$, CMX-) and small-sized (size-) cells. In mock and FGF1^{WT} transfected N2a cells, the percentage of transfected apoptotic cells increased after etoposide treatment at similar levels. FGF1 expression, p53 phosphorylation and caspase-3 cleavage were analyzed by western-blot in mock and FGF1^{WT} transfected N2a cells in the presence or absence of etoposide (Figure 2C). FGF1 overexpression is detected in FGF1^{WT} transfected N2a cells. After etoposide treatment, similar increases of p53 phosphorylation and cleaved caspase-3 were detected in mock- and FGF1^{WT}-transfected N2a cells. Overexpression of FGF1 does not protect N2a cells from p53-dependent apoptosis. Neither extracellular nor intracellular FGF1 displayed an anti-apoptotic activity in murine neuroblastoma N2a cells.

Intracellular FGF1 protects SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis, FGF1 C-terminal domain and phosphorylation regulate its anti-apoptotic activity.

To progress in the characterization of FGF1 anti-apoptotic activity in human neuroblastoma SH-SY5Y, we transfected these cells with different mutated forms of FGF1. We focused on the activity of FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A} and FGF1^{S130D} in SH-SY5Y cells (Figure 5).

The extracellular and intracellular FGF1^{K132E}, initially characterized for its lower affinity to heparin, displays impaired mitogenic activity in murine fibroblasts (Klingenberg *et al.*, 1998) and

impaired neurotrophic and anti-apoptotic activity in PC12 cells (Renaud *et al.*, 1996b; Delmas *et al.*, 2016), while in both models it can translocate to the nucleus. Intracellular FGF1 could be phosphorylated in the nucleus by the Protein Kinase C delta (PKC δ) on its serine 130 (Wiedlocha *et al.*, 2005). The mutation of this serine into an alanine impairs FGF1 phosphorylation (FGF1^{S130A}), while its mutation into an aspartate mimics constitutive FGF1 phosphorylation (FGF1^{S130D}). These FGF1 mutants were previously tested in PC12 cells, both mutants translocate to the nucleus but only FGF1^{S130A} protects PC12 cells from p53-dependent apoptosis (Delmas *et al.*, 2016).

We first examined FGF1 levels and its intracellular *versus* extracellular localization in wild-type and mutant FGF1 transfected SH-SY5Y cells (Figure 5A). After concentration on heparin sepharose and western-blot analysis, FGF1^{WT}, FGF1^{S130} and FGF1^{S130D} were detected at similar levels in transfected cell extracts but were not detected in conditioned media, thus showing that wild-type and mutant FGF1 are not secreted. It can be noticed that transfected FGF1 forms (WT or mutant) are V5/His tagged forms (~20 kDa) and could be discriminated from human endogenous FGF1 (~14-17 kDa). After heparin-sepharose, endogenous FGF1 could be detected only in cell lysates, suggesting that endogenous FGF1 is also non-secreted in neuroblastoma SH-SY5Y cells. Overexpressed FGF1^{K132E} was detected in transfected cell lysates without heparin-sepharose concentration (data not shown) but it was impossible to test its putative secretion in the conditioned medium, because of its very low affinity for heparin-sepharose.

Apoptosis in FGF1^{WT}, FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A}, FGF1^{S130D} or mock stably transfected SH-SY5Y cells after 48h of etoposide treatment was analyzed by flow cytometry after DiOC₆(3) and PI staining (Figure 5B). FGF1^{WT} protected SH-SY5Y cells from etoposide-induced apoptosis, while FGF1^{K132E} did not protect these cells from apoptosis. Quantification of apoptotic cells showed similar rates of apoptosis in mock- and FGF1^{K132E}-transfected cells. Contrasting activities were detected for phosphorylation mutant forms of FGF1. The non-phosphorylatable FGF1^{S130} protected SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis, at a level significantly higher than FGF1^{WT}. By contrast, the phosphomimetic form FGF1^{S130D} sensitized SH-SY5Y cells to p53-dependent apoptosis; the percentage of apoptotic cells was higher in FGF1^{S130D} than in mock transfected cells.

Analysis of apoptotic markers in FGF1^{WT}, FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A}, FGF1^{S130D} or mock stably transfected SH-SY5Y cells after 0, 4, 8 or 16h of etoposide treatment was performed by western-blot analysis (Figure 5C-D). Expression of FGF1^{WT} and non-phosphorylatable FGF1^{S130A} inhibited the p53-induced transactivation of pro-apoptotic PUMA as well as the cleavage of caspase-3 and caspase-3 substrate, *i.e.* PARP. By contrast, expression of either FGF1^{K132E} or phosphomimetic FGF1^{S130D} did not inhibit PUMA transactivation or caspase-3 and PARP cleavages.

These results showed that the non-phosphorylatable FGF1^{S130A} protects SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis, in contrast to FGF1^{K132E} and FGF1^{S13D}, suggesting that FGF1 phosphorylation plays a major role in regulating intracrine FGF1 anti-apoptotic activity in this human neuroblastoma model.

Discussion

In this study, we first showed that FGF1 inhibits p53-dependent apoptosis in a human neuroblastoma cellular model. Indeed, FGF1 inhibited genotoxic stress-induced p53 activation (by stabilization and phosphorylation), trans-activation of the p53 target gene *PUMA* that encodes a BH3-only pro-apoptotic member of Bcl-2 family, mitochondrial membrane potential decrease ($\Delta\Psi_m$), caspases cascade activation (caspase-9 and -3 activation) and later events of apoptosis (nuclear and cellular condensation) in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line either by an extra- or intra-cellular pathway. Thus, FGF1 inhibited p53-dependent cell death upstream mitochondrial events by interfering with the activation of this oncosuppressor in this human neuroblastoma cell line. FGF1 activity appeared to be similar in the human neuroblastoma SH-SY5Y cells, in rat neuron-like PC12 cells and in rat REtsAF fibroblast (Bouleau *et al.*, 2005; Bouleau *et al.*, 2007; Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009; Delmas *et al.*, 2016), suggesting that this effect is conserved in different cell types and mammalian species. However, no activity of either extra- or intra-cellular FGF1 could be detected in the mouse neuroblastoma N2a cell line, suggesting that this neuroblastoma-derived cell line was impaired in the FGF1 anti-apoptotic signaling pathway, either by two independent interferences in extra- and intra-cellular pathways or by interference at a common step between both pathways. It was previously shown that FGF2 (by addition in the culture medium) induced both FGF receptors and MAPK activation in N2a cells (Hwangpo *et al.*, 2012); however, FGF2 potential anti-apoptotic activity in these cells was not described. As FGF1 can bind and activate all FGF receptors, we hypothesized that in our study rFGF1 is able to bind FGFR and activate MAPK in N2a cells and that the interference is either downstream FGFR/MAPK activation or independent from MAPK.

The regulation of *fgf1* expression after rFGF1 or etoposide treatment also differed in the two neuroblastoma cell lines. In SH-SY5Y and PC12 cells, we showed that rFGF1 addition induced an increase of *fgf1* endogenous expression; this regulation was not detected in N2a cells. In SH-SY5Y cells, the addition of rFGF1 in the absence of serum was reported to induced *fgf1* expression (Raguenez *et al.*, 1999). As serum-depletion induced apoptosis in SH-SY5Y cells, this regulation could be the result of rFGF1 treatment and/or cell death induction. In our study, the regulation of *fgf1* mRNA by rFGF1 was detected in the presence of serum in SH-SY5Y cells, eliminating the possibility that this increase in level would only be the result of apoptosis induction. In PC12 cells, the

transactivation of endogenous *fgf1* by exogenous FGF1 is a specific and important step for the neurotrophic activity of exogenous FGF1, in contrast to MAPK activity which could be detected whether the cells differentiated or not (after addition of rFGF1 +/- heparin or rFGF1^{K132E}) (Renaud *et al.*, 1996b). Thus, the regulation of endogenous *fgf1* expression by rFGF1 in SH-SY5Y and PC12 cells, an event that was not detected in N2a cells, but which could be associated with rFGF1 anti-apoptotic potencies in these different cell lines, strongly suggests that endogenous *fgf1* expression regulation is a crucial step for the anti-apoptotic activity of exogenously added FGF1. This result also suggests that N2a cells are impaired in the extracellular FGF1 pathway upstream this step (and probably downstream of FGFR/MAPK activation).

We also examined the regulation of *fgf1* expression in neuroblastoma SH-SY5Y and N2a cells after etoposide treatment. We showed that etoposide treatment up-regulated *fgf1* expression in SH-SY5Y cells, while down-regulating *fgf1* expression in N2a cells; however, etoposide induced similar p53 activation, mitochondrial membrane depolarization, caspase-3 cleavage and cell death in both cell lines. Sahu and colleagues also described a similar p53-dependent apoptotic pathway in both neuroblastoma cell lines after treatment with the anticancer drug MPTQ (8-Methoxypyrimido[4,5-d]thieno[2,3-b]Quinoline-4(3H)-One) (Sahu *et al.*, 2013). Thus, our results favor the hypothesis that the difference in the regulation of *fgf1* expression by etoposide in both cell lines is due to a difference in the regulation mechanisms of *fgf1* expression rather than a difference in the activated p53 pathways. Indeed, *fgf1* expression is mainly regulated at the transcriptional level by complex mechanisms in mammals. Different promoters, alternative splicing and multiple polyadenylation signals generate different *fgf1* transcripts (all coding for a single FGF1 protein). *Fgf1* expression is regulated in a tissue- and/or cell-specific manner, during development and in the adult stage, and also depends on the proliferation and differentiation status (Renaud *et al.*, 1992; Philippe *et al.*, 1996; Renaud *et al.*, 1996a; Madiari *et al.*, 1999; Chiu *et al.*, 2001). In human and mouse, the promoter 1B is the major promoter in brain, gliomas and heart and its activity is strongly linked to neural development and used to isolate neural stem/progenitor cells (Chiu *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2009b; Kao *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015). In neuroblastoma tumors or cell lines, *fgf1* promoters were not examined to our knowledge. Therefore, the study of *fgf1* expression regulation by etoposide and rFGF1 must be pursued to identify the promoter(s) and the mechanisms involved in SH-SY5Y and N2a neuroblastoma cell lines, as well as in pheochromocytoma PC12 cells.

We then investigated FGF1 intracellular activity in neuroblastoma cell lines. We showed that overexpression of wild-type FGF1 protects human SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis; however, no protection was detected in mouse N2a cells. In SH-SY5Y cells, we further showed that overexpressed wild-type and mutant FGF1, which were not secreted in conditioned media, act

(Abraham *et al.*, 1986) mainly by an intracrine pathway in these cells. This is in agreement with the fact that FGF1 lacks a secretion peptide signal and is not secreted in physiological conditions. Both FGF1^{WT} and non-phosphorylatable FGF1^{S130A} protected SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis, in contrast to FGF1^{K132E} and FGF1^{S130}. Indeed, FGF1^{WT} and FGF1^{S130A} decrease genotoxic stress-induced activation of p53 and *PUMA* transactivation, as well as mitochondrial membrane depolarization, caspases activation and cell condensation, which are hallmarks of the mitochondrial pathway of apoptosis. Both K132E and S130D mutations inhibit the FGF1 intracrine anti-apoptotic activity. This suggests that the C-terminal domain is important for FGF1 activity and that FGF1 phosphorylation inhibits its activity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, similarly to what we have previously shown in rat pheochromocytoma PC12 cells (Delmas *et al.*, 2016). In mouse neuroblastoma N2a cells, intracellular and extracellular FGF1 did not present any anti-apoptotic activity, suggesting that anti-apoptotic FGF1 pathways are impaired in these cells, probably due to cell-specific genetic modifications which remain to be identified. This study must be pursued in these different cells lines (SH-SY5Y, N2a and PC12 cells) to characterize the key elements present in SH-SY5Y and PC12 cells, but absent in N2a cells that regulate the FGF1 anti-apoptotic intracrine pathway.

The FGF1 is a particular growth factor which contains a nuclear localization sequence (NLS) mediating its nuclear translocation and it was shown by different laboratories (including ours) that FGF1 nuclearization is required for its mitogenic, neurotrophic and anti-apoptotic activity (Imamura *et al.*, 1990; Wiedlocha and Sorensen, 2004; Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009). In PC12 cells, we have previously shown that deletion of FGF1 NLS impaired FGF1 nuclearization as well as both FGF1 neurotrophic and anti-apoptotic activities. In these cells, we also showed that all the wild-type and mutant FGF1 forms we tested (FGF1^{WT}, FGF1^{S10A}, FGF1^{S130D} and FGF1^{K132E}) could be translocated in the nuclear compartment, while only FGF1^{WT} and FGF1^{S130A} presented an anti-apoptotic activity (Delmas *et al.*, 2016), suggesting that FGF1 nuclear localization is required but not sufficient to mediate FGF1 anti-apoptotic and that nuclear events regulated FGF1 activity. It was shown by Wiedlocha's team that FGF1 is phosphorylated in the nuclear compartment by PKC δ and that FGF1 phosphorylation, which could be regulated by nucleolin, induced FGF1 nuclear export and degradation (Wiedlocha *et al.*, 2005; Sletten *et al.*, 2014). In PC12 cells, we detected no modification of the nuclear localization of the different FGF1 phosphorylation mutants compared to FGF1^{WT}. By contrast, we showed that FGF1 phosphorylation impaired FGF1 anti-apoptotic activity, while it did not influence FGF1 neurotrophic activity. In human neuroblastoma SH-SY5Y cells, we showed that FGF1 phosphorylation also impaired its anti-apoptotic activity, suggesting that this regulation of intracrine FGF1 pathway is conserved in mammals. A preliminary transcriptome analysis by RNA-seq of PC12 cells overexpressing or not FGF1^{WT} shows that the expression of thousands of genes was

significantly regulated (C. Pirou and F. Renaud, personal communication), suggesting that the nuclear FGF1 activity involves transcriptional regulations. To identify the genes that are directly or indirectly regulated by FGF1, and involved in the FGF1 anti-apoptotic activity, a large transcriptome analysis must be performed in PC12 and SH-SY5Y cells overexpressing wild-type and mutant FGF1 with or without genotoxic stress.

In neuroblastoma tumors and cell lines, very few studies previously examined FGF1 activity and expression (Lavenius *et al.*, 1994; Mena *et al.*, 1995; Babajko *et al.*, 1997; Raguenez *et al.*, 1999). In the present study, we showed that FGF1 inhibits p53-dependent apoptosis in human SH-SY5Y cells by extracellular and intracellular pathways. In most of primary human neuroblastomas, the oncosuppressor *p53* is not mutated and p53-dependent apoptosis could be activated by genotoxic stress or a specific activator, suggesting that upstream events impaired p53 activation in these tumors. In various human tumors such as ovarian tumors, astrocytomas and gliomas, *fgf1* overexpression is correlated with tumor progression and resistance to anti-tumor drugs (Takahashi *et al.*, 1990; Maxwell *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 2012; King *et al.*, 2015). Thus, our data suggest that FGF1 may be involved in neuroblastoma tumor progression and chemoresistance. The study of FGF1 expression and activity must be pursued in a large panel of neuroblastoma tumors and/or cell lines. Furthermore, we show for the first time that a growth factor, here FGF1, may act *via* an intracrine pathway to inhibit p53-dependent apoptosis in neuroblastoma. FGF1 is not the only growth factor that may act by an intracrine and nuclear pathway. Numerous growth factors and/or their receptors can nuclearize and act by intracrine and nuclear pathways, not only in the FGF/FGFR family (FGF1-3,11-14/FGFR1) (Wiedlocha and Sorensen, 2004; Stachowiak *et al.*, 2007; Ornitz and Itoh, 2015; Terranova *et al.*, 2015) but also in other growth factors families such as EGF/EGFR (Hsu *et al.*, 2009a; Brand *et al.*, 2011; Liccardi *et al.*, 2011; Wang and Hung, 2012), IGF-I/IGF-IR (Aleksic *et al.*, 2010; Sarfstein *et al.*, 2012; Warsito *et al.*, 2012), VEGF/VEGFR (Lee *et al.*, 2007; Domingues *et al.*, 2011). In most of these studies, nuclearization of growth factors and/or their receptors is associated with increased cell and/or tumor proliferation and cell survival and/or tumor chemoresistance. In human neuroblastoma, the expression of some of these factors and/or receptors was shown to be misregulated; however potential intracrine and nuclear pathways of these factors/receptors were not investigated. The study of these nuclear pathways in neuroblastoma must be performed and would probably allow the identification of new therapeutic targets for these tumors.

References

- Abraham JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman J, Hjerrild KA, Gospodarowicz D, Fiddes JC (1986) Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233:545-548.
- Aleksic T, Chitnis MM, Perestenko OV, Gao S, Thomas PH, Turner GD, Protheroe AS, Howarth M, Macaulay VM (2010) Type 1 insulin-like growth factor receptor translocates to the nucleus of human tumor cells. *Cancer Res* 70:6412-6419.
- Babajko S, Leneuve P, Loret C, Binoux M (1997) IGF-binding protein-6 is involved in growth inhibition in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: its production is both IGF- and cell density-dependent. *J Endocrinol* 152:221-227.
- Bouleau S, Grimal H, Rincheval V, Godefroy N, Mignotte B, Vayssiere JL, Renaud F (2005) FGF1 inhibits p53-dependent apoptosis and cell cycle arrest via an intracrine pathway. *Oncogene* 24:7839-7849.
- Bouleau S, Parvu-Ferecatu I, Rodriguez-Enfedaque A, Rincheval V, Grimal H, Mignotte B, Vayssiere JL, Renaud F (2007) Fibroblast Growth Factor 1 inhibits p53-dependent apoptosis in PC12 cells. *Apoptosis* 12:1377-1387.
- Brand TM, Iida M, Li C, Wheeler DL (2011) The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov Med* 12:419-432.
- Bugra K, Oliver L, Jacquemin E, Laurent M, Courtois Y, Hicks D (1993) Acidic fibroblast growth factor is expressed abundantly by photoreceptors within the developing and mature rat retina. *Eur J Neurosci* 5:1586-1595.
- Carr-Wilkinson J, O'Toole K, Wood KM, Challen CC, Baker AG, Board JR, Evans L, Cole M, Cheung NK, Boos J, Kohler G, Leuschner I, Pearson AD, Lunec J, Tweddle DA (2010) High Frequency of p53/MDM2/p14ARF Pathway Abnormalities in Relapsed Neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 16:1108-1118.
- Chen MS, Lin HK, Chiu H, Lee DC, Chung YF, Chiu IM (2015) Human FGF1 promoter is active in ependymal cells and dopaminergic neurons in the brains of F1B-GFP transgenic mice. *Dev Neurobiol* 75:232-248.
- Cheung NK, Dyer MA (2013) Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 13:397-411.
- Chiu IM, Touhalisky K, Baran C (2001) Multiple controlling mechanisms of FGF1 gene expression through multiple tissue-specific promoters. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 70:155-174.
- Cuevas P, Carceller F, Gimenez-Gallego G (1995) Acidic fibroblast growth factor prevents post-axotomy neuronal death of the newborn rat facial nerve. *Neurosci Lett* 197:183-186.
- Cui H, Schroering A, Ding HF (2002) p53 mediates DNA damaging drug-induced apoptosis through a caspase-9-dependent pathway in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther* 1:679-686.
- Delmas E, Jah N, Pirou C, Bouleau S, Le Floch N, Vayssiere JL, Mignotte B, Renaud F (2016) FGF1 C-terminal domain and phosphorylation regulate intracrine FGF1 signaling for its neurotrophic and anti-apoptotic activities. *Cell Death Dis* 7:e2079.

- Desire L, Courtois Y, Jeanny JC (1998) Suppression of fibroblast growth factors 1 and 2 by antisense oligonucleotides in embryonic chick retinal cells in vitro inhibits neuronal differentiation and survival. *Exp Cell Res* 241:210-221.
- Domingues I, Rino J, Demmers JA, de Lanerolle P, Santos SC (2011) VEGFR2 translocates to the nucleus to regulate its own transcription. *PLoS One* 6:e25668.
- Dorey K, Amaya E (2010) FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development* 137:3731-3742.
- Dorkin TJ, Robinson MC, Marsh C, Neal DE, Leung HY (1999) aFGF immunoreactivity in prostate cancer and its co-localization with bFGF and FGF8. *J Pathol* 189:564-569.
- Eckenstein F, Woodward WR, Nishi R (1991) Differential localization and possible functions of aFGF and bFGF in the central and peripheral nervous systems. *Ann N Y Acad Sci* 638:348-360.
- Fulda S (2009) The PI3K/Akt/mTOR pathway as therapeutic target in neuroblastoma. *Curr Cancer Drug Targets* 9:729-737.
- Fulda S, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM (1998) Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 58:4453-4460.
- Hsu SC, Miller SA, Wang Y, Hung MC (2009a) Nuclear EGFR is required for cisplatin resistance and DNA repair. *Am J Transl Res* 1:249-258.
- Hsu YC, Lee DC, Chen SL, Liao WC, Lin JW, Chiu WT, Chiu IM (2009b) Brain-specific 1B promoter of FGF1 gene facilitates the isolation of neural stem/progenitor cells with self-renewal and multipotent capacities. *Dev Dyn* 238:302-314.
- Hwangpo TA, Jordan JD, Premssirut PK, Jayamaran G, Licht JD, Iyengar R, Neves SR (2012) G Protein-regulated inducer of neurite outgrowth (GRIN) modulates Sprouty protein repression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation by growth factor stimulation. *J Biol Chem* 287:13674-13685.
- Imamura T, Engleka K, Zhan X, Tokita Y, Forough R, Roeder D, Jackson A, Maier JA, Hla T, Maciag T (1990) Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science* 249:1567-1570.
- Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, Thiele CJ (2002) Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res* 62:6756-6763.
- Kao CY, Hsu YC, Liu JW, Lee DC, Chung YF, Chiu IM (2013) The mood stabilizer valproate activates human FGF1 gene promoter through inhibiting HDAC and GSK-3 activities. *J Neurochem* 126:4-18.
- King ML, Lindberg ME, Stodden GR, Okuda H, Ebers SD, Johnson A, Montag A, Lengyel E, MacLean II JA, Hayashi K (2015) WNT7A/beta-catenin signaling induces FGF1 and influences sensitivity to niclosamide in ovarian cancer. *Oncogene* 34:3452-3462.
- Klebe RJ, Ruddle RH (1969) Neuroblastoma: Cell Culture Analysis of a Differentiating Stem Cell System. *J Cell Biol* 43:69A69A.

- Klingenberg O, Widlocha A, Rapak A, Munoz R, Falnes P, Olsnes S (1998) Inability of the acidic fibroblast growth factor mutant K132E to stimulate DNA synthesis after translocation into cells. *J Biol Chem* 273:11164-11172.
- Lavenius E, Parrow V, Nanberg E, Pahlman S (1994) Basic FGF and IGF-I promote differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells in culture. *Growth Factors* 10:29-39.
- Lee DC, Hsu YC, Chung YF, Hsiao CY, Chen SL, Chen MS, Lin HK, Chiu IM (2009) Isolation of neural stem/progenitor cells by using EGF/FGF1 and FGF1B promoter-driven green fluorescence from embryonic and adult mouse brains. *Mol Cell Neurosci* 41:348-363.
- Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK, Avraham S (2007) Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med* 4:e186.
- Li Z, Jaboin J, Dennis PA, Thiele CJ (2005) Genetic and pharmacologic identification of Akt as a mediator of brain-derived neurotrophic factor/TrkB rescue of neuroblastoma cells from chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res* 65:2070-2075.
- Liccardi G, Hartley JA, Hochhauser D (2011) EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res* 71:1103-1114.
- Lin HY, Lee DC, Wang HD, Chi YH, Chiu IM (2015) Activation of FGF1B Promoter and FGF1 Are Involved in Cardiogenesis Through the Signaling of PKC, but Not MAPK. *Stem Cells Dev* 24:2853-2863.
- Madiai F, Hackshaw KV, Chiu IM (1999) Characterization of the entire transcription unit of the mouse fibroblast growth factor 1 (FGF-1) gene. Tissue-specific expression of the FGF-1.A mRNA. *J Biol Chem* 274:11937-11944.
- Maxwell M, Naber SP, Wolfe HJ, Hedley-Whyte ET, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Antoniades HN (1991) Expression of angiogenic growth factor genes in primary human astrocytomas may contribute to their growth and progression. *Cancer Res* 51:1345-1351.
- Mena MA, Casarejos MJ, Gimenez-Gallego G, Garcia de Yébenes J (1995) Fibroblast growth factors: structure-activity on dopamine neurons in vitro. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 9:1-14.
- Ornitz DM, Itoh N (2015) The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4:215-266.
- Philippe JM, Renaud F, Courtois Y, Laurent M (1996) Cloning of multiple chicken FGF1 mRNAs and their differential expression during development of whole embryo and of the lens. *DNA Cell Biol* 15:703-715.
- Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7:165-197.
- Raguenez G, Desire L, Lantrua V, Courtois Y (1999) BCL-2 is upregulated in human SH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated by overexpression of fibroblast growth factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 258:745-751.
- Renaud F, El Yazidi I, Boilly-Marer Y, Courtois Y, Laurent M (1996a) Expression and regulation by serum of multiple FGF1 mRNA in normal transformed, and malignant human mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 219:679-685.

- Renaud F, Desset S, Bugra K, Halley C, Philippe JM, Courtois Y, Laurent M (1992) Heterogeneity of 3'untranslated region of bovine acidic FGF transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* 184:945-952.
- Renaud F, Desset S, Oliver L, Gimenez-Gallego G, Van Obberghen E, Courtois Y, Laurent M (1996b) The neurotrophic activity of fibroblast growth factor 1 (FGF1) depends on endogenous FGF1 expression and is independent of the mitogen-activated protein kinase cascade pathway. *J Biol Chem* 271:2801-2811.
- Rodriguez-Enfedaque A, Bouleau S, Laurent M, Courtois Y, Mignotte B, Vayssiere JL, Renaud F (2009) FGF1 nuclear translocation is required for both its neurotrophic activity and its p53-dependent apoptosis protection. *Biochim Biophys Acta* 1793:1719-1727.
- Ross RA, Spengler BA, Biedler JL (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 71:741-747.
- Sahu U, Sidhar H, Ghate PS, Advirao GM, Raghavan SC, Giri RK (2013) A Novel Anticancer Agent, 8-Methoxypyrimido[4',5':4,5]thieno(2,3-b) Quinoline-4(3H)-One Induces Neuro 2a Neuroblastoma Cell Death through p53-Dependent, Caspase-Dependent and -Independent Apoptotic Pathways. *PLoS One* 8:e66430.
- Sarfstein R, Pasmanik-Chor M, Yeheskel A, Edry L, Shomron N, Warman N, Wertheimer E, Maor S, Shochat L, Werner H (2012) Insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) translocates to nucleus and autoregulates IGF-IR gene expression in breast cancer cells. *J Biol Chem* 287:2766-2776.
- Slattery ML, John EM, Stern MC, Herrick J, Lundgreen A, Giuliano AR, Hines L, Baumgartner KB, Torres-Mejia G, Wolff RK (2013) Associations with growth factor genes (FGF1, FGF2, PDGFB, FGFR2, NRG2, EGF, ERBB2) with breast cancer risk and survival: the Breast Cancer Health Disparities Study. *Breast Cancer Res Treat* 140:587-601.
- Sletten T, Kostas M, Bober J, Sorensen V, Yadollahi M, Olsnes S, Tomala J, Otlewski J, Zakrzewska M, Wiedlocha A (2014) Nucleolin regulates phosphorylation and nuclear export of fibroblast growth factor 1 (FGF1). *PLoS One* 9:e90687.
- Smith G, Ng MT, Shepherd L, Herrington CS, Gourley C, Ferguson MJ, Wolf CR (2012) Individuality in FGF1 expression significantly influences platinum resistance and progression-free survival in ovarian cancer. *Br J Cancer* 107:1327-1336.
- Stachowiak MK, Maher PA, Stachowiak EK (2007) Integrative nuclear signaling in cell development--a role for FGF receptor-1. *DNA Cell Biol* 26:811-826.
- Stenger C, Naves T, Verdier M, Ratinaud MH (2011) The cell death response to the ROS inducer, cobalt chloride, in neuroblastoma cell lines according to p53 status. *Int J Oncol* 39:601-609.
- Takahashi JA, Mori H, Fukumoto M, Igarashi K, Jaye M, Oda Y, Kikuchi H, Hatanaka M (1990) Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5710-5714.
- Teitz T, Lahti JM, Kidd VJ (2001) Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *J Mol Med (Berl)* 79:428-436.

- Terranova C, Narla ST, Lee YW, Bard J, Parikh A, Stachowiak EK, Tzanakakis ES, Buck MJ, Birkaya B, Stachowiak MK (2015) Global Developmental Gene Programming Involves a Nuclear Form of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR1). *PLoS One* 10:e0123380.
- Tweddle DA, Malcolm AJ, Cole M, Pearson AD, Lunec J (2001) p53 cellular localization and function in neuroblastoma: evidence for defective G(1) arrest despite WAF1 induction in MYCN-amplified cells. *Am J Pathol* 158:2067-2077.
- Wagle A, Singh JP (2000) Fibroblast growth factor protects nitric oxide-induced apoptosis in neuronal SHSY-5Y cells. *J Pharmacol Exp Ther* 295:889-895.
- Wang L, Yang HJ, Xia YY, Feng ZW (2010) Insulin-like growth factor 1 protects human neuroblastoma cells SH-EP1 against MPP+-induced apoptosis by AKT/GSK-3beta/JNK signaling. *Apoptosis* 15:1470-1479.
- Wang YN, Hung MC (2012) Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci* 2:13.
- Warsito D, Sjostrom S, Andersson S, Larsson O, Sehat B (2012) Nuclear IGF1R is a transcriptional co-activator of LEF1/TCF. *EMBO Rep* 13:244-250.
- Wiedlocha A, Sorensen V (2004) Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol* 286:45-79.
- Wiedlocha A, Nilsen T, Wesche J, Sorensen V, Malecki J, Marcinkowska E, Olsnes S (2005) Phosphorylation-regulated nucleocytoplasmic trafficking of internalized fibroblast growth factor-1. *Mol Biol Cell* 16:794-810.
- Wolter J, Angelini P, Irwin M (2010) p53 family: Therapeutic targets in neuroblastoma. *Future Oncol* 6:429-444.
- Yakovlev AG, Di Giovanni S, Wang G, Liu W, Stoica B, Faden AI (2004) BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 279:28367-28374.

Legends

Figure 1: Extracellular FGF1 protects SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis.

A) SH-SY5Y cells were pretreated or not by adding recombinant FGF1 and heparin for 48h (rFGF1) in the culture medium, then cells were treated or not with etoposide for 24h (Eto). Cell survival was analyzed by crystal violet nuclei staining. **B)** Following the same treatments, SH-SY5Y apoptotic cells were characterized by flow cytometry after DiOC₆(3) and PI staining. Apoptotic cells correspond to the low DiOC₆(3)- (low $\Delta\Psi_m$, noted DIOC-) and low PI (to exclude necrotic cells, noted PI-) staining and small-sized cells (a hallmark of apoptotic cell condensation, noted size-). For A-B, the graphs represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Student's *t*-tests were performed relative to the control cells, except where indicated (n=3; ns: $p>0.05$; **: $p\leq 0.01$; ***: $p\leq 0.001$). **C)** SH-SY5Y cells were pretreated or not with recombinant FGF1 (rFGF1) for 48h, and then treated or not with etoposide (Eto) for 6h or 17h. 20 μ g of the corresponding cell lysates were used to analyze by Western-blot the levels of P-p53 (Ser15) that reveals p53 activation, of the p53 proapoptotic target PUMA, of pro- and cleaved caspase-9 forms and cleaved caspase-3. Actin detection was used as a control.

Figure 2: Extracellular and intracellular FGF1 do not protect N2a cells from p53-dependent apoptosis.

A) N2a cells were pretreated or not by adding recombinant FGF1 and heparin in the culture medium (rFGF1) for 48h, then treated or not with etoposide (Eto) for 24h. N2a apoptotic cells were characterized by flow cytometry after DiOC₆(3) and PI staining (apoptotic cells are the DIOC-, PI- and size- cells). The graph represents the mean \pm SEM of three independent experiments. Student's *t*-tests were performed relative to the control cells, except where indicated (n=3; ns: $p>0.05$; ***: $p\leq 0.001$). **B)** N2a cells were transiently co-transfected with GFP and FGF1^{WT} or empty (mock) expression vectors and then treated or not with etoposide for 24h. Following transfection and treatment, N2a transfected apoptotic cells were quantified by flow cytometry after CMX-Ros staining. Transfected apoptotic cells correspond to the high GFP (transfected cells, GFP+), low CMX-Ros (low $\Delta\Psi_m$, CMX-) and small-sized (size-) cells. The graph represents the mean \pm SEM of three independent experiments. Student's *t*-tests were performed relative to the control Mock cells, except where indicated (n=3; ns: $p>0.05$; **: $p\leq 0.01$). **C)** N2a cells were transiently transfected with FGF1^{WT} or empty (mock) expression vectors and then treated or not with etoposide for 24h. FGF1 expression, p53 activation (Ser15 phosphorylation) and caspase-3 cleavage were analyzed by Western-blot. Actin detection was used as control.

Figure 3: Extracellular FGF1 and etoposide increase endogenous FGF1 expression in SH-SY5Y cells, in contrast to N2a cells.

SH-SY5Y and N2a cells were treated or not with rFGF1 for 72h **(A)** or etoposide for 16h **(B)**. FGF1 mRNA levels were analyzed by RT-PCR as described in materials and methods. The 18S rRNA levels were used as a control for quantifications. The mRNA FGF1/ rRNA 18S rates were normalized to the levels at the beginning of the treatment for each cell line (t=0h, mRNA FGF1/ rRNA 18S =1, not shown). The graph represents the mean +/- SEM of three independent experiments. Student's *t*-tests were performed (n=3; ns: p>0.05; *: p≤0.05; **: p≤ 0.01).

Figure 4: Intracellular FGF1^{WT} protects SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis.

Polyclonal populations of stably transfected SH-SY5Y cells with either FGF1^{WT} or empty (mock) expression vectors were treated or not with etoposide for 16h. **A)** Transfected SH-SY5Y apoptotic cells were characterized by flow cytometry after DiOC₆(3) and PI staining (apoptotic cells are the DiOC-, PI- and size- cells). The graph represents the mean +/- SEM of three independent experiments. Student's *t*-tests were performed relative to the control mock, except where indicated (n=3; ns: p > 0.05; ***: p≤ 0.001). **B)** FGF1 expression, caspases 9 and 3 cleavages was assessed by Western-blot. Actin detection was used as control.

Figure 5: FGF1 phosphorylation inhibits its anti-apoptotic activity in SH-SY5Y.

SH-SY5Y cells were stably transfected with FGF1^{WT}, FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A}, FGF^{130D} or empty (mock) expression vectors. **A)** FGF1 levels were examined by Western-blot after heparin-sepharose concentration in cell lysates and conditioned media from SH-SY5Y cells expressing FGF1^{WT}, FGF1^{S130A}, FGF1^{S130D} or transfected with an empty vector (mock). **B)** Apoptosis in FGF1^{WT}, FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A}, FGF^{130D} or mock stably transfected SH-SY5Y cells after 48h of etoposide treatment was analyzed by flow cytometry after DiOC₆(3) and PI staining. Apoptotic cells are the DiOC-, PI- and size- cells. The graph represents the mean +/- SEM of three independent experiments. Student's *t*-tests were performed relative to the control mock, except where indicated (n=3; ns: p > 0.05; *: p≤ 0.05; ***: p≤ 0.001). **C-D)** PUMA, cleaved caspase-3 and PARP (full-length and cleaved forms) levels were analyzed by Western-blot in FGF1^{WT}, FGF1^{K132E}, FGF1^{S130A}, FGF^{130D} or mock stably transfected SH-SY5Y cells after 0, 4, 8 or 16h of etoposide treatment. Actin detection was used as control.

Figure 1

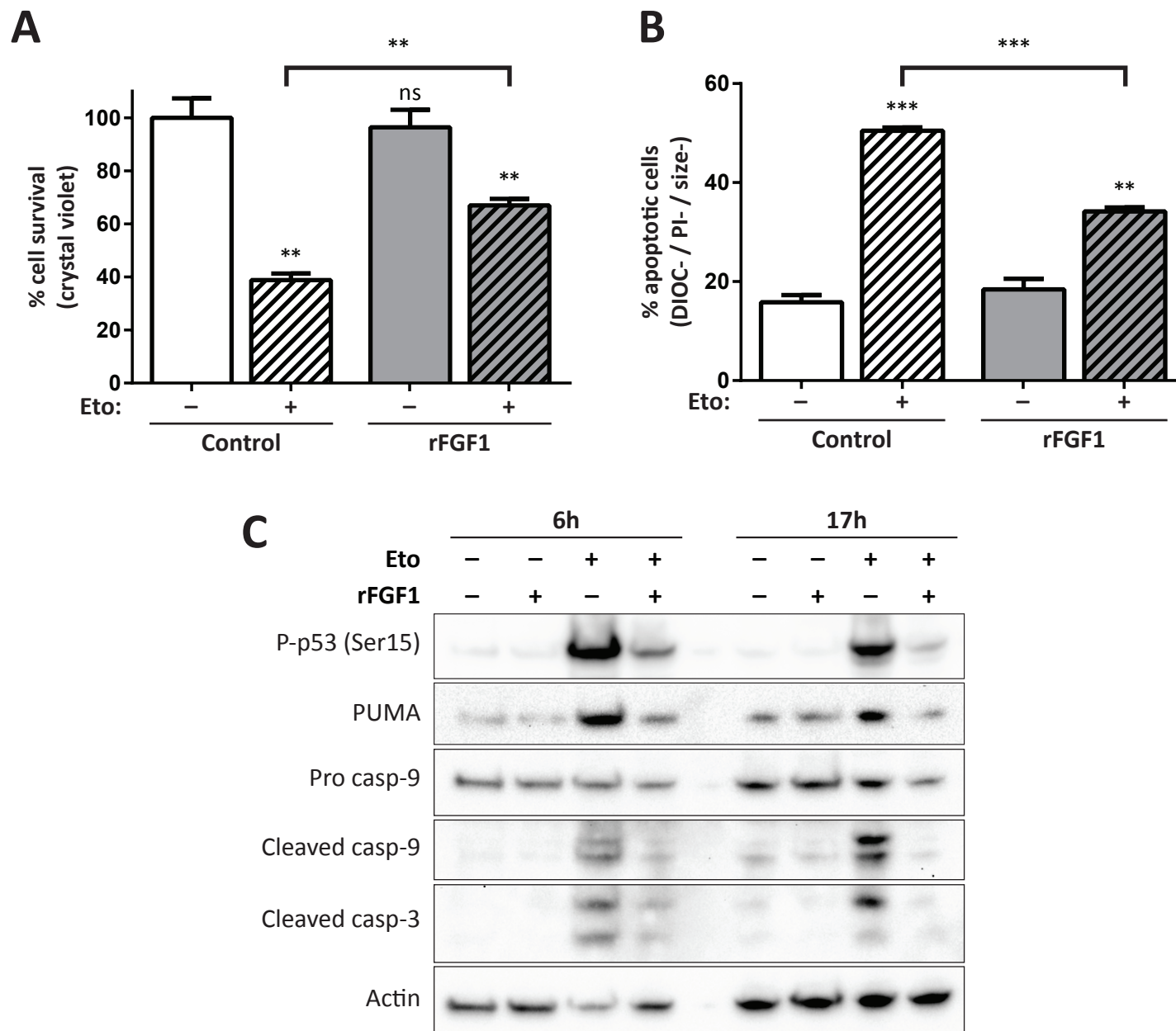


Figure 2

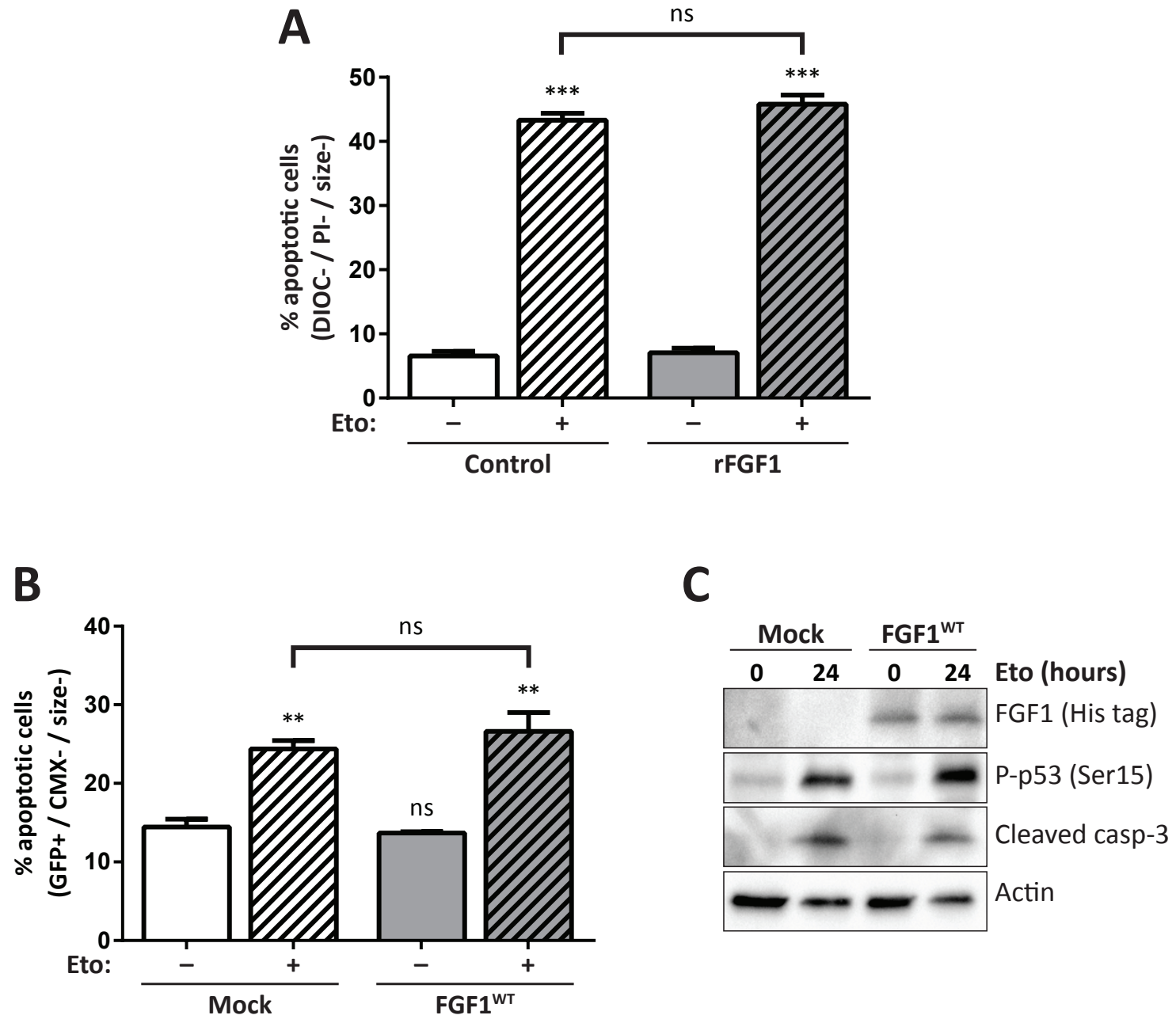


Figure 3

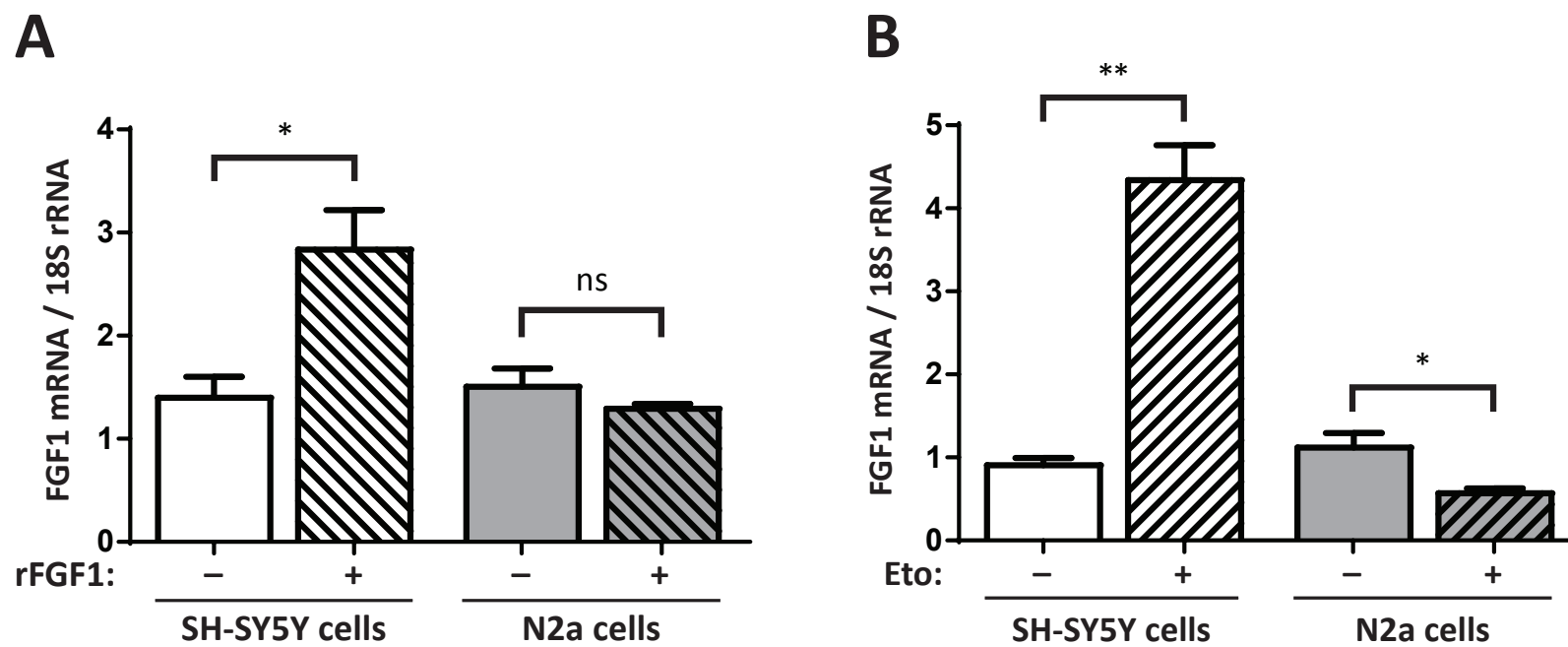
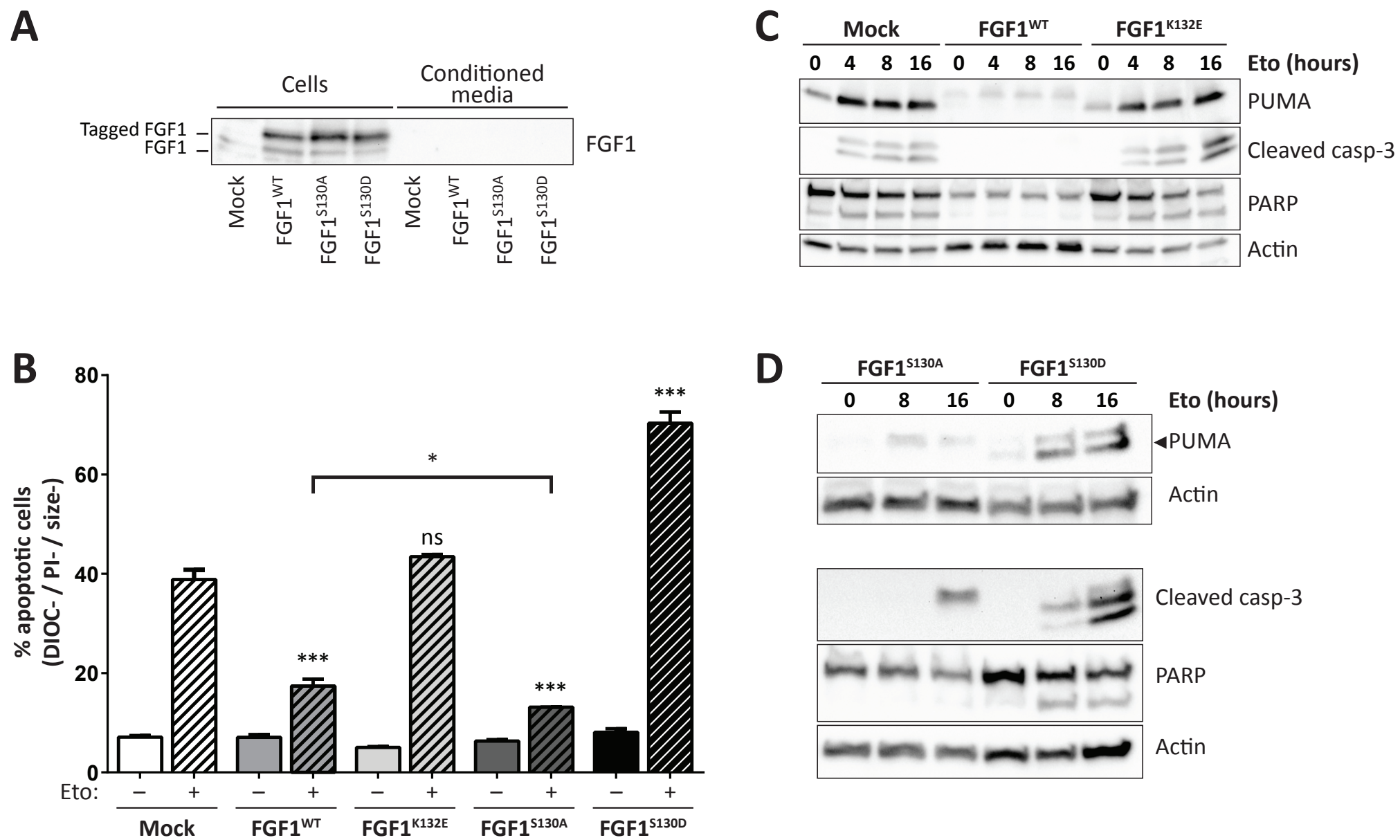


Figure 5



2 - Rôle de la nucléarisation dans la régulation de l'activité anti-apoptotique du FGF1 dans les cellules SH-SY5Y

Les études précédemment menées par l'équipe ont mis en lumière le rôle de la nucléarisation du FGF1 qui est nécessaire mais insuffisante à ses activités intracellulaires, additionnellement régulées par la phosphorylation, dans les cellules PC12 (Delmas *et al.*, 2016; Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009). Le FGF1 possède deux séquences NLS ainsi qu'une séquence NES d'export nucléaire. Des vecteurs d'expression permettant l'expression de formes mutantes du FGF1 pour ces séquences ont été générés par mutagenèse dirigée puis transfectés de façon stable dans les cellules SH-SY5Y. Le FGF1^{NLS1m} est modifié sur sa séquence NLS1 N-terminale où les trois résidus lysines de la séquence KKPK ont été remplacés par des alanines (AAPA). Le FGF1^{NLS2m} est modifié de la même façon sur la première partie de sa séquence NLS2 bipartite N-terminale (KK...KK → AA...KK). Le FGF1^{NESm} est modifié sur sa séquence NES d'export nucléaire, où le résidu Lys147 a été remplacé par une alanine (L147A).

Après sélection des cellules transfectées par traitement à la généticine, l'étude de la localisation subcellulaire de ces trois nouveaux mutants a été entreprise dans les populations polyclonales les surexprimant, en parallèle du FGF1^{WT} et du FGF1^{ΔNLS}. L'activité anti-apoptotique du FGF1^{ΔNLS}, délété de sa séquence NLS1 N-terminale et précédemment étudiée dans les cellules PC12, a également été étudié dans les cellules SH-SY5Y.

2.1 - Étude de l'activité anti-apoptotique du FGF1^{ΔNLS} dans les cellules SH-SY5Y

La nucléarisation du FGF1 étant nécessaire à son activité anti-apoptotique dans les cellules PC12, j'ai étudié l'impact de la nucléarisation du FGF1 sur son effet protecteur vis-à-vis de l'apoptose dépendante de p53 dans les cellules SH-SY5Y. Pour cela, des cellules SH-SY5Y surexprimant constitutivement le FGF1^{ΔNLS} délété de sa séquence NLS1 ont été traitées par de l'étoposide pendant 24h. Puis les cellules ont été marquées au DIOC₆ qui s'accumule dans les mitochondries possédant un potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), ainsi qu'à l'iodure de propidium (IP, non perméant) permettant d'exclure les cellules nécrotiques. Les cellules apoptotiques de petite taille (taille⁻) et négatives aux marquages DIOC₆ (DIOC⁻) et IP (IP⁻) ont été quantifiées par cytométrie en flux. De plus, des marqueurs protéiques de l'apoptose dépendante de p53 ont été analysés par Western-blot.

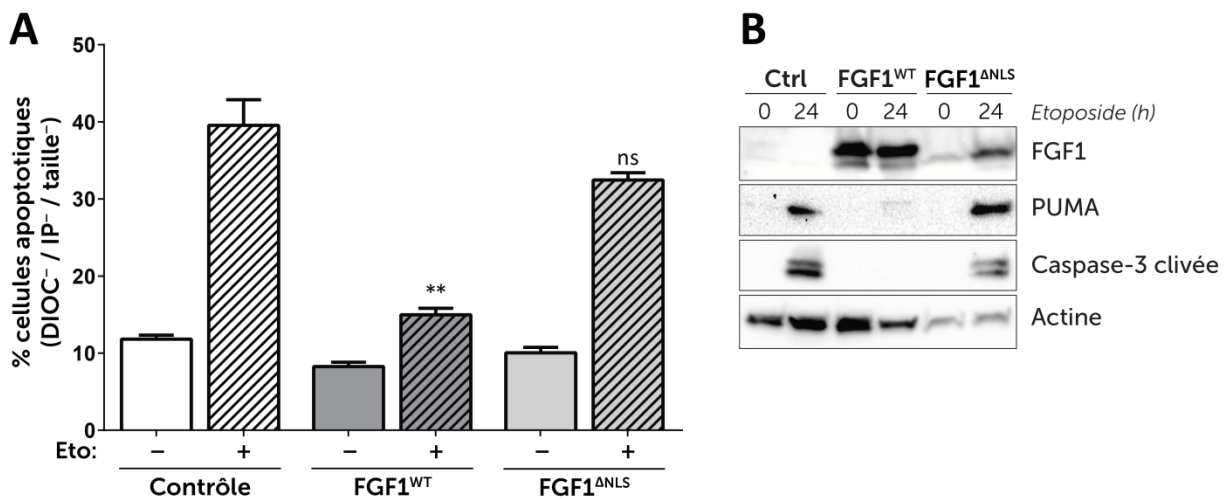


Figure 32 : Le FGF1^{ΔNLS} ne protège pas les cellules SH-SY5Y de l'apoptose dépendante de p53

Les cellules SH-SY5Y transfectées soit par un vecteur vide (Contrôle), ou surexprimant de façon stable le FGF1^{WT} ou le FGF1^{ΔNLS} ont été traitées ou non à l'étoposide (Eto) pendant 24h pour induire l'apoptose dépendante de p53. **A** : Les cellules apoptotiques de petite taille (taille⁻), ayant perdu leur Δψ_m (DIOC⁻) et non nécrotiques (IP⁻) ont été quantifiées par cytométrie en flux. Le FGF1^{WT} protège les cellules SH-SY5Y de l'apoptose dépendante de p53, contrairement au FGF1^{ΔNLS} qui n'a aucun effet significatif. Les barres du graphique indiquent la moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes. Des *t*-tests de Student ont été réalisés relativement au contrôle +éto (** : P ≤ 0,01 ; ns : P > 0,05). **B** : Des extraits protéiques ont été dénaturés puis analysés par Western-blot (Ctrl = contrôle). Le FGF1^{WT} inhibe fortement la transactivation de *PUMA* dépendante de p53 ainsi que le clivage de la caspase-3 observées dans la condition contrôle en présence d'étoposide, alors qu'aucun effet protecteur du FGF1^{ΔNLS} n'est observé.

L'analyse de l'apoptose par cytométrie en flux (**Figure 32A**) des cellules surexprimant le FGF1^{WT} montre une forte diminution du pourcentage de cellules apoptotiques suite à l'induction de l'apoptose dépendante de p53 (+éto) par rapport aux cellules contrôles transfectées par un vecteur vide. Cet effet protecteur est inhibé dans les cellules surexprimant le FGF1^{ΔNLS} dont le pourcentage de cellules apoptotiques en présence d'étoposide est similaire à celui des cellules contrôles. Au niveau protéique (**Figure 32B**), la diminution de la transactivation de *PUMA* et du clivage de la caspase-3 induite par le FGF1^{WT} en présence d'étoposide n'est pas observée dans les cellules surexprimant le FGF1^{ΔNLS}, où les niveaux protéiques sont similaires à ceux des cellules contrôles.

Ces résultats suggèrent que l'importance de la nucléarisation du FGF1 est conservée dans les cellules SH-SY5Y et est requise pour son activité anti-apoptotique. Cependant, il est nécessaire de confirmer la localisation principalement cytosolique du FGF1^{ΔNLS} dans les cellules SH-SY5Y.

2.2 - Étude de la localisation subcellulaire des mutants de nucléarisation du FGF1 dans les cellules SH-SY5Y par fractionnement nucléaire

La localisation subcellulaire du FGF1^{ΔNLS} et des nouveaux mutants de nucléarisation (FGF1^{NLS1m}, FGF1^{NLS2m} et FGF1^{NESm}) a été étudiée dans les cellules SH-SY5Y par des expériences de fractionnement subcellulaire (cytosol/noyau). Les fractionnements nucléaires sont réalisés sur 10.10⁶ cellules. Les cellules sont lysées et les extraits totaux récupérés. Après centrifugation, les fractions cytosoliques sont prélevées, puis les fractions nucléaires sont récupérées après ajout d'un tampon de lyse nucléaire (cf. *Annexe Matériels et méthodes* – p. 273). Les différentes fractions protéiques sont ensuite dénaturées et analysées par Western-blot. La pureté des fractions est mesurée d'une part par la détection de la tubuline, protéine cytosolique, et d'autre part par la détection des lamines A/C, protéines nucléaires. De nombreux protocoles de fractionnement ont été testés, mais des problèmes de stabilité du FGF1 et de pureté des fractions obtenues demeurent dans les cellules SH-SY5Y.

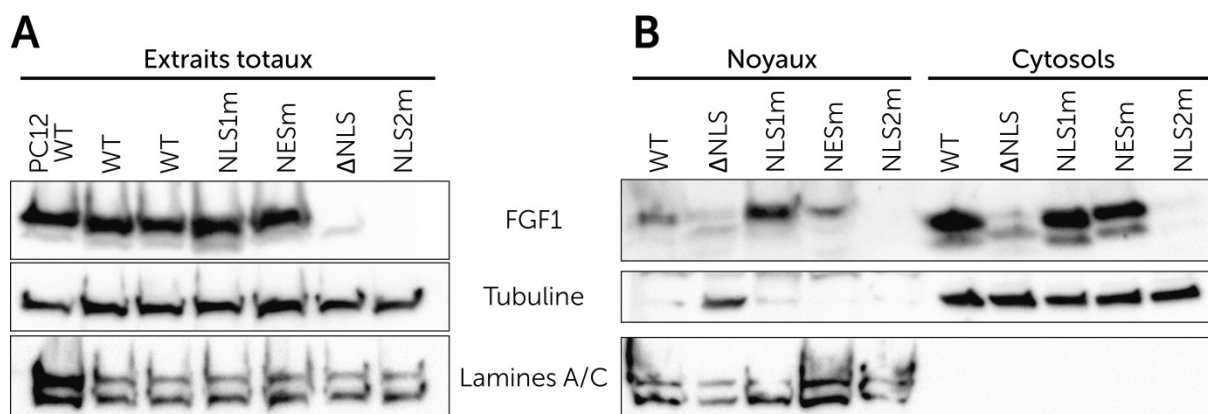


Figure 33 : Étude de l'expression et de la localisation subcellulaire du FGF1^{WT} et des mutants de nucléarisation dans les cellules SH-SY5Y

Les populations polyclonales surexprimant le FGF1^{WT}, le FGF1^{NLS1m}, le FGF1^{NLS2m}, le FGF1^{NESm} ou le FGF1^{ΔNLS} (déléte de sa séquence NLS1) ont subi un fractionnement nucléaire. **A** : analyse par Western-blot des extraits totaux, où un clone PC12 surexprimant le FGF1^{WT} sert de contrôle positif. **B** : Analyse par Western-blot des fractions nucléaires et cytosoliques. La tubuline permet d'évaluer la pureté des fractions cytosoliques, les lamines A/C permettent d'évaluer la pureté des fractions nucléaires.

Des quantités équivalentes de FGF1^{WT}, FGF1^{NLS1m} et FGF1^{NESm} sont détectées dans les extraits totaux des cellules SH-SY5Y, de façon comparable aux cellules PC12 surexprimant le FGF1^{WT}. En revanche, le FGF1^{ΔNLS} dont la taille est inférieure au FGF1^{WT} est plus faiblement détecté, et le FGF1^{NLS2m} n'a jamais pu être détecté dans les différentes expériences réalisées (**Figure 33A**).

La localisation des FGF1^{WT}, FGF1^{NLS1m} et FGF1^{NESm} semble être cytoplasmique et nucléaire, la contamination de la fraction nucléaire par la tubuline étant extrêmement faible. Le FGF1^{ΔNLS} est détecté dans la fraction nucléaire, mais la tubuline y est fortement présente (**Figure 33B**). La

présence de FGF1^{ΔNLS} dans la fraction nucléaire pourrait donc être le résultat de la forte contamination cytosolique, et la localisation du FGF1^{ΔNLS} semble donc principalement cytosolique.

Ces résultats montrent que la localisation cytosolique et nucléaire du FGF1^{WT} semble conservée des cellules PC12 aux cellules SH-SY5Y. Bien que la localisation du FGF1^{ΔNLS} semble être cytosolique, ce qui conforterait les résultats obtenus précédemment au laboratoire dans les cellules PC12 par des expériences de fractionnement et d'immunofluorescence, la différence de niveau substantielle entre le FGF1^{WT} et le FGF1^{ΔNLS} et les problèmes de pureté des fractions nécessitent de nouvelles mises au point du protocole de fractionnement pour la déterminer plus clairement. Les mutations des séquences NLS1 et NES ne semblent pas influencer la localisation subcellulaire des FGF1^{NLS1m} et FGF1^{NESm}, soulevant la possibilité d'une diffusion passive de ces formes du FGF1 vers le noyau. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer leur localisation avec certitude. Enfin, l'expression du FGF1^{NLS2m} n'a jamais pu être détectée dans nos expériences, ni dans les fractions ni dans les extraits totaux, ce qui pourrait indiquer un problème d'expression de notre vecteur ou un défaut important de stabilité du FGF1^{NLS2m} dans ces cellules.

III Caractérisation des modulations transcriptionnelles induites par le FGF1 et p53 dans les cellules PC12 par étude transcriptomique (RNA-Seq)

1 - But et stratégie

Afin d'étudier les éventuelles régulations de l'expression de gènes induites par le FGF1, dans un contexte ou non d'induction de l'apoptose dépendante de p53, j'ai initié une étude transcriptomique dans les cellules PC12. En effet dans ces cellules le FGF1 interagit avec p53 et module une partie de ses activités transactivatrices. Nous avons émis l'hypothèse que le FGF1 pourrait réguler directement ou non l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose ou la différenciation, et ce de façon dépendante ou non de p53.

Pour cela, une expérience de RNA-Seq a été réalisée à partir d'un clone cellulaire surexprimant le FGF1^{WT} sous le contrôle d'un promoteur inducible à la dexaméthasone ou d'un clone transfecté par un vecteur vide (contrôle). L'expérience a été réalisée en duplicat, et les cellules ont été traitées pendant 48h à la dexaméthasone afin d'induire l'expression du FGF1, puis traitées ou non à l'étoposide pendant 8h afin d'induire l'apoptose dépendante de p53 (**Figure 34**). Les ARN ont été extraits puis envoyés à la plateforme de séquençage ImaGif, où leur qualité a été vérifiée, puis les ARNm polyA+ ont été purifiés. Les ARNm ont ensuite été séquencés sur un séquenceur Illumina HiSeq en Single Read 50 nt. Les analyses bioinformatiques ont été réalisées par la plateforme en utilisant les logiciels suivants : Cutadapt et FastQC pour l'étape de « trimming » (retirer les séquences des adaptateurs utilisés lors des constructions de bibliothèques), TopHat2 pour le « mapping » (positionnement des reads sur le génome) et IGV pour visualiser la répartition des reads sur le génome. Le comptage des séquences lues (« reads ») a été réalisé *via* HTSeq-Count, et l'analyse différentielle des quatre conditions par le package R DESeq2. Huit analyses différentielles ont été réalisées par la plateforme entre les quatre conditions de notre expérience (**Figure 34**), et les résultats sont exprimés en fold-change (FC).

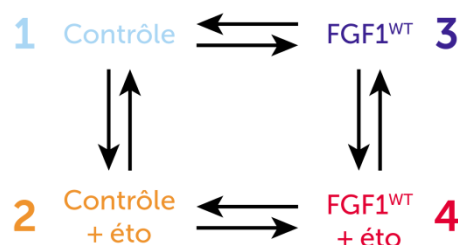


Figure 34 : Conditions et analyses différentielles réalisées

L'expérience de RNA-Seq a été réalisée en quatre conditions (1, 2, 3 et 4), chacune en duplicat. Toutes les cellules ont été traitées 48h à la dexaméthasone pour induire ou non l'expression du FGF1^{WT}, puis traitées ou non à l'étoposide (éto) pendant 8h afin d'induire l'apoptose dépendante de p53. Les analyses différentielles réalisées sont représentées par les flèches.

2 - Premiers résultats

2.1 - Le FGF1^{WT} et l'étoposide induisent les régulations significatives de très nombreux gènes

À l'issue de l'analyse du nombre de séquences lues (« reads ») obtenus pour chacune des quatre conditions, on peut remarquer que l'ajout d'étoposide (en rouge et orange) induit une diminution d'environ 10% du nombre de gènes non exprimés (**Figure 35A**) ainsi qu'une augmentation du nombre de gènes faiblement exprimés (**Figure 35B**).

L'analyse différentielle de ce séquençage par le package R DESeq2 a montré que de très nombreux gènes sont significativement ($P < 0,01$) régulés par la surexpression de FGF1^{WT} et/ou l'ajout d'étoposide (**Tableau 3**).

L'expression du FGF1 a été induite durant 56h dans ces cellules (48h de pré-traitement à la dexaméthasone puis 8h de traitement par étoposide et dexaméthasone), et elles présentent alors un phénotype différencié avec de longues extensions neuritiques commençant à s'établir en réseau. Il n'est donc pas surprenant que d'aussi nombreux gènes soient régulés (directement ou non) par le FGF1 lors de leur différenciation. D'autre part, dans les cellules PC12 l'activation de p53 (phospho-p53 Ser15) est maximale (100%) après 8h de traitement à l'étoposide et atteint déjà 60% après 4h (Bouleau *et al.*, 2007; Delmas *et al.*, 2016). Les régulations transcriptionnelles de cibles de p53 comme *MDM2*, *PUMA* ou *p21* sont détectées par RT-PCR dès 4h de traitement et sont importantes à 8h (Bouleau *et al.*, 2007; Delmas *et al.*, 2016). Les dommages à l'ADN induits par l'étoposide activent donc rapidement plusieurs voies de réponse, dont la voie p53, qui vont-elles-mêmes induire la régulation d'une multitude de gènes cibles. Nous avons choisi de nous placer à un temps de traitement par l'étoposide de 8h qui nous permettrait d'une part de valider les résultats de cette expérience en les comparant à d'autres résultats connus (cibles de p53), et de nous assurer d'être dans une fenêtre temporelle correcte pour observer les régulations induites par p53. Il faut cependant noter que nous manquerons inévitablement les régulations plus précoces ou tardives.

P < 0,01	FGF1 ^{WT} VS Ctrl	Ctrl + éto VS Ctrl	FGF1 ^{WT} + éto VS FGF1 ^{WT}	FGF1 ^{WT} + éto VS Ctrl + éto
Nombre de gènes activés	1709	1891	1065	284
Nombre de gènes réprimés	1780	2591	1381	340

Tableau 3 : Le FGF1^{WT} et l'étoposide induisent les régulations significatives de nombreux gènes

Le FGF1^{WT} et l'étoposide régulent significativement l'expression de milliers de gènes. Ce tableau récapitule le nombre de gènes significativement régulés entre les différentes conditions (P < 0,01 ; Ctrl : Contrôle).

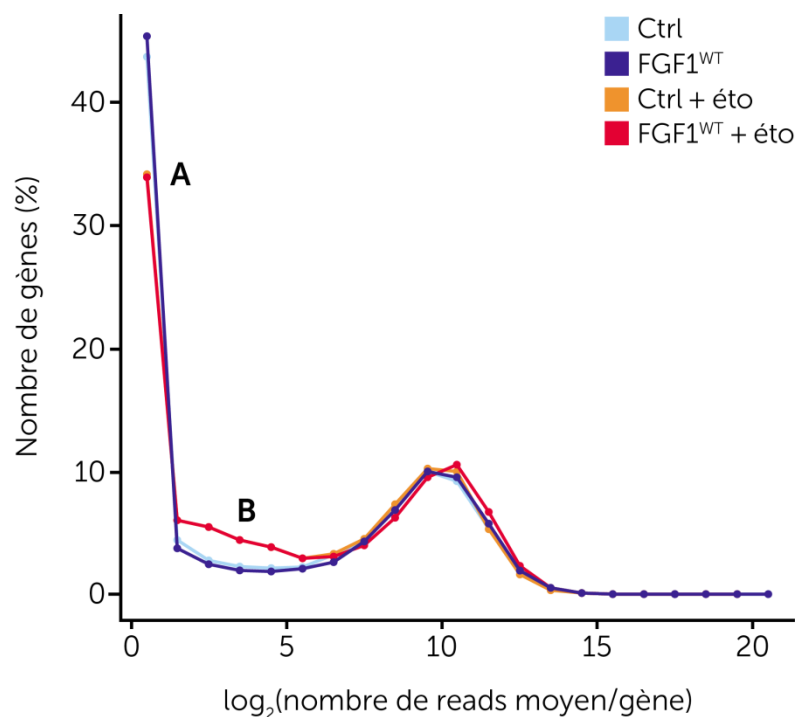


Figure 35 : L'ajout d'étoposide induit une diminution du nombre de gènes non exprimés et une augmentation du nombre de gènes faiblement exprimés

L'analyse du nombre de reads moyen obtenu pour chaque gène dans les différentes conditions montre que l'ajout d'étoposide (en rouge et orange, superposés) induit une diminution d'environ 10% du nombre de gènes non exprimés (A) ainsi qu'une augmentation du nombre de gènes faiblement exprimés (B).

2.2 - La surexpression du FGF1 humain induit l'expression du FGF1 endogène murin

Le vecteur d'expression utilisé permet la surexpression de la forme humaine du FGF1 dans les cellules PC12 de rat. Une des premières étapes de validation de cette expérience a été de vérifier le niveau d'expression du *FGF1*. Le traitement des cellules par la dexaméthasone a bien induit l'expression du *FGF1* exogène humain dans les cellules transfectées par le vecteur d'expression $FGF1^{WT}$ (x 5000), contrairement aux cellules transfectées par un vecteur vide (Contrôle) (**Figure 36A**).

De précédents résultats de l'équipe avaient démontré l'induction de l'expression du *FGF1* endogène murin par l'ajout dans le milieu de culture de FGF1 recombinant humain et d'héparine (x 7 après 3 jours de traitement) (Renaud *et al.*, 1996b). Les résultats du RNA-Seq montrent que la surexpression de *FGF1* humain intracellulaire dans les cellules PC12 induit une forte augmentation de l'expression du *FGF1* endogène murin (x 500) (**Figure 36B**). Enfin, l'ajout d'étoposide induit une augmentation (x 3) de l'expression du *FGF1* endogène murin en absence de surexpression de *FGF1* (**Figure 36B**), ce qui conforte les résultats similaires obtenus dans les cellules neuroblastiques humaines SH-SY5Y.

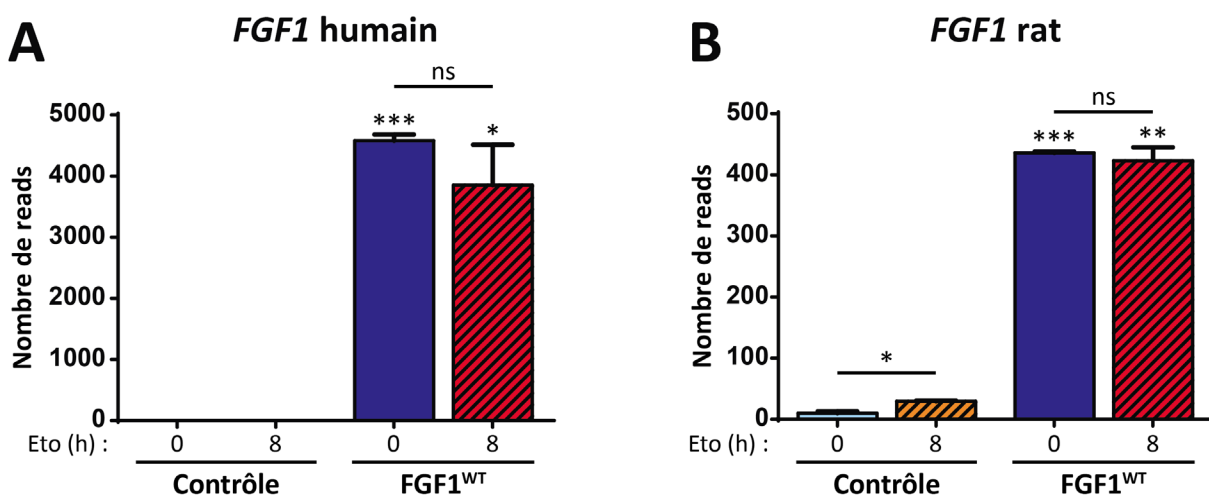


Figure 36 : La surexpression du *FGF1* humain induit l'expression du *FGF1* endogène murin

Les cellules PC12 de rat transfectées par le $FGF1^{WT}$ surexpriment la forme humaine du FGF1. L'analyse du nombre de reads dans des régions divergentes des formes humaine et murine du FGF1 montre d'une part que le *FGF1* humain est correctement surexprimé dans notre système (**A**), et d'autre part que la surexpression du *FGF1* humain dans les cellules PC12 induit l'augmentation de l'expression du *FGF1* endogène murin (**B**). L'ajout d'étoposide (eto) induit une légère augmentation de l'expression du *FGF1* endogène murin en absence de FGF1 (Barres d'erreur = SEM. T-test de Student : *** : $P \leq 0,001$; ** : $P \leq 0,01$; * : $P \leq 0,05$; ns : $P > 0,05$; $n = 2$).

3 - Quels sont les gènes dont l'expression est régulée par le FGF1 et/ou l'étoposide : approche globale et gène-candidat

L'analyse du RNA-Seq peut s'effectuer par deux approches : une approche globale où l'on s'intéressera notamment aux gènes les plus différenciellement exprimés, et une approche gène-candidat où nous nous sommes intéressés à des protéines connues en lien par exemple avec l'apoptose ou la différenciation induite par le FGF1^{WT} dans les cellules PC12.

3.1 - Approche globale : premières analyses

Le nombre de gènes différenciellement exprimés de façon significative est trop important dans les différentes comparaisons effectuées. Nous avons donc souhaité restreindre notre champ d'étude en focalisant notre attention sur les gènes régulés par le FGF1 en présence d'étoposide. En effet, de précédents résultats du laboratoire ont montré que le FGF1 module une partie des activités transactivatrices de p53, comme BAX dans les cellules REtsAF ou PUMA et NOXA dans les cellules PC12. Nous avons donc cherché à déterminer quels sont les gènes dont l'expression est régulée par le FGF1 en présence d'étoposide.

a) Méthode

Pour cela, nous avons dans un premier temps recherché les gènes dont le FGF1 régule **négativement** l'expression en présence d'étoposide (par exemple des gènes à l'action pro-apoptotique). C'est-à-dire les gènes dont l'expression est :

- activée en présence d'étoposide dans les cellules contrôle par rapport aux cellules contrôle non traitées (gènes positivement régulés dans la comparaison **2-1**, flèche vert foncé),
- réprimée, moins activée ou non régulée dans les cellules surexprimant le FGF1^{WT} en présence d'étoposide par rapport aux cellules surexprimant le FGF1^{WT} non traitées (gènes moins fortement activés, réprimés ou non régulés dans la comparaison **4-3**, flèches vert clair et gris),
- réprimée par le FGF1^{WT} en présence d'étoposide par rapport aux cellules contrôle +éto (gènes réprimés dans la comparaison **4-2**, flèche rouge) (**Figure 37A**). Ce dernier critère nous permet de nous assurer que l'activation plus faible d'un gène dans la comparaison **4-3** par rapport à la comparaison **2-1** reflète bien un niveau d'expression plus faible en condition **4** par rapport à la condition **2**, et non un niveau d'expression plus important en **1** qu'en **3**.

950 gènes sont à la fois positivement régulés par l'étoposide seul et le sont moins, pas ou négativement en présence de FGF1^{WT}, et 340 gènes sont réprimés par le FGF1^{WT} en présence

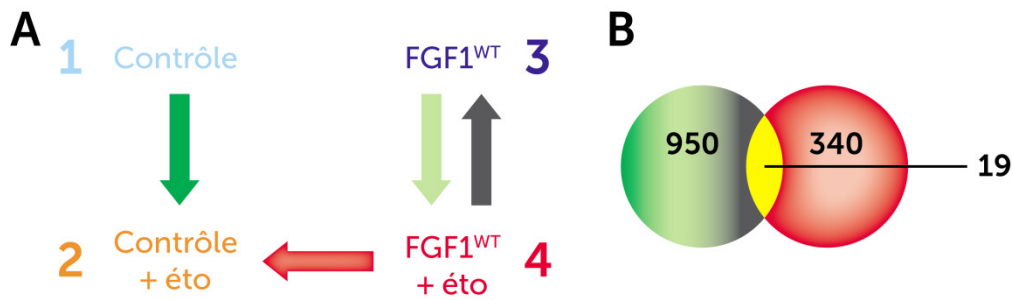


Figure 37 : Recherche des gènes négativement régulés par le FGF1 en présence d'étoposide

A : Pour obtenir les gènes négativement régulés par le FGF1 en présence d'étoposide, nous avons recherché les gènes dont l'expression est activée en présence d'étoposide dans les cellules contrôle par rapport aux cellules contrôle non traitées (comparaison **2-1**, flèche vert foncé), et qui sont réprimés (flèche grise), moins activés (flèche vert clair) ou non régulés dans les cellules surexprimant le FGF1^{WT} en présence d'étoposide par rapport aux cellules surexprimant le FGF1^{WT} non traitées (comparaison **4-3**), et dont l'expression est réprimée par le FGF1^{WT} en présence d'étoposide par rapport aux cellules contrôle +éto (comparaison **4-2**, flèche rouge). **B :** 950 gènes sont à la fois positivement régulés par l'étoposide seul et le sont moins ou pas en présence de FGF1^{WT}, et 340 gènes sont réprimés par le FGF1^{WT} en présence d'étoposide. L'intersection de ces deux groupes de gènes résulte en une liste de 19 gènes dont l'expression est négativement régulée par le FGF1^{WT} en présence d'étoposide (en jaune).

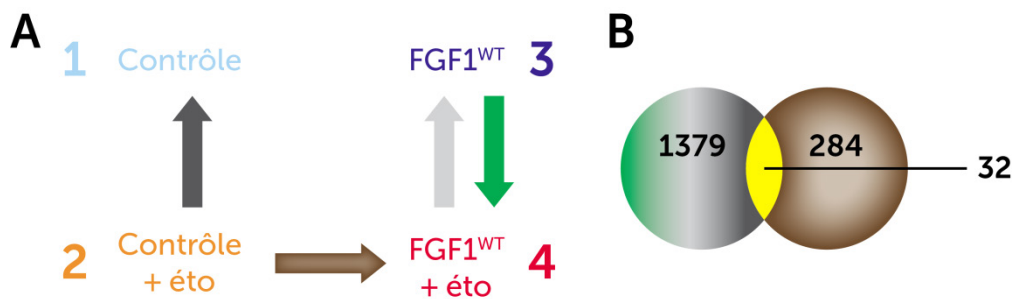


Figure 38 : Recherche des gènes positivement régulés par le FGF1 en présence d'étoposide

A : Pour obtenir les gènes positivement régulés par le FGF1 en présence d'étoposide, nous avons recherché les gènes dont l'expression est réprimée en présence d'étoposide dans les cellules contrôle par rapport aux cellules contrôle non traitées (comparaison **2-1**, flèche gris foncé), et qui sont activés (flèche verte), moins réprimés (flèche gris clair) ou non régulés dans les cellules surexprimant le FGF1^{WT} en présence d'étoposide par rapport aux cellules surexprimant le FGF1^{WT} non traitées (comparaison **4-3**), et dont l'expression est activée par le FGF1^{WT} en présence d'étoposide par rapport aux cellules contrôle +éto (comparaison **4-2**, flèche marron). **B :** 1379 gènes sont à la fois négativement régulés par l'étoposide seul et le sont moins ou pas en présence de FGF1^{WT}, et 284 gènes sont activés par le FGF1^{WT} en présence d'étoposide. L'intersection de ces deux groupes de gènes résulte en une liste de 32 gènes dont l'expression est positivement régulée par le FGF1^{WT} en présence d'étoposide (en jaune).

d'étoposide. L'intersection de ces deux groupes de gènes résulte en une liste de 19 gènes dont l'expression est négativement régulée par le FGF1^{WT} en présence d'étoposide (**Figure 37B**) : *AABR06097748.2* (codant pour une protéine non caractérisée), *Abca8*, *Arl4a*, *Col22a1*, *Fbln7*, *Fgfr1op*, *Il22ra2*, *Lcn12*, *Lrrc32*, *Msh5*, *Nwd1*, *Rasip1*, *Sgpp2*, *Slc13a3*, *Slc36a2*, *Sycp2*, *Trim5*, *Trub1*, *Tspan2*.

Dans un second temps, nous avons recherché les gènes **positivement** régulés par le FGF1 en présence d'étoposide (par exemple des gènes à l'action anti-apoptotique) par le même type d'approche. Nous avons ainsi recherché les gènes dont l'expression est :

- réprimée en présence d'étoposide dans les cellules contrôle par rapport aux cellules contrôle non traitées (gènes négativement régulés dans la comparaison **2-1**, flèche gris foncé),
- moins réprimée, activée ou non régulée dans les cellules surexprimant le FGF1^{WT} en présence d'étoposide par rapport aux cellules surexprimant le FGF1^{WT} non traitées (gènes moins fortement réprimés, activés ou non régulés dans la comparaison **4-3**, flèches gris clair et vert),
- activée par le FGF1^{WT} en présence d'étoposide par rapport aux cellules contrôle +éto (gènes activés dans la comparaison **4-2**, flèche marron) (**Figure 38A**). Ce dernier critère nous permet de nous assurer que la répression plus faible d'un gène dans la comparaison **4-3** par rapport à la comparaison **2-1** reflète bien un niveau d'expression plus élevé en condition **4** par rapport à la condition **2**, et non un niveau d'expression plus faible en **1** qu'en **3**.

1379 gènes sont à la fois négativement régulés par l'étoposide seul et le sont moins, pas ou positivement en présence de FGF1^{WT}, et 284 gènes sont activés par le FGF1^{WT} en présence d'étoposide. L'intersection de ces deux groupes de gènes résulte en une liste de 32 gènes dont l'expression est positivement régulée par le FGF1^{WT} en présence d'étoposide (**Figure 38B**) : *AABR06085767.1* (codant pour une protéine non caractérisée), *Ace3*, *Arfgap1*, *Cebpb*, *Csrnp1*, *Dkk3*, *Egln3*, *Eif1a*, *Fbln1*, *Gbp2*, *Gpd1l*, *Hspb1*, *Id1*, *Isl1*, *Klhdc2*, *Krt7*, *LOC100909521* (code pour la protéine neurosecretory protein VGF-like), *Msn*, *N4bp2l1*, *Pde4b*, *Pfn1*, *Plk3*, *Ppl*, *Reep3*, *S100a4*, *S100a6*, *S100a10*, *Serpine1*, *Slc25a24*, *Tmcc3*, *Tusc3*, *Yipf5*.

b) Validation des résultats par RT-PCR

En nous basant sur les données disponibles dans la littérature, nous avons sélectionné quelques gènes d'intérêt parmi chacune de ces deux listes pour valider ces résultats par RT-PCR. Les cellules contrôle PC12 non transfectées (« PC12 »), ou transfectées par un vecteur vide (« Contrôle »), ou

surexprimant le FGF1^{WT} ou une forme taggée V5/His (« FGF1^{WT-V5/His} ») sous le contrôle d'un promoteur inductible à la dexaméthasone ont été pré-traitées à la dexaméthasone pendant 48h puis traitées ou non par de l'étoposide pendant 0, 4h, 8h ou 16h, et les ARNm ont été extraits. Les ARNm ont été rétro-transcrits puis amplifiés par PCR et quantifiés. Les graphes représentent le ratio ARNm du transcrit étudié rapporté au niveau de l'ARNr 18S en unités arbitraires (UA) et le ratio de la condition contrôle sans étoposide est fixé à 1 (cf. **Annexe Matériels & méthodes** – p. 274).

i. Rasip1

Ainsi, parmi les gènes négativement régulés par le FGF1 en présence d'étoposide, nous nous sommes intéressés à *Rasip1*. La protéine **Rasip1** (Ras Interacting Protein 1, ou RAIN) est un effecteur de la petite GTPase Ras. Lorsque Ras est activée, celle-ci interagit avec de nombreux effecteurs et stimule plusieurs cascades de signalisation cytoplasmiques régulant la prolifération et la différenciation cellulaires, ou l'apoptose. *Ras* est un oncogène dont les mutations sont fréquemment retrouvées dans une grande variété de cancers, qui induit la croissance et la transformation morphologique de nombreux types cellulaires *in vitro* et *in vivo*, et qui est directement lié à la tumorigenèse dans plusieurs modèles animaux (Barbacid, 1987; Bos, 1989). Contrairement aux autres effecteurs de Ras, comme Raf, *Rasip1* n'est pas cytoplasmique et ne transite pas par la membrane plasmique. Il est localisé en périphérie de l'appareil de Golgi et du noyau, et est recruté à l'appareil de Golgi après activation de Ras (Mitin *et al.*, 2004). *Rasip1* potentialise l'induction de la voie MAPK par le FGF2 recombinant dans les cellules HEK293, et son expression est fortement augmentée dans les fibroblastes de peau de patients atteints du syndrome de Soto (grande taille, dysmorphisme facial et retard mental) (Visser *et al.*, 2012). *Rasip1* est nécessaire à la motilité des cellules endothéliales, l'angiogenèse ou la tubulogenèse des vaisseaux sanguins (Post *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2009), et un de ses polymorphismes est associé à un risque plus important d'ischémie (Cotlarciuc *et al.*, 2014).

Dans notre étude, l'expression de *Rasip1* est diminuée par le FGF1 et augmentée par l'étoposide (**Figure 39A**), ce qui indiquerait un nouveau rôle de *Rasip1* dans la régulation de la différenciation et de la survie. L'analyse par RT-PCR (**Figure 39B et C**) de l'expression de *Rasip1* montre une induction de son expression par l'étoposide seul ou en présence de FGF1^{WT} par rapport au contrôle non traité, ce qui est concordant avec les résultats du RNA-Seq (**Figure 39A et Tableau 4**). En revanche, la répression attendue de son expression en présence de FGF1^{WT} seul ou combiné à l'étoposide par rapport au contrôle respectivement non traité ou en présence d'étoposide n'est pas observée par RT-PCR où l'on constate au contraire une tendance du FGF1 à activer l'expression de *Rasip1*.

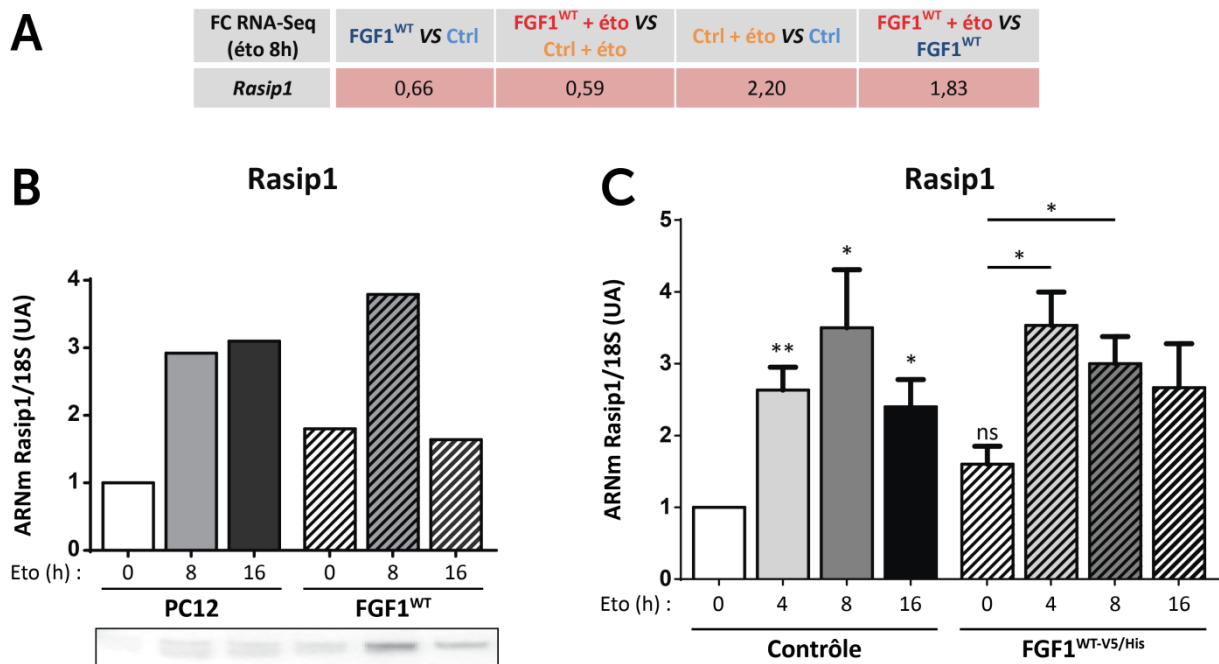


Figure 39 : Analyse par RT-PCR de l'expression de *Rasip1*

A : Rappel des fold-changes (FC) significatifs ($p < 0,01$) obtenus par RNA-Seq. **B** : Quantification des ARNm Rasip1 par RT-PCR dans les cellules PC12 non transfectées et un clone stable surexprimant le FGF1 après 0, 8h ou 16h de traitement par l'étoposide (éto). $N = 1$, le gel correspondant est présenté sous l'histogramme. **C** : Quantification des ARNm Rasip1 par RT-PCR dans les cellules Contrôle transfectées par un vecteur vide, ou un clone surexprimant la forme taggée du FGF1^{WT-V5/His}. Les histogrammes représentent les moyennes de trois expériences indépendantes, les barres d'erreur correspondent à la SEM. **: $p \leq 0,01$; * : $p \leq 0,05$; ns : $p > 0,05$.

ii. Protéines S100

Parmi les gènes positivement régulés par le FGF1 en présence d'étoposide, nous nous sommes intéressés à *S100a4*, *S100a6*, *S100a10*, *Dkk3* et *Serpine1*. Les protéines de liaison au Ca^{2+} **S100A4**, **S100A6** et **S100A10** (S100 calcium-binding protein A4, 6 ou 10) jouent un rôle dans la motilité cellulaire et sont impliquées dans les processus de migration et d'invasion requis pour la progression tumorale et la dissémination des tumeurs dans différents types de cancers (Gross *et al.*, 2014). S100A4 promeut la motilité et l'invasion dans des lignées cellulaires de cancer du sein, colorectal ou pancréatique (Huang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a), mais inhibe la migration des astrocytes (Takenaga and Kozlova, 2006). La protéine S100A4 interagit dans le noyau avec p53 et promeut sa dégradation, le knockdown de S100A4 induit l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de p53 et augmente l'apoptose induite par le cisplatine dans une lignée épithéliale de cancer du poumon (Orre *et al.*, 2013). La protéine S100A6 inhibe la migration dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome (Luu *et al.*, 2005), mais induit la migration dans des lignées cellulaires de cancer

pancréatique et interagit notamment avec l'annexine II (*Anxa2*) (Nedjadi *et al.*, 2009). La protéine S100A10 promeut l'invasion des macrophages dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (O'Connell *et al.*, 2010) ainsi que la croissance tumorale de fibrosarcomes *in vivo*, *via* le recrutement de macrophages (TAM, Tumor-Associated Macrophages) au site de la tumeur (Phipps *et al.*, 2011).

Dans notre étude, l'expression de ces trois gènes *S100* est augmentée par le FGF1 seul ou en présence d'étoposide, et diminuée après 8h de traitement à l'étoposide seul ou en présence de FGF1 (**Figure 40A**). La régulation induite par le FGF1 pourrait suggérer un rôle de ces protéines dans la différenciation, potentiellement *via* leurs interactions avec les protéines du cytosquelette par exemple. La régulation induite par l'étoposide semble être en accord avec le rôle anti-apoptotique de S100A4 et pourrait suggérer une modulation réciproque de S100A4 et p53, dont la balance orienterait le destin de la cellule. Cependant, l'analyse par RT-PCR des transcrits S100A4 (**Figure 40B**) et S100A6 (**Figure 40C**) n'a pu mettre en évidence aucune régulation pour le moment, que ce soit par l'étoposide, ou par le FGF1. Ces résultats doivent être confirmés par de nouvelles expériences, et en particulier pour S100A4 à des temps plus courts.

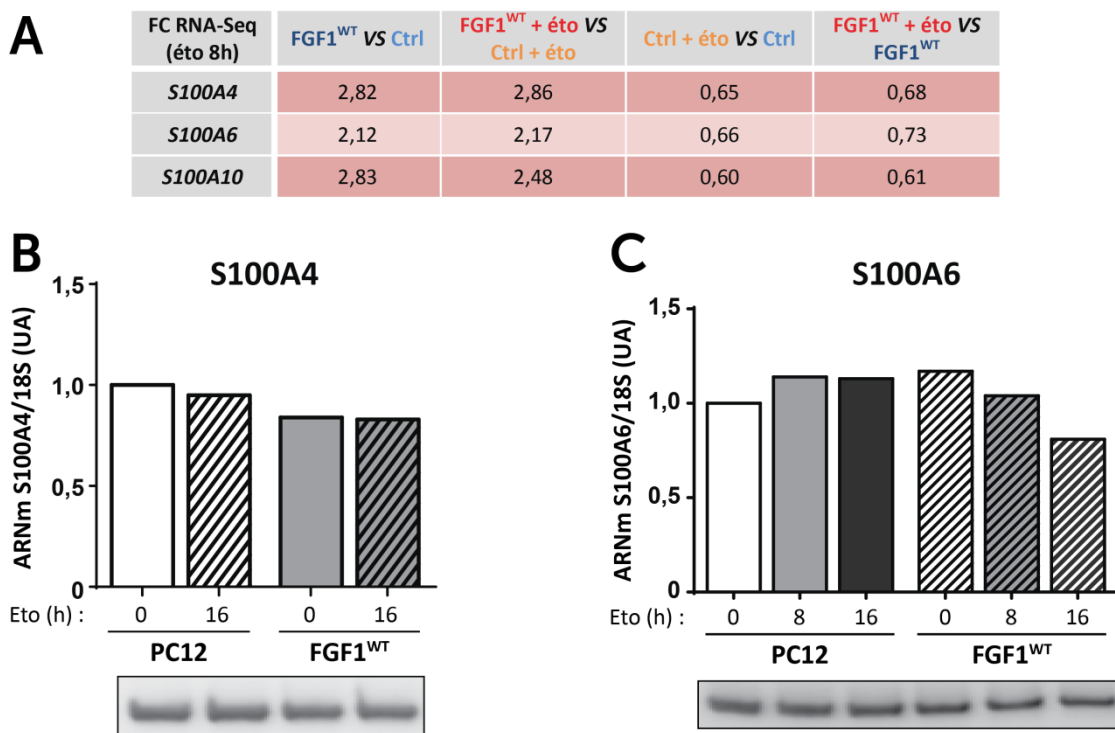


Figure 40 : Analyse par RT-PCR de l'expression de *S100A4* et *S100A6*

A : Rappel des fold-changes (FC) significatifs ($p < 0,01$) obtenus par RNA-Seq. **B** : Quantification des ARNm S100A4 et **C** : S100A6 par RT-PCR dans les cellules PC12 non transfectées et un clone stable surexprimant le FGF1 après 0, 8h ou 16h de traitement par l'étoposide (éto). N = 1, les gels correspondants sont présentés sous les histogrammes.

iii. *Dkk3*

La protéine **Dkk3** (Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3) est un inhibiteur sécrété de la voie Wnt. L'expression de *Dkk3* est réprimée dans un grand nombre de cancers (cancer du poumon, de la prostate, du côlon, du sein, du foie, des testicules...), et de nombreuses études pointent vers un rôle de suppresseur de tumeur de *Dkk3* (Veeck and Dahl, 2012). Cependant, *Dkk3* régule positivement l'angiogenèse et son expression est augmentée dans les vaisseaux sanguins de gliomes, de mélanomes (Untergasser *et al.*, 2007), du cancer gastrique (Mühlmann *et al.*, 2010), de carcinome de la prostate (Zenzmaier *et al.*, 2008) ou de cancer du pancréas (Fong *et al.*, 2009). Dans ce dernier type de cancer, sa surexpression est associée à une amélioration de l'efficacité des chimiothérapies et à un meilleur pronostic de survie (Fong *et al.*, 2009).

Dans notre étude par RNA-Seq, le FGF1 induit une augmentation de l'expression de *Dkk3* (**Figure 41A**), ce qui semble cohérent avec la différenciation induite par le FGF1. Après 8h de traitement, l'étoposide induit une diminution de l'expression de *Dkk3*, ce qui suggèrerait un rôle anti-apoptotique de *Dkk3* dans notre modèle. L'analyse par RT-PCR de *Dkk3* (**Figure 41B**) semble montrer une répression de *Dkk3* par l'étoposide (16h) en absence de FGF1 par rapport au contrôle, ce qui est en accord avec le RNA-Seq, à l'inverse de la légère diminution induite par le FGF1 seul par rapport au contrôle non traité mais qui reste à confirmer. Une étude cinétique plus fine doit être réalisée dans les cellules contrôle et FGF1^{WT} pour confirmer ou infirmer ces résultats.

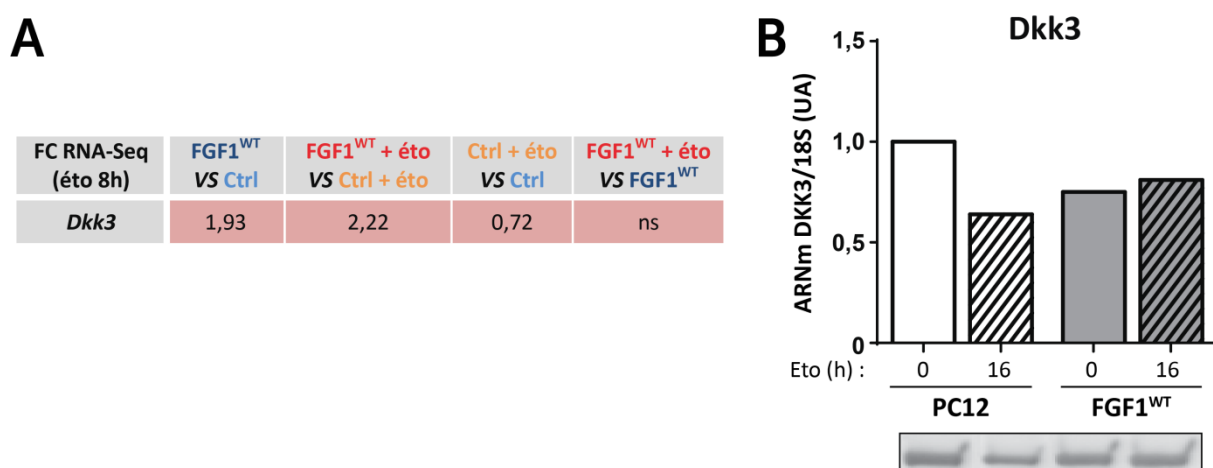


Figure 41 : Analyse par RT-PCR de l'expression de *Dkk3*

A : Rappel des fold-changes (FC) significatifs ($p < 0,01$) obtenus par RNA-Seq (ns : non significatif). **B** : Quantification des ARNm *Dkk3* par RT-PCR dans les cellules PC12 non transfectées et un clone stable surexprimant le FGF1 après 0 ou 16h de traitement par l'étoposide (éto). N = 1, le gel correspondant est présenté sous l'histogramme.

iv. *Serpine1*

Enfin, la **Serpine1** (SERine Proteinase INhibitor E1, ou PAI-1 pour Plasminogen Activator Inhibitor-1) est un inhibiteur de protéase à sérine impliqué dans l'inhibition de la fibrinolyse (processus de dissolution des caillots sanguins). Des rôles pro-angiogénique et anti-apoptotique lui sont attribués, notamment *via* l'inhibition de l'activité protéolytique de la caspase-3 par interaction directe (Chen *et al.*, 2004; Placencio and DeClerck, 2015; Schneider *et al.*, 2008b). La phosphorylation d'Akt est augmentée dans des cellules endothéliales déficientes pour *Serpine1* (*Serpine1*^{-/-}) par rapport aux cellules sauvages et PTEN y est inactivé par phosphorylation, conduisant ainsi à une hyperactivation de la voie PI3K/Akt/mTOR, à une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi qu'à une diminution de l'apoptose induite par la déplétion de sérum (diminution de l'activation des caspases-9 et-3) (Balsara *et al.*, 2006). Dans des cellules, la *serpine1* régule positivement l'apoptose et négativement la prolifération, puisque l'ajout de *serpine1* recombinante inverse ces effets (Balsara *et al.*, 2006). À l'inverse, la déplétion de *Serpine1* par siRNA, KO ou inhibiteurs pharmacologiques dans des lignées cellulaires de fibrosarcome, cancer du poumon, du côlon ou du sein conduit à une augmentation de l'apoptose spontanée. Cette dernière est inhibée par l'ajout de *serpine1* recombinante, d'inhibiteur de caspase-8 ou d'anticorps neutralisant Fas/FasL et dépend ainsi de la voie extrinsèque de l'apoptose (Fang *et al.*, 2012).

Dans notre étude, l'expression de *Serpine1* est augmentée par le FGF1 et diminuée par 8h de traitement par l'étoposide (**Figure 42A**), ce qui suggère un rôle anti-apoptotique de la *serpine1* dans notre modèle. L'analyse par RT-PCR de l'expression de *Serpine1* (**Figure 42B et C**) montre que la surexpression de FGF1 induit l'augmentation du niveau de transcrite par rapport au contrôle non traité. La répression attendue en présence d'étoposide seul par rapport au contrôle non traité ne semble être que transitoire et maximale à 8h, qui était le temps de traitement utilisé pour le RNA-Seq. De façon intéressante, la répression de *BCL-2* et du *FGF1* par p53 est également transitoire et maximale après 6-8h d'activation de p53 dans les cellules REtsAF (Bouleau *et al.*, 2005). Le gène *Serpine1* pourrait ainsi être un gène cible réprimé par p53. La répression de son activité d'inhibiteur de protéase à sérine pourrait permettre l'activation de voies de mort impliquant ces protéases et indépendantes des caspases. La surexpression de FGF1 dans un contexte d'induction de l'apoptose active l'expression de la *Serpine1* par rapport au contrôle traité. Tous ces résultats sont en accord avec le RNA-Seq, et sont conservés dans deux clones indépendants surexprimant une forme taggée V5/His (**Figure 42B**) ou non (**Figure 42A**) du FGF1^{WT}.

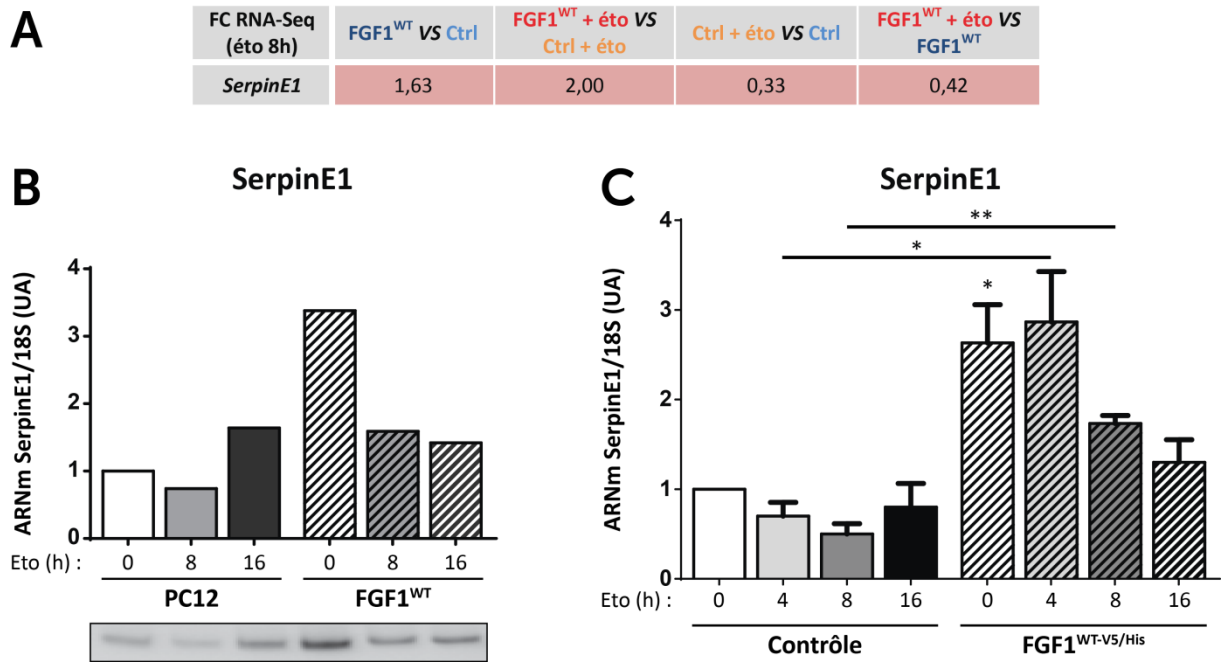


Figure 42 : Analyse par RT-PCR de l'expression de *Serp1E1*

A : Rappel des fold-changes (FC) significatifs ($p < 0,01$) obtenus par RNA-Seq. **B** : Quantification des ARNm *Serp1E1* par RT-PCR dans les cellules PC12 non transfectées et un clone stable surexprimant le FGF1 après 0, 8h ou 16h de traitement par l'étoposide (éto). $N = 1$, le gel correspondant est présenté sous l'histogramme. **C** : Quantification des ARNm *Serp1E1* par RT-PCR dans les cellules Contrôle transfectées par un vecteur vide, ou un clone surexprimant la forme taggée du FGF1^{WT-V5/His}. Les histogrammes représentent les moyennes de trois expériences indépendantes, les barres d'erreur correspondent à la SEM. **: $p \leq 0,01$; * : $p \leq 0,05$.

Cette première approche globale nous a permis d'identifier plusieurs gènes dont l'expression est modulée par le FGF1 en présence d'étoposide. Parmi ceux-ci, les premières études par RT-PCR de l'expression de *Rasip1*, *Serp1E1* ou *Dkk3* ont pu permettre de valider tout ou une partie des résultats obtenus par RNA-Seq. Des analyses de leur expression sur des cinétiques plus fines sont cependant indispensables pour compléter cette étude et éclaircir des régulations qui sont soit absentes (*S100A4* et *S100A6*) ou opposées par RT-PCR vis-à-vis du RNA-Seq.

D'autres comparaisons plus larges peuvent également être effectuées, comme par exemple l'intersection des gènes non régulés par l'étoposide seul (comparaison **2-1**), mais significativement régulés par l'étoposide en présence de FGF1 (comparaison **4-3**). Ces comparaisons doivent être complétées par une analyse des groupes fonctionnels de gènes sur-représentés, et pourront ainsi nous ouvrir de nouvelles pistes d'études.

Gène	Entrez Gene ID	Nom	FC FGF1 ^{WT} VS Ctrl	P	FC FGF1 ^{WT} +éto VS Ctrl +éto	P	FC Ctrl +éto VS Ctrl	P	FC FGF1 ^{WT} +éto VS FGF1 ^{WT}	P
FACTEURS DE TRANSCRIPTION										
<i>Egr1</i>	24330	early growth response 1	6,04	5,08E-29	2,53	9,02E-08	2,34	2,74E-12	1,55	2,06E-01
<i>Egr2</i>	114090	early growth response 2	4,90	1,02E-31	3,74	9,00E-30	2,27	3,29E-06	1,85	3,06E-05
<i>Egr3</i>	25148	early growth response 3	2,77	4,15E-07	1,97	2,61E-04	1,83	3,00E-02	1,41	2,36E-01
<i>Egr4</i>	25129	early growth response 4	0,98	NA	0,99	NA	1,05	NA	1,05	NA
<i>Ets1</i>	24356	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	1,12	4,30E-01	1,14	6,36E-01	1,49	5,15E-04	1,52	6,94E-03
<i>Ets2</i>	304063	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2	1,23	6,91E-04	1,35	1,96E-02	0,83	9,29E-03	0,94	7,30E-01
<i>Etv1</i>	362733	ets variant 1	17,50	6,15E-64	2,42	2,71E-07	1,16	5,89E-01	0,26	3,75E-15
<i>Etv2</i>	361544	ets variant 2	0,82	4,67E-01	0,82	4,91E-01	0,87	6,76E-01	0,74	4,70E-01
<i>Etv3</i>	295297	ets variant 3	1,02	8,52E-01	1,04	9,16E-01	1,58	7,65E-10	1,59	5,45E-05
<i>Etv3l</i>	499651	ets variant 3-like	NA	NA	1,04	NA	1,41	NA	1,56	1,24E-01
<i>Etv4</i>	360635	ets variant 4	5,87	1,04E-203	4,74	2,18E-51	1,10	4,29E-01	1,07	6,97E-01
<i>Etv5</i>	303828	ets variant 5	4,47	4,84E-107	3,93	2,20E-38	0,92	5,73E-01	0,94	7,40E-01
<i>Etv6</i>	312777	ets variant 6	1,05	8,60E-01	1,00	9,99E-01	1,19	4,67E-01	1,12	7,51E-01
<i>Jun</i>	24516	jun proto-oncogene	3,64	3,85E-18	2,58	9,62E-12	0,97	8,73E-01	0,76	4,51E-01
<i>Junb</i>	24517	jun B proto-oncogene	2,21	7,14E-14	2,50	7,97E-22	0,92	2,49E-01	1,07	7,07E-01
<i>Jund</i>	24518	jun D proto-oncogene	1,53	4,34E-11	1,59	5,43E-04	0,94	5,05E-01	1,05	8,23E-01
<i>Fos</i>	314322	FBJ osteosarcoma oncogene	2,32	3,69E-15	1,78	2,41E-04	1,25	1,37E-01	1,06	8,14E-01
<i>Fosb</i>	100360880	FBJ osteosarcoma oncogene B	1,28	2,87E-02	1,64	1,42E-04	1,13	3,35E-01	1,53	3,75E-03
<i>Myc</i>	24577	myelocytomatosis oncogene	0,38	1,66E-06	0,57	2,61E-03	1,14	6,60E-01	1,28	4,24E-01
<i>Mycn</i>	298894	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog	2,01	5,79E-05	1,48	1,04E-01	0,83	5,07E-01	0,74	2,84E-01
<i>Srf</i>	501099	serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor)	0,91	3,76E-01	0,90	6,13E-01	1,55	8,13E-11	1,50	1,22E-03
<i>Hif1a</i>	29560	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	1,38	4,31E-17	1,06	8,33E-01	0,50	1,32E-70	0,40	1,05E-20
<i>Hif3a</i>	64345	hypoxia inducible factor 3, alpha subunit	1,84	5,36E-04	1,17	6,71E-01	0,49	4,48E-03	0,34	5,25E-06
<i>Id1</i>	25261	inhibitor of DNA binding 1	1,22	3,77E-08	1,56	1,60E-06	0,41	1,57E-101	0,55	6,50E-12
<i>Id2</i>	25587	inhibitor of DNA binding 2	0,65	2,84E-16	0,74	8,18E-03	0,92	1,32E-01	1,03	8,58E-01

Gène	Entrez Gene ID	Nom	FC FGF1 ^{WT} VS Ctrl	P	FC FGF1 ^{WT} +éto VS Ctrl +éto	P	FC Ctrl +éto VS Ctrl	P	FC FGF1 ^{WT} +éto VS FGF1 ^{WT}	P
<i>Serpine1</i>	24617	serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1	1,63	7,61E-59	2,00	1,35E-10	0,33	7,85E-18	0,42	1,32E-18
<i>Tp53</i>	24842	tumor protein p53	0,99	9,33E-01	0,87	4,21E-01	1,13	4,93E-02	0,99	9,50E-01
<i>Tp73</i>	362675	tumor protein p73	0,58	3,92E-03	1,11	7,99E-01	2,22	3,94E-08	4,22	1,52E-10
DIFFÉRENCIATION										
<i>Gap43</i>	29423	growth associated protein 43	3,11	8,85E-124	1,96	9,36E-12	0,60	4,13E-16	0,41	3,19E-21
<i>Gfap</i>	24387	glial fibrillary acidic protein	1,00	NA	1,05	NA	1,26	3,85E-01	1,44	2,87E-01
<i>Ncam1</i>	24586	neural cell adhesion molecule 1	1,17	1,83E-02	1,14	5,53E-01	0,83	1,05E-02	0,82	1,51E-01
<i>Ncam2</i>	288280	neural cell adhesion molecule 2	1,12	7,04E-01	1,06	9,03E-01	1,19	6,10E-01	1,16	7,58E-01
<i>Nos1</i>	24598	nitric oxide synthase 1, neuronal	0,62	5,20E-03	0,79	4,49E-01	0,92	6,97E-01	1,14	7,28E-01
<i>Nefh</i>	24587	neurofilament, heavy polypeptide	0,99	9,16E-01	1,05	8,75E-01	1,03	7,81E-01	1,10	NA
<i>Nefl</i>	83613	neurofilament, light polypeptide	1,00	NA	1,23	NA	1,09	NA	1,90	4,93E-02
<i>Nefm</i>	24588	neurofilament, medium polypeptide	3,93	2,28E-57	3,18	1,88E-25	0,32	1,32E-37	0,30	5,52E-01
<i>Th</i>	25085	tyrosine hydroxylase	1,26	1,28E-01	1,30	3,57E-01	0,58	7,69E-04	0,68	4,17E-02
<i>Thy1</i>	24832	Thy-1 cell surface antigen	1,09	5,05E-02	0,99	9,75E-01	0,92	6,42E-02	0,84	3,33E-23
VOIE JAK/STAT										
<i>Jak1</i>	84598	Janus kinase 1	1,71	7,15E-76	1,12	5,22E-01	0,22	0,00E+00	0,15	1,46E-124
<i>Jak2</i>	24514	Janus kinase 2	0,88	8,07E-2	0,83	2,51E-01	0,85	1,70E-02	0,79	7,68E-02
<i>Jak3</i>	25326	Janus kinase 3	0,94	6,96E-01	0,99	9,89E-01	1,63	1,18E-06	1,70	5,12E-04
<i>Tyk2</i>	100361294	Tyrosine kinase 2	1,06	4,60E-01	1,03	9,27E-01	1,10	2,23E-01	1,07	6,74E-01
<i>Stat1</i>	25124	signal transducer and activator of transcription 1	1,12	4,92E-02	1,14	5,02E-01	0,93	2,68E-01	0,97	8,61E-01
<i>Stat2</i>	288774	signal transducer and activator of transcription 2	0,93	1,67E-01	0,80	1,18E-01	0,91	5,35E-02	0,77	2,40E-02
<i>Stat3</i>	25125	signal transducer and activator of transcription 3	0,85	1,24E-03	0,91	6,53E-01	1,00	9,54E-01	1,06	6,76E-01
<i>Stat4</i>	367264	signal transducer and activator of transcription 4	NA	NA	0,98	NA	1,59	4,19E-02	1,50	1,50E-01
<i>Stat5a</i>	24918	signal transducer and activator of transcription 5A	1,18	1,98E-02	1,22	2,31E-01	0,92	3,07E-01	0,96	8,28E-01
<i>Stat5b</i>	25126	signal transducer and activator of transcription 5B	1,25	4,23E-03	1,00	9,96E-01	0,82	3,96E-02	0,66	5,18E-04
<i>Stat6</i>	362896	signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced	1,67	2,07E-07	1,38	1,65E-01	0,67	2,11E-03	0,63	2,65E-02

Gène	Entrez Gene ID	Nom	FC FGF1 ^{WT} VS Ctrl	P	FC FGF1 ^{WT} +éto VS Ctrl +éto	P	FC Ctrl +éto VS Ctrl	P	FC FGF1 ^{WT} +éto VS FGF1 ^{WT}	P
VOIE WNT										
<i>Apc</i>	24205	adenomatous polyposis coli	1,95	1,65E-79	1,12	5,00E-01	0,74	1,81E-13	0,44	3,88E-21
<i>Dkk3</i>	171548	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3	1,93	2,73E-41	2,22	1,93E-18	0,72	4,07E-07	0,88	2,99E-01
<i>Wnt1</i>	24881	wingless-type MMTV integration site family, member 1	0,92	NA	0,97	NA	1,22	NA	1,29	NA
<i>Wnt7a</i>	114850	wingless-type MMTV integration site family, member 7A	0,63	2,45E-02	0,73	2,58E-01	2,36	6,52E-04	3,21	2,40E-04
SIGNALISATION										
<i>Akt3</i>	29414	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3	0,97	7,89E-01	0,99	9,91E-01	0,75	2,05E-04	0,77	4,35E-02
<i>Pik3c2b</i>	289021	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 beta	0,93	4,27E-01	0,97	9,36E-01	1,32	1,13E-04	1,38	7,18E-03
<i>Pik3c3</i>	65052	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit type 3	0,91	2,59E-01	0,97	9,35E-01	1,02	8,09E-01	1,09	6,24E-01
<i>Pik3r1</i>	25513	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)	1,41	1,59E-03	1,27	2,25E-01	1,15	3,15E-01	1,07	7,73E-01
<i>Pik3r3</i>	60664	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)	1,59	7,38E-06	1,35	1,53E-01	0,89	3,83E-01	0,80	2,94E-01
<i>Pik3r5</i>	497931	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5	0,81	3,57E-01	0,99	9,87E-01	2,34	1,18E-07	2,90	1,70E-07
<i>Pten</i>	50557	phosphatase and tensin homolog	0,98	8,19E-01	0,73	6,39E-03	0,73	1,88E-10	0,54	7,65E-11
<i>Rasip1</i>	292912	Ras interacting protein 1	0,66	1,42E-03	0,59	9,54E-05	2,20	9,65E-15	1,83	5,74E-04
<i>S100a4</i>	24615	S100 calcium-binding protein A4	2,82	5,68E-17	2,86	1,58E-22	0,65	4,24E-06	0,68	2,05E-03
<i>S100a6</i>	85247	S100 calcium binding protein A6	2,12	7,88E-74	2,17	2,98E-17	0,66	1,47E-21	0,73	5,63E-03
<i>S100a10</i>	81778	S100 calcium binding protein A10	2,83	3,04E-117	2,48	7,25E-16	0,60	2,42E-19	0,61	2,22E-04
CYTOSQUELETTE										
<i>Anxa1</i>	25380	annexin A1	36,05	4,37E-134	13,62	4,05E-75	0,98	9,56E-01	0,61	6,12E-05
<i>Anxa2</i>	56611	annexin A2	2,04	6,84E-104	1,69	1,26E-07	0,45	1,44E-99	0,40	4,99E-21
<i>Lmna</i>	60374	lamin A/C	1,34	7,01E-14	1,34	5,77E-02	0,51	3,67E-54	0,54	9,43E-07
<i>Lmnb1</i>	116685	lamin B1	0,95	5,97E-01	0,93	8,60E-01	0,66	4,46E-08	0,65	9,82E-03
<i>Lmnb2</i>	299625	lamin B2	0,94	4,34E-01	0,96	9,06E-01	1,04	6,60E-01	1,05	7,88E-01

Gène	Entrez Gene ID	Nom	FC FGF1 ^{WT} VS Ctrl	P	FC FGF1 ^{WT} +éto VS Ctrl +éto	P	FC Ctrl +éto VS Ctrl	P	FC FGF1 ^{WT} +éto VS FGF1 ^{WT}	P
CYCLE CELLULAIRE										
<i>Cdk1</i>	54237	cyclin-dependent kinase 1	1,09	1,71E-01	0,90	7,55E-01	0,50	1,34E-29	0,42	3,48E-11
<i>Cdk2</i>	362817	cyclin dependent kinase 2	0,96	6,26E-01	0,96	8,98E-01	0,85	1,22E-02	0,84	2,64E-01
<i>Cdk4</i>	94201	cyclin-dependent kinase 4	1,03	7,50E-01	1,01	9,80E-01	0,67	3,75E-12	0,67	1,19E-03
<i>Cdk6</i>	114483	cyclin-dependent kinase 6	0,96	8,15E-01	0,91	7,98E-01	0,68	1,68E-03	0,64	1,07E-02
<i>Ccna2</i>	114494	cyclin A2	0,92	3,75E-01	0,83	4,68E-01	0,41	3,95E-28	0,36	2,60E-13
<i>Ccnb1</i>	25203	cyclin B1	1,15	1,09E-01	0,83	5,26E-01	0,34	7,17E-28	0,24	1,42E-25
<i>Ccnd1</i>	58919	cyclin D1	1,25	1,19E-06	1,22	2,13E-01	1,34	6,26E-12	1,34	2,21E-02
<i>Ccnd3</i>	25193	cyclin D3	1,14	1,04E-02	1,05	8,54E-01	0,79	2,04E-05	0,73	2,13E-03
<i>Ccne2</i>	362485	cyclin E2	1,32	5,70E-04	1,20	4,09E-01	0,89	3,01E-01	0,83	2,04E-01
<i>Cdkn1a</i>	114851	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	0,62	5,52E-55	1,25	1,06E-01	1,65	1,76E-56	3,31	7,91E-35
<i>Gadd45a</i>	25112	growth arrest and DNA-damage-inducible, α	4,27	1,36E-62	2,32	1,25E-10	1,56	8,70E-04	0,98	9,43E-01

Tableau 4 : Résultats du RNA-Seq pour une sélection de gènes

Les FC ne sont significatifs que si $P < 0,01$ (ici $P < 1E-02$). Gène réprimé $< FC = 1 <$ gène activé. Les deux premières comparaisons (FC FGF1^{WT} VS Ctrl et FC FGF1^{WT} +éto VS Ctrl +éto) montrent l'effet du FGF1^{WT} en présence ou non d'étoposide sur la régulation génique, tandis que les deux dernières (FC Ctrl +éto VS Ctrl et FC FGF1^{WT} +éto VS FGF1^{WT}) montrent l'effet de l'étoposide seule, ou dans un contexte de surexpression du FGF1^{WT}.

3.2 - Approche gène-candidats : premiers résultats

En plus des gènes précédemment cités issus des listes réduites de gènes dont l'expression est régulée par le FGF1 en présence d'étoposide (« approche globale »), nous avons également choisi de nous intéresser à d'autres gènes candidats, soit parce qu'ils étaient fortement régulés dans certaines conditions, soit à cause de leur implication dans la régulation de la survie ou la différenciation neuronale induite par le FGF1 dans les cellules PC12. Ces gènes peuvent être regroupés d'après leur fonction en sept catégories : les facteurs de transcription, les FGFs, FGFRs et leurs partenaires, la régulation de la survie, la différenciation, les voies de signalisation (JAK/STAT, Wnt, PI3K/Akt/mTOR...), le cytosquelette, le cycle cellulaire.

a) Les facteurs de transcription

Parmi les gènes différentiellement régulés se trouvent un grand nombre de facteurs de transcription. Nous nous sommes intéressés à quatre grandes familles de facteurs de transcription.

La famille de facteurs de transcription **EGR (Early Growth Response)** comprend quatre membres (EGR-1, -2, -3 et -4) dont le plus étudié est EGR-1. EGR-1 a initialement été découvert dans les cellules PC12 dont la différenciation était induite par un traitement au NGF (Milbrandt, 1987). EGR-1 est impliqué dans la croissance et la survie cellulaire, ainsi que dans l'apoptose (Hallahan *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2004; Madden and Rauscher, 1993). Son expression est induite par le FGF1 dans des cellules vasculaires endothéliales ou dans des cellules de ligament parodontal (Delbridge and Khachigian, 1997; Tamura *et al.*, 2008). Dans notre modèle, la surexpression de FGF1 en présence ou non d'étoposide, ainsi que l'étoposide seul, induisent une augmentation du niveau d'ARNm d'EGR-1, -2 et -3, tandis que l'expression d'EGR-4 n'est modifiée dans aucune condition (**Tableau 4**) dans notre étude par RNA-Seq. Ces régulations doivent être étudiées par RT-PCR sur des cinétiques plus fines.

La famille de facteurs de transcription **ETS (E26-Transformation Specific)** comprend 28 membres chez l'Homme. Plus de 700 gènes cibles ont été identifiés à ce jour, impliqués dans une grande variété de processus biologiques comme l'apoptose, la croissance cellulaire ou encore l'angiogenèse (Findlay *et al.*, 2013). La dérégulation des facteurs ETS est également impliquée dans la progression tumorale (Kar and Gutierrez-Hartmann, 2013). Plus particulièrement, les gènes impliqués dans la différenciation neuronale dopaminergique contiennent des motifs conservés qui peuvent être activés par *Etv1* (Flames and Hobert, 2009). Dans notre étude par RNA-Seq (**Figure 43A**), le gène *Etv1* (Ets Variant 1) est l'un des gènes les plus fortement activés par la surexpression de FGF1 (x 17,5) par rapport aux cellules contrôles, tout comme les gènes *Etv4* et *Etv5* dans une moindre mesure (x 5,87 et x 4,47 respectivement). Cette régulation par le FGF1 est conservée pour ces trois gènes en présence d'étoposide par rapport aux cellules contrôle traitées mais avec des amplitudes réduites

(*Etv1* : x 2,42 ; *Etv4* : 4,74 ; *Etv5* : 3,93). L'étoposide seul n'induit globalement pas de régulation majeure des membres de cette famille dans les cellules contrôles. En revanche, dans les cellules surexprimant le FGF1, le traitement par l'étoposide induit la répression d'*Etv1* (x 0,26). L'analyse par RT-PCR de l'expression d'*Etv1* (**Figure 43B et C**) confirment tous ces résultats dans deux clones PC12 indépendants surexprimant le FGF1^{WT} (**Figure 43B**) ou une forme taggée V5/His du FGF1^{WT} (**Figure 43C**), et ce à différents temps de traitement par l'étoposide. Ainsi, la régulation d'*Etv1* induite par le FGF1 semble être liée au processus de différenciation des cellules PC12 en cellules de type neuronal et dopaminergiques.

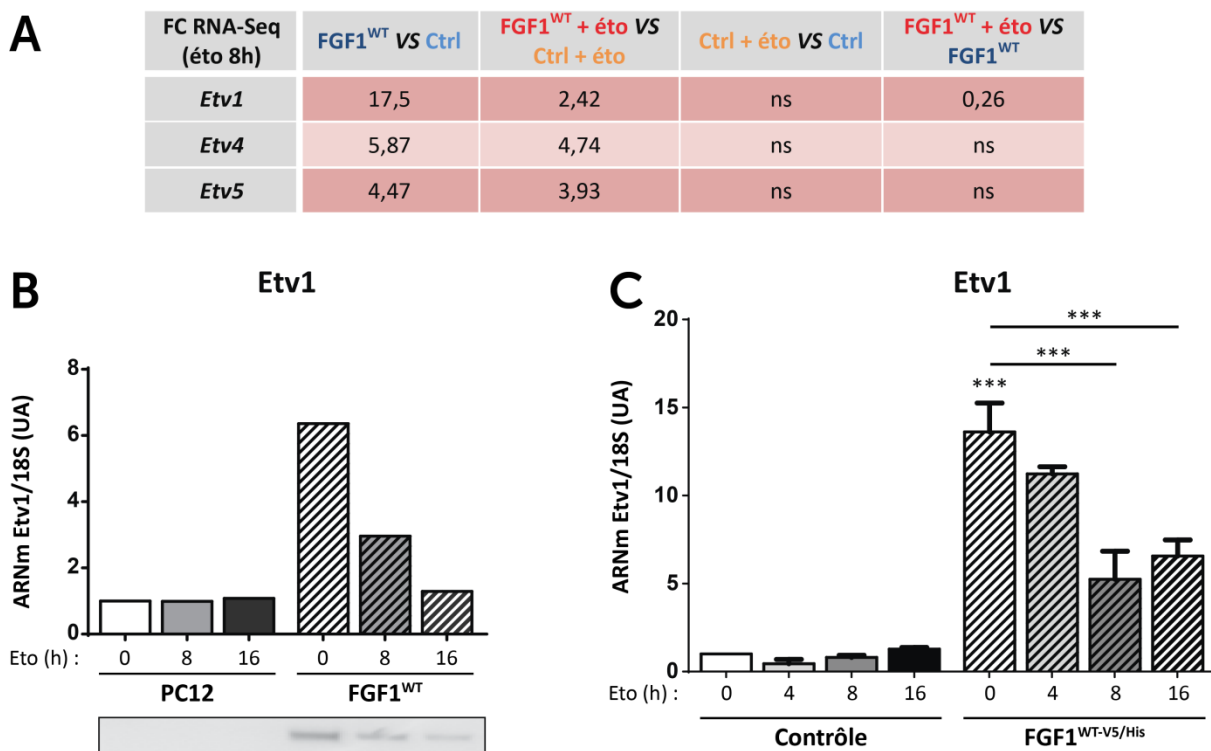


Figure 43 : Analyse par RT-PCR de l'expression d'*Etv1*

A : Rappel des fold-changes (FC) significatifs ($p < 0,01$) obtenus par RNA-Seq (ns : non significatif). **B** : Quantification des ARNm *Etv1* par RT-PCR dans les cellules PC12 non transfectées et un clone stable surexprimant le FGF1 après 0, 8h ou 16h de traitement par l'étoposide (éto). N = 1, le gel correspondant est présenté sous l'histogramme. **C** : Quantification des ARNm *Etv1* par RT-PCR dans les cellules Contrôle transfectées par un vecteur vide, ou un clone surexprimant la forme taggée du FGF1^{WT-V5/His}. Les histogrammes représentent les moyennes de trois expériences indépendantes, les barres d'erreur correspondent à la SEM. *** : $p \leq 0,001$.

Les facteurs **c-Jun** et **c-Fos** s'hétérodimérisent pour former le facteur de transcription AP-1 (Activator Protein-1). AP-1 est notamment impliqué dans la régulation de l'apoptose, la

différenciation et la prolifération cellulaires où il pourrait avoir des effets opposés selon la composition de l'hétérodimère et le contexte cellulaire (Ameyar *et al.*, 2003; Hess, 2004; Shaulian, 2010; Shaulian and Karin, 2002). Dans les cellules PC12, le traitement par NGF ou FGF1 recombinants induit l'augmentation rapide de l'expression de *c-Jun* et *c-Fos* (Lungu *et al.*, 2008; Szeberenyi *et al.*, 1990). Dans notre étude par RNA-Seq, l'expression de *c-Fos*, *c-Jun* principalement ainsi que celle de *JunB* et *JunD* est induite par le FGF1, en présence ou non d'étoposide, tandis que l'ajout d'étoposide n'a pas d'effet significatif sur la régulation de leur expression (**Figure 44A**). L'analyse de l'expression de *c-Jun* par RT-PCR confirme la régulation induite par le FGF1^{WT} (**Figure 44B-C**). L'ajout d'étoposide seul semble très légèrement augmenter l'expression de *c-Jun* par rapport au contrôle non traité, tandis que l'ajout d'étoposide dans des cellules surexprimant le FGF1^{WT} semble induire une diminution de l'expression de *c-Jun*. Ces résultats semblent donc confirmer les régulations de *c-Jun* et *c-Fos* induites par la différenciation dans ces cellules.

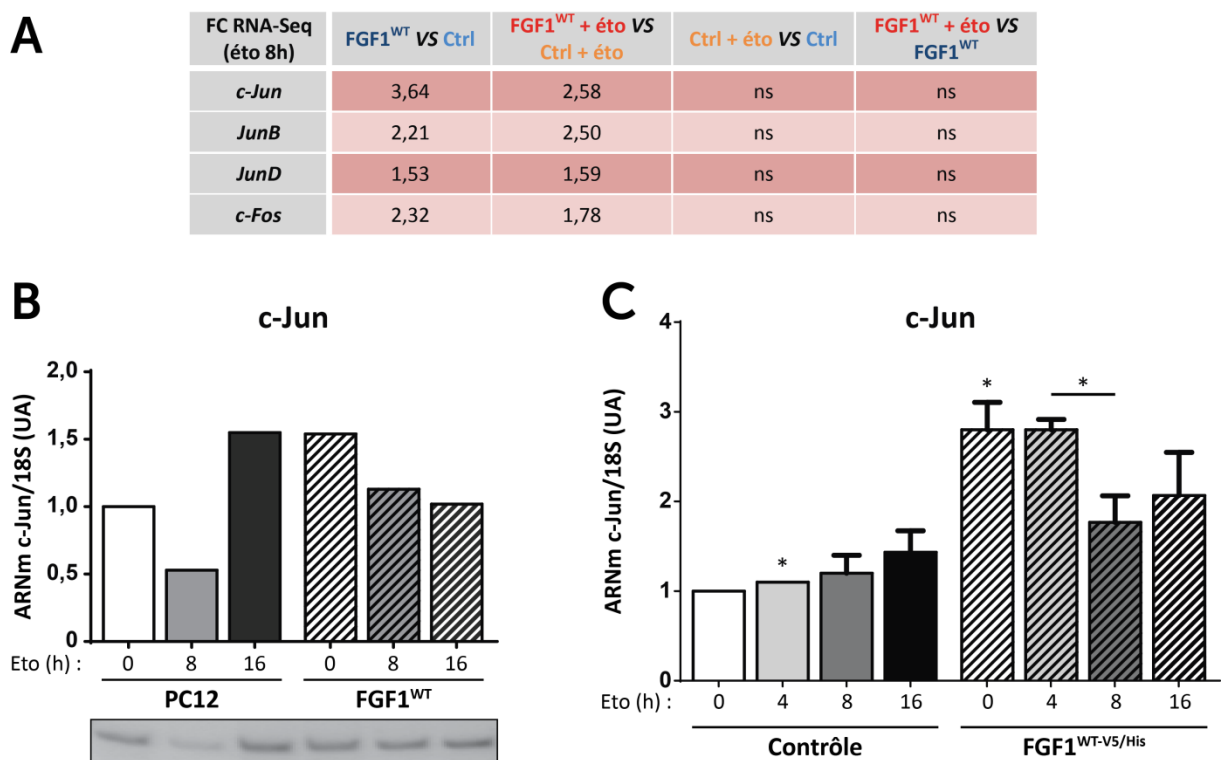


Figure 44 : Analyse par RT-PCR de l'expression de *c-Jun*

A : Rappel des fold-changes (FC) significatifs ($p < 0,01$) obtenus par RNA-Seq (ns : non significatif). **B** : Quantification des ARNm *c-Jun* par RT-PCR dans les cellules PC12 non transfectées et un clone stable surexprimant le FGF1 après 0, 8h ou 16h de traitement par l'étoposide (éto). N = 1, le gel correspondant est présenté sous l'histogramme. **C** : Quantification des ARNm *c-Jun* par RT-PCR dans les cellules Contrôle transfectées par un vecteur vide, ou un clone surexprimant la forme taggée du FGF1^{WT-V5/His}. Les histogrammes représentent les moyennes de trois expériences indépendantes, les barres d'erreur correspondent à la SEM. * : $p \leq 0,05$.

L'expression des facteurs de transcription **HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1)** et en particulier HIF-1 α est activée dans des conditions hypoxiques et régule le métabolisme cellulaire, l'angiogenèse ou la survie (Minet *et al.*, 2000). Dans les cancers humains, l'hypoxie tumorale ou des altérations génétiques induisent la surexpression de HIF-1 α (Semenza, 2003). Dans notre étude par RNA-Seq, le FGF1 induit une augmentation de l'expression de *Hif1a* et *Hif3a* en absence d'étoposide, tandis que l'étoposide seul ou en présence de FGF1 induit une diminution de l'expression de ces gènes. Ces résultats doivent être confirmés par RT-PCR.

Id1 et Id2 font partie de la famille des protéines Id (Inhibitor of DNA Binding ou Inhibitor of Differentiation) qui contient quatre membres. Les protéines Id sont des inhibiteurs de facteurs de transcription et ont notamment été impliquées dans la différenciation ou la tumorigenèse. Elles sont surexprimées dans une vingtaine de types de cancer, et réprimées dans les cellules en différenciation (Wong *et al.*, 2004). Cependant, selon le type cellulaire, des rôles opposés peuvent être retrouvés. Par exemple, *Id2* inhibe la différenciation des lymphocytes B dans la rate (Becker-Herman *et al.*, 2002), mais son expression augmente dans les cellules myéloïdes différenciées (Ishiguro *et al.*, 1996). Dans les cellules PC12, l'expression d'*Id1* est augmentée d'un facteur 7 au cours du processus de différenciation induit par le NGF, puis diminue jusqu'à atteindre un niveau d'expression 3 fois supérieur aux cellules contrôles non traitées après 7 jours de traitement, lorsque les cellules ont atteint un état différencié (Einarson and Chao, 1995). Une autre étude montre des résultats similaires quant à l'expression d'*Id1*, *Id2* et *Id3* dans les cellules PC12 traitées par le NGF, mais sur une cinétique plus courte, où les niveaux d'expression de ces trois gènes atteignent un maximum après environ 2-4h de traitement et diminuent rapidement ensuite (Nagata and Todokoro, 1994). Dans notre étude par RNA-Seq, le FGF1 active l'expression d'*Id1* en présence ou non d'étoposide, mais réprime celle d'*Id2*. L'étoposide seul ou en présence de FGF1 diminue l'expression de *Id1* mais n'a pas d'effet significatif sur *Id2* (**Figure 45A**). L'analyse par RT-PCR de l'expression d'*Id1* semble montrer une légère diminution de son expression après ajout d'étoposide en accord avec le RNA-Seq, en revanche la surexpression de FGF1 ne semble pas avoir d'effet (**Figure 45B**). Les résultats obtenus par RNA-Seq pour *Id1* dans notre modèle semblent être en contradiction avec son rôle connu d'inhibiteur de la différenciation, mais en accord avec les études précédentes sur les cellules PC12. La répression observée lors du traitement par l'étoposide pourrait s'expliquer par la légère dédifférenciation induite par l'étoposide sur ces cellules. Ces résultats doivent être confirmés par RT-PCR sur des cinétiques plus fines.

A

FC RNA-Seq (éto 8h)	FGF1 ^{WT} VS Ctrl	FGF1 ^{WT} + éto VS Ctrl + éto	Ctrl + éto VS Ctrl	FGF1 ^{WT} + éto VS FGF1 ^{WT}
<i>Id1</i>	1,22	1,56	0,41	0,55
<i>Id2</i>	0,65	0,74	ns	ns

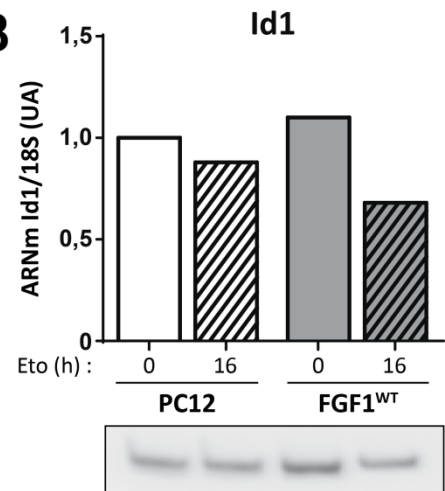
B

Figure 45 : Analyse par RT-PCR de l'expression d'*Id1*

A : Rappel des fold-changes (FC) significatifs ($p < 0,01$) obtenus par RNA-Seq (ns : non significatif). **B** : Quantification des ARNm *Id1* par RT-PCR dans les cellules PC12 non transfectées et un clone stable surexprimant le FGF1 après 0 ou 16h de traitement par l'étoposide (éto). N = 1, le gel correspondant est présenté sous l'histogramme.

b) Les FGFs, FGFRs et leurs partenaires

La surexpression de FGF1 humain induit fortement l'expression du FGF1 endogène murin dans les cellules PC12 (cf. **Premiers résultats** – p. 156), ce qui suggère que le FGF1 est capable de réguler sa propre expression et conforte les résultats précédemment obtenus sur la régulation du FGF1 endogène par le FGF1 recombinant (Renaud *et al.*, 1996b). En revanche, son expression n'est pas modifiée de façon significative après 8h de traitement par l'étoposide, contrairement à la répression observée dans les fibroblastes de rat REtsAF et les cellules de neuroblastome murin N2a après 4h et 16h de traitement respectivement (Bouleau *et al.*, 2005) ou à l'activation induite dans les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y après 16h de traitement (Pirou *et al.*, 2016). Des études cinétiques par RT-PCR réalisées au laboratoire (non publiées) avaient montré que l'étoposide ne régule pas l'expression du FGF1 dans les cellules PC12. La surexpression de FGF1 semble induire une diminution de l'expression du *FGF2* ainsi qu'une augmentation de l'expression du *FGF16*, et l'ajout d'étoposide seul semble réprimer l'expression du *FGF11* et *FGF20*. Aucun autre FGF n'est régulé de façon significative par le FGF1 ou l'étoposide.

Dans notre étude par RNA-Seq, l'expression du *FGFR1* est augmentée par l'ajout d'étoposide seul. RSK1 est associé en complexe avec CBP dans les cellules en prolifération, tandis qu'il interagit avec le FGFR1 dans les cellules en prolifération. Dans notre étude, le traitement par l'étoposide induit l'augmentation de l'expression de *RSK1*, or l'étoposide induit une légère dédifférenciation des

cellules PC12. On pourrait donc imaginer que cette augmentation des niveaux de FGFR1 et RSK1 en présence d'étoposide déplace l'équilibre au détriment du programme de différenciation. Parmi les autres récepteurs de facteurs de croissance, on peut noter que l'expression du NGFR de basse affinité p75NTR (*Ngfr*) est augmentée par la surexpression de FGF1 en présence ou non d'étoposide, et diminuée par l'ajout d'étoposide seul. En revanche l'expression du NGFR de haute affinité TrkA (*Ntrk1*) n'est pas significativement modifiée.

Parmi les partenaires du FGF1, l'expression de la nucléoline (*Ncl*) qui régule positivement la phosphorylation du FGF1 (recombinant internalisé) dans le noyau par la PKC δ et son export vers le cytosol (Sletten *et al.*, 2014), est diminuée par la surexpression du FGF1 seul dans notre étude. Ainsi, la surexpression du FGF1 pourrait induire son accumulation nucléaire en déplaçant l'équilibre vers une absence de phosphorylation. Cependant, aucune modification de la localisation nucléaire du FGF1 n'a été détectée en fonction de l'état phosphorylé ou non du FGF1 dans les cellules PC12. Par contre, la phosphorylation du FGF1 régule son activité anti-apoptotique dans les cellules PC12 et SH-SY5Y (Delmas *et al.*, 2016; Pirou *et al.*, 2016). Cette régulation de l'expression de la nucléoline est donc intéressante et en accord avec nos résultats précédents, elle suggère que cela pourrait augmenter l'activité anti-apoptotique du FGF1.

L'interaction du FGF1 avec la kinase CK2 corrèle avec son activité mitogénique (Skjerpen *et al.*, 2002b). La protéine CK2 est constituée d'un hétérotétramère de deux chaînes α et deux chaînes β . Dans notre étude par RNA-Seq et de façon surprenante, celles-ci semblent être régulées de façon opposée par l'étoposide, qui induit une augmentation de l'expression de la chaîne β et une répression de la chaîne α .

c) La régulation de la survie

L'expression de *p53* n'est pas modifiée, en revanche l'expression de *p73* est diminuée par la surexpression du FGF1 et augmentée par le traitement à l'étoposide, ce qui est cohérent avec le fait que *p73* soit une cible transcriptionnelle de *p53* d'une part, et que son expression soit transcriptionnellement régulée par l'induction de dommages à l'ADN (Chen *et al.*, 2001). Parmi les gènes cibles de *p53*, l'expression de *PUMA* (*Bbc3*) est diminuée par la surexpression de FGF1 en présence ou non d'étoposide, et augmentée par l'ajout d'étoposide dans des cellules surexprimant ou non le FGF1. En revanche l'expression de *NOXA* (*Pmaip1*) n'est pas modifiée. L'expression d'autres BH3-only comme *BAD*, *BID* et *BIK* n'est pas modifiée dans nos conditions, excepté pour *BAD* dont l'expression est augmentée par l'ajout d'étoposide seul. L'expression de *MDM2* est augmentée par l'ajout d'étoposide dans des cellules surexprimant le FGF1, ce qui est cohérent avec son rôle d'inhibiteur de *p53* et avec les précédents résultats du laboratoire obtenus dans les fibroblastes de

rat REtsAF (Bouleau *et al.*, 2005). En revanche nous n'observons pas d'augmentation significative de son expression suite au traitement par l'étoposide. Même si cette augmentation est maximale après 16h de traitement à l'étoposide dans les cellules PC12 (Bouleau *et al.*, 2007) et que nous ne sommes ici qu'à 8h d'induction de p53, elle est normalement visible dès 4h et nous ne nous expliquons pas cette incohérence. D'autre part, nous n'avions précédemment pas observé de régulation de l'expression de *MDM2* après 24h de traitement par le rFGF1 extracellulaire dans les cellules PC12 (Bouleau *et al.*, 2007), cependant la surexpression de FGF1 intracellulaire induit une forte répression de l'expression de *MDM2* dans notre étude. Les résultats obtenus par RNA-Seq pour les régulations de l'expression de *MDM2* sont en désaccord avec nos précédentes études (Bouleau *et al.*, 2005, 2007) et nous n'avons pour l'instant aucune explication pour ces résultats surprenants.

L'expression des membres anti-apoptotiques comme *BCL-2* ou *BCL-x_L* n'est pas régulée dans nos conditions, à l'exception de la diminution de l'expression de *BCL-x_L* induite par l'ajout d'étoposide dans des cellules surexprimant le FGF1.

Parmi les effecteurs de l'apoptose, l'expression de *BAK* n'est pas modifiée dans nos conditions. L'expression de *BAX* et *BOK* est diminuée par la surexpression de FGF1 seule, et de façon surprenante l'expression de *BOK* est diminuée par l'ajout d'étoposide seul. La diminution de la transactivation de *BAX* par p53 dans un contexte de surexpression du FGF1 avait déjà été observée dans un autre type cellulaire de rat, les fibroblastes REtsAF (Bouleau *et al.*, 2005).

Les régulations observées sont globalement en accord avec les rôles pro- ou anti-apoptotiques des gènes étudiés. L'absence de modifications d'expression de régulateurs majeurs comme par exemple *BCL-2* ou *NOXA* peut s'expliquer par le temps de traitement choisi (8h d'étoposide), et nécessite l'étude de leur expression à des temps différents, à l'aide d'une cinétique plus fine.

d) La différenciation

La surexpression de FGF1^{WT} dans les cellules PC12 induit leur différenciation en cellules neuronales de type sympathique. GAP43 (Growth Associated Protein 43) est une protéine axonale, marqueur de la différenciation neuronale en général, et des cellules PC12 en particulier (Costello *et al.*, 1990; Yankner *et al.*, 1990). Dans notre étude par RNA-Seq, son expression est augmentée par la surexpression de FGF1, et diminuée par l'ajout d'étoposide, de la même façon que l'expression du neurofilament (NF) de 160 kDa (medium, *Nefm*) (**Figure 46A**), ce qui corrèle avec le phénotype différencié induit par le FGF1 et la légère dédifférenciation induite par l'ajout d'étoposide. L'analyse par RT-PCR de l'expression de GAP43 (**Figure 46B**) est en accord avec la régulation induite par l'étoposide. En revanche et de façon surprenante, la surexpression du FGF1^{WT} semble au contraire

induire une diminution de son expression, tout comme pour NF-160 kDa (**Figure 46C**). Ces résultats doivent être confirmés par des cinétiques plus fines.

NOS1 (Nitric Oxide Synthase 1 ou nNOS pour neuronal NOS) est requis pour la croissance neuritique des cellules PC12 (Phung *et al.*, 1999), or dans notre étude son expression semble diminuée par la surexpression de FGF1. En revanche, l'expression de *GFAP* (marqueur de différenciation gliale), des *NCAM1-2* (Neural Cell Adhesion Molecule), des neurofilaments légers et lourds (*Nefl* et *Nefh*, respectivement 70 kDa et 200 kDa) et de *Thy1* (THYmocyte differentiation antigen 1, marqueur de différenciation neuronal) n'est pas modifiée dans nos conditions.

Dans notre étude par RNA-Seq ou RT-PCR, l'expression du FGF1 est induite pendant 48h avant le traitement par l'étoposide ainsi qu'au cours de celui-ci. Les cellules présentent alors des extensions neuritiques qui commencent à s'établir en réseau. Cependant la différenciation maximale des clones surexprimant le FGF1 est atteinte au bout de cinq jours de surexpression du FGF1, il serait alors intéressant d'étudier l'expression de ces différents marqueurs de différenciation tout au long de cette cinétique, certains ne s'exprimant qu'après différenciation terminale.

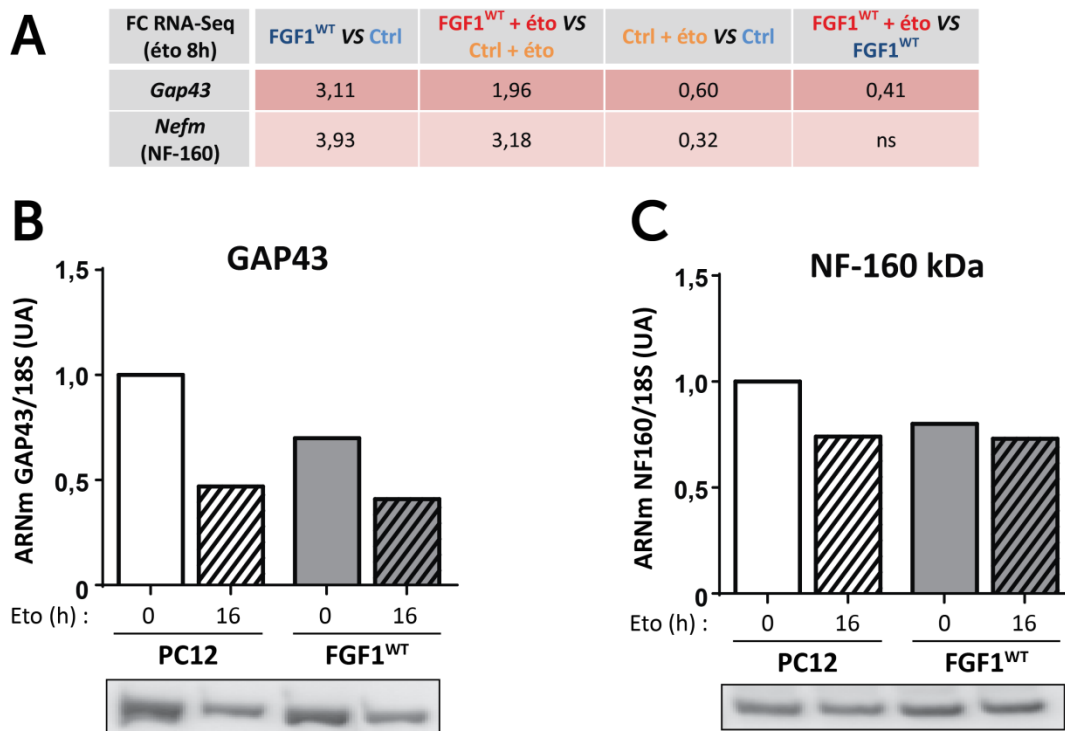


Figure 46 : Analyse par RT-PCR de l'expression de GAP43 et NF-160 kDa

A : Rappel des fold-changes (FC) significatifs ($p < 0,01$) obtenus par RNA-Seq (ns : non significatif). **B** : Quantification des ARNm GAP43 et **C** : de NF-160 par RT-PCR dans les cellules PC12 non transfectées et un clone stable surexprimant le FGF1 après 0 ou 16h de traitement par l'étoposide (éto). N = 1, les gels correspondants sont présentés sous les histogrammes.

e) La voie de signalisation JAK/STAT

La voie de signalisation JAK/STAT implique la famille des kinases JAK (Janus Kinase) qui comprend quatre membres chez les mammifères (JAK1-3 et TYK2 pour Tyrosine Kinase 2), et la famille des facteurs de transcription STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) comprenant sept membres chez les mammifères (STAT1-4, STAT5A, STAT5B et STAT6). Les kinases JAKs sont activées suite à la liaison de cytokines ou facteurs de croissance à leurs récepteurs membranaires et phosphorylent les STATs cytoplasmiques, induisant leur translocation au noyau sous forme de dimères. Les dimères de STATs nucléaires se lient à leurs séquences cibles et vont activer ou réprimer l'expression d'un grand nombre de gènes cibles, et ainsi réguler la prolifération, la différenciation, la survie cellulaires ou encore l'apoptose (Harrison, 2012; Rawlings *et al.*, 2004). La phosphorylation constitutive des STATs est une caractéristique d'un grand nombre de lignées cellulaires cancéreuses humaines ou de tumeurs primaires, et la suractivation des JAKs a également été impliquée dans la tumorigenèse (Pesu *et al.*, 2008; Yu and Jove, 2004). Les kinases JAK1, JAK2 et TYK2 médient l'effet chimioprotecteur du FGF2 vis-à-vis du cisplatine dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome, indépendamment de STAT1, STAT3 ou STAT5A/B (Carmo *et al.*, 2011).

Dans notre étude par RNA-Seq, la surexpression seule de FGF1 semble activer l'expression de *Jak1*, *Stat5b* et *Stat6*. L'étoposide seul diminue l'expression de *Stat6* mais active celle de *Jak3*. L'ajout d'étoposide dans des cellules surexprimant le FGF1 diminue fortement l'expression de *Jak1* et augmente celle de *Jak3* (**Figure 47A**). L'expression des autres membres de la voie ne semble pas être significativement régulée. L'analyse par RT-PCR de l'expression de *Jak1* sur des cinétiques plus étendues confirme la répression de *Jak1* induite par l'étoposide dans les cellules surexprimant le FGF1, ainsi que dans les cellules contrôle (non significatif dans le RNA-Seq), et ce dans deux clones indépendants surexprimant une forme taggée ou non du FGF1^{WT} (**Figures 47B et C**). L'augmentation de l'expression de *Jak1* par la surexpression du FGF1 n'était en revanche pas suffisamment marquée dans toutes les séries pour être significative, ces expériences demandent donc à être répétées. Il serait également intéressant de vérifier l'activation des différents membres de cette voie en analysant leur phosphorylation par Western-blot.

A

FC RNA-Seq (éto 8h)	FGF1 ^{WT} VS Ctrl	FGF1 ^{WT} + éto VS Ctrl + éto	Ctrl + éto VS Ctrl	FGF1 ^{WT} + éto VS FGF1 ^{WT}
<i>Jak1</i>	1,71	ns	ns	0,15
<i>Jak3</i>	ns	ns	1,63	1,70
<i>Stat3</i>	0,85	ns	ns	ns
<i>Stat5b</i>	1,25	ns	ns	0,66
<i>Stat6</i>	1,67	ns	0,67	ns

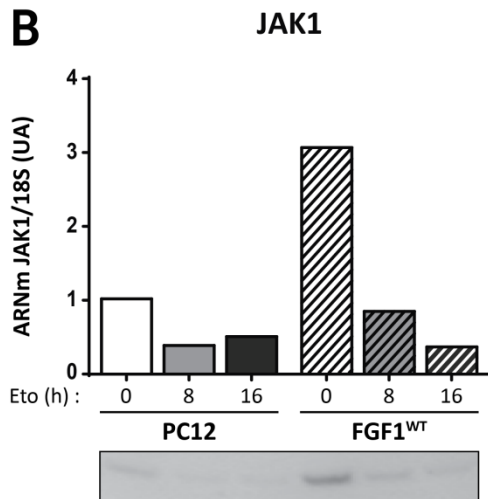
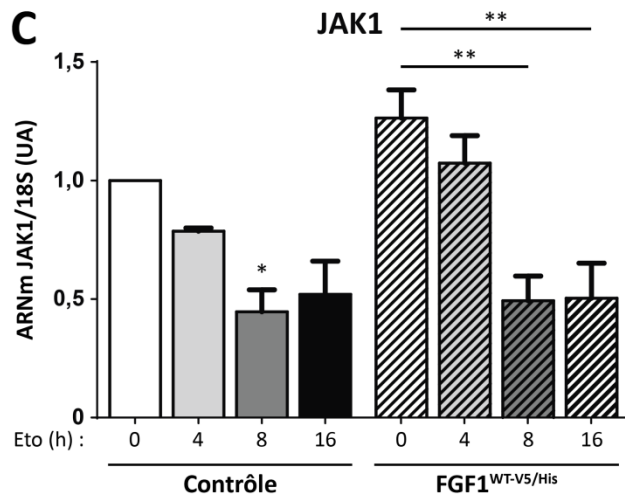
B**C**

Figure 47 : Analyse par RT-PCR de l'expression de JAK1

A : Rappel des fold-changes (FC) significatifs ($p < 0,01$) obtenus par RNA-Seq (ns : non significatif). **B** : Quantification des ARNm JAK1 par RT-PCR dans les cellules PC12 non transfectées et un clone stable surexprimant le FGF1 après 0, 8h ou 16h de traitement par l'étoposide (éto). $N = 1$, le gel correspondant est présenté sous l'histogramme. **C** : Quantification des ARNm JAK1 par RT-PCR dans les cellules Contrôle transfectées par un vecteur vide, ou un clone surexprimant la forme taggée du FGF1^{WT-V5/His}. Les histogrammes représentent les moyennes de trois expériences indépendantes, les barres d'erreur correspondent à la SEM. **: $p \leq 0,01$; * : $p \leq 0,05$.

f) La voie de signalisation Wnt

La voie de signalisation Wnt est impliquée dans le développement embryonnaire, et des altérations de cette voie sont corrélées à la tumorigenèse (Anastas and Moon, 2012). Dans la voie canonique, la liaison du ligand Wnt à ses récepteurs membranaires (familles Frizzled et LRP, pour Lipoprotein Receptor-related Protein) induit l'accumulation cytosolique puis la translocation nucléaire de la β -caténine qui joue alors un rôle de co-facteur auprès des facteurs de transcription TCF/LEF (T-Cell Factor/Lymphoid Enhancing Factor). La protéine APC (Adenomatosis Polyposis Coli) fait partie du complexe de dégradation de la β -caténine, activé en absence de liaison de Wnt à ses récepteurs. Dans notre étude, l'expression d'APC est augmentée par la surexpression du FGF1, et diminuée par l'ajout d'étoposide dans des cellules surexprimant ou non le FGF1. L'expression du ligand Wnt7a est augmentée par l'ajout d'étoposide dans des cellules surexprimant ou non le FGF1,

mais n'est pas modifiée par la surexpression du FGF1. Dans les cellules PC12, il a été montré que Wnt1 pouvait inhiber la différenciation induite par le NGF (Chou *et al.*, 2000; Shackelford *et al.*, 1993), cependant son expression n'est pas régulée dans notre modèle. Pour rappel, l'inhibiteur de la voie Wnt *Dkk3* fait partie des gènes identifiés par l'approche globale et dont l'expression est positivement régulée par le FGF1^{WT} en présence d'étoposide (cf. *Dkk3* – p. 165). Il serait intéressant de vérifier l'activation ou l'inactivation de cette voie en transfectant un gène-rapporteur de TCF (TOPFLASH, (Korinek, 1997)) dans les cellules PC12 traitées ou non par l'étoposide et surexprimant ou non le FGF1 et en analysant la production de luciférase.

g) La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR

La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR est un régulateur important de la survie cellulaire, par exemple dans les neuroblastomes (cf. *L'inhibition de la voie de survie PI3K/Akt/mTOR* – p. 86). Les kinases PI3K sont subdivisées en trois classes I, II et III. Les PI3K de la classe I sont des dimères comportant une sous-unité catalytique ainsi qu'une sous-unité régulatrice, tandis que les PI3K de la classe II moins connues sont des monomères dépourvus de sous-unité régulatrice, et que la classe III ne comporte qu'un seul membre (Thorpe *et al.*, 2014). Dans notre étude par RNA-Seq, l'expression de la PI3K de classe III (*Pik3c3*) n'est pas régulée, tandis que l'étoposide induit l'augmentation de l'expression de la kinase de classe II PI3K-C2 β (*Pik3c2b*) ainsi que de la sous-unité régulatrice (*Pik3r5*) de la kinase de classe IB. La surexpression du FGF1 induit l'augmentation de l'expression des sous-unités régulatrices des kinases α et γ de la classe IA (respectivement *Pik3r1* et *Pik3r3*). Parmi les trois membres de la famille de la kinase Akt (*Akt1-3*), seule l'expression d'*Akt3* est diminuée par l'ajout d'étoposide, tandis que celle des deux autres membres n'est pas modifiée. L'expression de l'oncosuppresseur *PTEN*, régulateur négatif de la voie de survie PI3K/Akt, n'est pas modifiée par la surexpression de FGF1 mais est diminuée par l'ajout d'étoposide dans des cellules surexprimant ou non le FGF1. Les régulations transcriptionnelles induites par l'étoposide ou le FGF1 observées pour PI3K, Akt et PTEN doivent être vérifiées par RT-PCR. Cependant il semble nécessaire d'analyser l'état d'activation des différents acteurs de cette voie par Western-blot afin de vérifier s'ils corrélerent avec les régulations transcriptionnelles observées.

h) Le cytosquelette

Les lamines A/C, B1 et B2 participent à la structure de l'enveloppe nucléaire. Leur expression peut être altérée dans certains types de cancers (Chow *et al.*, 2012). La surexpression des lamines A/C est par exemple un biomarqueur de risque dans le cancer colorectal (Willis *et al.*, 2008), et ont été identifiées comme partenaires potentiels du FGF1 (Bober *et al.*, 2016). Dans notre modèle, la surexpression du FGF1 induit l'augmentation de l'expression des lamines A/C. L'ajout d'étoposide

dans des cellules surexprimant ou non le FGF1 induit la diminution de l'expression des lamines A/C et B1, tandis que l'expression des lamines B2 n'est pas modifiée.

Les annexines sont des protéines majoritairement cytosoliques existant sous forme soluble ou associées avec une grande variété de partenaires comme des protéines du cytosquelette ou médiant l'interaction cellule-matrice extracellulaire, et sont régulées par le Ca^{2+} (Moss and Morgan, 2004). *Anxa1* (pour Annexine A1) est un gène dont l'expression est dérégulée dans un grand nombre de cancers, pouvant agir comme oncosuppresseur ou oncogène selon les types cellulaires considérés (Guo *et al.*, 2013). L'annexine II (*Anxa2*) est impliquée dans le complexe de sécrétion atypique du FGF1 (Prudovsky *et al.*, 2013), dans la régulation de la signalisation du récepteur à l'EGF et de son trafic intracellulaire (Grewal and Enrich, 2009). Dans les cellules PC12, son expression est augmentée après 8h de traitement par le NGF (Akiyama *et al.*, 2006).

Dans notre étude, l'expression d'*Anxa2* est augmentée en présence de FGF1 et diminuée par l'ajout d'étoposide en présence de FGF1 (**Figure 48A**). L'expression de l'annexine I (*Anxa1*) est l'une des plus fortement augmentée par la surexpression de FGF1, avec ou sans étoposide, et est diminuée par l'ajout d'étoposide dans un contexte de surexpression du FGF1 (**Figure 48A**). De façon surprenante, l'analyse de l'expression de l'annexine I par RT-PCR est en forte contradiction avec ces résultats : la surexpression de FGF1^{WT} induit au contraire une forte diminution de l'expression d'*Anxa1* (**Figure 48B**). De nouvelles analyses de l'expression d'*Anxa1* sont nécessaires afin de pouvoir trancher sur sa régulation, à l'aide d'une cinétique plus fine. Il faudra également vérifier si les reads identifiés comme correspondants à *Anxa1* dans le RNA-Seq sont répartis de façon homogène sur la séquence du gène et si la séquence amplifiée par RT-PCR suit la tendance de l'ensemble des reads attribués à *Anxa1*. Si ce n'est pas le cas, les différences observées pourraient alors être expliquées par un épissage alternatif qui n'avait pas été décrit.

A

FC RNA-Seq (éto 8h)	FGF1 ^{WT} VS Ctrl	FGF1 ^{WT} + éto VS Ctrl + éto	Ctrl + éto VS Ctrl	FGF1 ^{WT} + éto VS FGF1 ^{WT}
<i>Anxa1</i>	36,05	13,62	ns	0,61
<i>Anxa2</i>	2,04	1,69	0,45	0,40

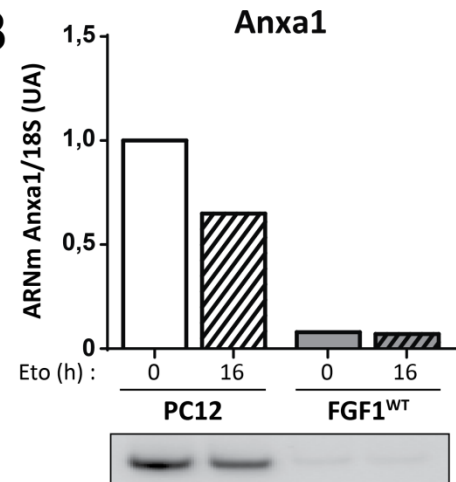
B

Figure 48 : Analyse par RT-PCR de l'expression d'*Anxa1*

A : Rappel des fold-changes (FC) significatifs ($p < 0,01$) obtenus par RNA-Seq (ns : non significatif). **B** : Quantification des ARNm *Anxa1* par RT-PCR dans les cellules PC12 non transfectées et un clone stable surexprimant le FGF1 après 0 ou 16h de traitement par l'étoposide (éto). N = 1, le gel correspondant est présenté sous l'histogramme.

i) Le cycle cellulaire

p53 régule le cycle cellulaire en activant l'expression de *p21* (*Cdkn1a*). Dans notre étude par RNA-Seq, l'expression de *p21* est diminuée par la surexpression de FGF1 seule, et augmentée par l'ajout d'étoposide dans des cellules surexprimant ou non le FGF1. La régulation des ARNm *p21* par l'étoposide seul avait déjà été caractérisée à 8h dans les cellules REtsAF et les cellules PC12, et est cohérente avec le fait que *p21* est un gène cible de p53. Par contre, la surexpression du FGF1 ne semblait pas réguler cette transactivation et aucune régulation par le FGF1 seul n'avait été précédemment montrée (Bouleau *et al.*, 2005; Delmas *et al.*, 2016). Ces régulations doivent être vérifiées par RT-PCR sur différentes cinétiques (courtes et longues).

La progression dans le cycle cellulaire est régulée par les complexes cyclines/CDK. Dans les cellules PC12, le traitement par le NGF induit une diminution du niveau protéique des CDK1, 2, 4 et 6 ainsi que de la cycline B1, et une augmentation du niveau protéique de la cycline D1 (Yan and Ziff, 1995). Dans notre étude par RNA-Seq, le FGF1 induit l'augmentation de l'expression des cyclines D1 et E2. L'activation de p53 par ajout d'étoposide induit la diminution de l'expression des CDK1, 4 et 6 et des cyclines A2, B1 et D3 ainsi que l'augmentation de l'expression de la cycline D1.

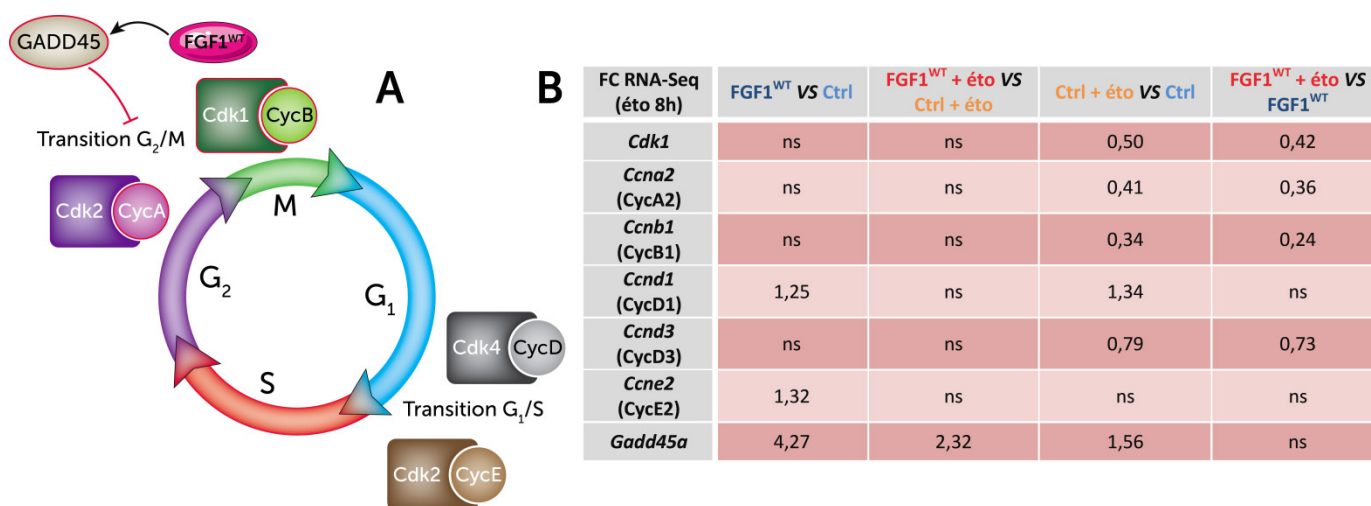


Figure 49 : Modifications transcriptionnelles des acteurs du cycle cellulaire

A : Les complexes CDK4/Cycline D et CDK2/Cycline E régulent la transition G₁/S. Les complexes CDK1/Cycline B et CDK2/Cycline A régulent la transition G₂/M, cette dernière est également inhibée par GADD45. **B :** Rappel des fold-changes (FC) significatifs ($p < 0,01$) obtenus par RNA-Seq (ns : non significatif). Les protéines codées par les gènes les plus fortement régulés (*Gadd45*, *Cdk1*, *CycA2* et *CycB1*) sont encadrées en rouge en A.

Les régulations les plus importantes sont observées pour *Cdk1*, *CycA2* et *CycB1* (**Figure 49A et B, encadrés en rouge**), dont l'expression est fortement diminuée en présence d'étoposide. Ces gènes sont impliqués dans la transition G₂/M (**Figure 49A**), ce qui suggère que dans les cellules PC12, l'ajout d'étoposide induirait un arrêt du cycle en phase G₂/M. Cela est corrélé à l'augmentation de l'expression de *Gadd45*, cible transcriptionnelle de p53, observée lors de l'activation de p53 par l'ajout d'étoposide. GADD45 induit l'arrêt du cycle en phase G₂/M (Wang *et al.*, 1999; Zhan *et al.*, 1999). De façon intéressante, le FGF1 induit une augmentation plus importante que l'étoposide de l'expression de *Gadd45*, suggérant que le FGF1 provoque un arrêt en phase G₂/M pour sortir les cellules du cycle cellulaire et entrer en différenciation (**Figure 49A et B**). Il serait très intéressant d'étudier le cycle cellulaire dans les cellules PC12, malheureusement le phénotype de différenciation induit par le FGF1 rend impossible leur analyse par cytométrie en flux. Si des régulations semblables sont retrouvées dans les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y, nous pourrions alors les vérifier par cytométrie en flux.

En conclusion, notre étude par RNA-Seq semble confirmer les régulations par le FGF1 de l'expression de facteurs de transcription comme EGR-1 ou Jun/Fos précédemment décrites dans d'autres types cellulaires. Elle nous permet également de nous intéresser par exemple aux voies JAK/STAT ou Wnt dont la régulation par le FGF1 est très peu décrite, et encore moins par le FGF1 intracellulaire donc indépendamment de la voie de signalisation des FGFRs. Nous pourrions

également nous intéresser aux protéines nucléaires dont l'expression est régulée par le FGF1 et/ou l'étoposide. En effet l'activité anti-apoptotique du FGF1 requiert sa nucléarisation, c'est la raison pour laquelle nous nous sommes notamment intéressés aux familles de facteurs de transcription. Notre étude ne nous permet pas de dire si les régulations induites par le FGF1 sont directes ou non puisque nous avons utilisé un temps d'induction du FGF1 long (56h), mais nous pourrions faire des études cinétiques plus fines grâce au promoteur inductible à la dexaméthasone. Nous n'avons toutefois pas pu identifier beaucoup de régulations transcriptionnelles associées à la différenciation, ce qui peut s'expliquer par un temps d'induction de l'expression du FGF1 court relativement au processus de différenciation. L'étude de ces marqueurs devra se faire à des temps plus longs (5 jours ou plus) afin de pouvoir observer les régulations de marqueurs n'apparaissant qu'après différenciation terminale par exemple.

Discussion

I Activités intracellulaires des différentes formes mutantes du FGF1

Les différentes équipes ayant étudié les activités du FGF1 se sont essentiellement intéressées au FGF1 recombinant (rFGF1) extracellulaire, dont l'activité est médiée par la voie des récepteurs FGFRs ou bien par son internalisation *via* les FGFRs. En revanche, les activités du FGF1 intracellulaire et donc indépendantes des FGFRs sont très peu décrites, bien qu'il s'agisse vraisemblablement de son mécanisme d'action majoritaire puisqu'il n'est sécrété que dans des conditions de stress bien particulières (hypoxie, choc thermique...).

Le laboratoire s'intéresse aux activités et mécanismes d'action du FGF1 intracellulaire depuis plusieurs années, et en particulier à ses interactions avec la voie intrinsèque de l'apoptose médiée par l'oncosuppresseur p53 suite par exemple à l'induction de dommages à l'ADN. En effet, le FGF1 est un oncogène qui est impliqué dans la régulation de processus biologiques comme l'angiogenèse, la différenciation cellulaire, la prolifération cellulaire ou la régulation de la survie. Notre équipe a pu montrer que le rFGF1 extracellulaire ainsi que le FGF1 intracellulaire possédaient des activités neurotrophique et anti-apoptotique vis-à-vis de l'apoptose dépendante de p53 dans deux modèles cellulaires de rat, des fibroblastes (cellules REtsAF) et des cellules de type neuronal (cellules PC12) (Bouleau *et al.*, 2005, 2007; Renaud *et al.*, 1996b). Dans les cellules PC12, l'activité neurotrophique du rFGF1 extracellulaire dépend de l'induction de l'expression du *FGF1* endogène (Renaud *et al.*, 1996b), et les activités neurotrophique et anti-apoptotique du FGF1 intracellulaire requièrent sa nucléarisation (Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009). Les mécanismes d'action du FGF1 intracellulaire ne sont pas connus. Or la phosphorylation du FGF1 sur son résidu Ser130 par la PKC δ a lieu dans le noyau (Wiedlocha *et al.*, 2005), et pourrait ainsi être un mécanisme de régulation de ses activités neurotrophique et anti-apoptotique.

Le FGF1 possède quatre promoteurs alternatifs tissu-spécifiques (Chiu *et al.*, 2001), l'un des mieux caractérisés étant le promoteur 1B qui permet son expression dans le système nerveux central où le FGF1 est fortement exprimé durant l'organogenèse par exemple (Fu *et al.*, 1991). La surexpression du FGF1 est associée à des cancers du système nerveux comme les gliomes ou les astrocytomes (Maxwell *et al.*, 1991; Takahashi *et al.*, 1990). Bien que son rôle de facteur de survie soit bien connu et soit une de ses principales activités, celle-ci n'a pourtant jamais été étudiée dans des tumeurs neuronales. Probablement parce que le niveau basal d'expression du FGF1 est faible : à moins d'une concentration préalable sur héparine-sépharose, le FGF1 endogène n'est pas détectable par Western-blot avec les anticorps actuellement disponibles. Les variations de son expression sont également relativement faibles, le traitement par rFGF1 recombinant induit une augmentation d'un facteur 2 de l'expression du FGF1 endogène dans les cellules PC12 et SH-SY5Y, et sa surexpression

constitutive dans les cellules PC12 augmente son expression d'un facteur 5 (Renaud *et al.*, 1996b), ce qui est pourtant suffisant pour induire une activité neurotrophique et/ou anti-apoptotique (Pirou *et al.*, 2016; Renaud *et al.*, 1996b) mais peut expliquer pourquoi le FGF1 n'est que très rarement retenu lors de cribles transcriptomiques de tumeurs, à moins d'être spécifiquement recherché. De plus, des études d'immunohistochimie visant à déterminer la localisation des candidats identifiés dans des cribles de grande ampleur au sein des tumeurs et dans les tissus environnants peuvent être menées, et l'absence d'anticorps commercial anti-FGF1 efficace en immunodétection empêche alors l'étude approfondie du FGF1 et participe à expliquer qu'il soit peu étudié ou en tout cas peu publié. Le décryptage des mécanismes d'action du FGF1 dans ces tumeurs neuronales pourrait aider à la compréhension du rôle que joue le FGF1 dans d'autres types de cancers. En effet, la surexpression du FGF1 peut également être corrélée à une chimiorésistance et/ou à une agressivité tumorale accrue dans le cancer de la prostate, du sein ou des ovaires (Dorkin *et al.*, 1999; Slattery *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2012).

p53 est un oncosuppresseur muté dans plus de la moitié des cancers humains, mais l'est très rarement dans les neuroblastomes (Volter *et al.*, 2010). En revanche, l'oncogène MYCN est amplifié dans 20% des neuroblastomes, ce qui peut être associé à une surexpression de MDM2, un inhibiteur clé de p53 (Schwab, 2004; Tweddle *et al.*, 2003). La voie p53 peut alors être inhibée en amont de l'activation de p53, mais des études combinant l'activation de p53 par induction de stress génotoxique et l'inhibition de voies de survie ont montré que la voie p53 était fonctionnelle dans beaucoup de lignées de neuroblastome étudiées. Cependant le rôle du FGF1 intracellulaire n'avait jamais été étudié dans ce modèle. La caractérisation des mécanismes de son activité anti-apoptotique indépendante des voies de signalisation classiques induites par l'activation des FGFRs pourrait fournir de nouvelles cibles thérapeutiques à la lutte contre le cancer.

1 - Les activités intracellulaires du FGF1^{WT}

Le FGF1^{WT} protège de l'apoptose dépendante de p53 les fibroblastes de rat REtsAF, ainsi que les cellules de phéochromocytome de rat PC12 (Bouleau *et al.*, 2005, 2007) et les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y (Pirou *et al.*, 2016). Dans les cellules PC12, le FGF1 possède également une activité neurotrophique : il induit la survie de ces cellules en absence de sérum, ainsi que leur différenciation en neurones de type sympathique (Bouleau *et al.*, 2007; Renaud *et al.*, 1996b). Dans les cellules SH-SY5Y, le FGF1 recombinant ou intracellulaire inhibe l'apoptose dépendante de p53 en amont des événements mitochondriaux en diminuant l'activation de p53 (phosphorylation sur son résidu Ser15) ainsi que le niveau protéique de la protéine pro-apoptotique PUMA, cible transcriptionnelle de p53. Cela résulte en une diminution de la dépolarisation de la

membrane mitochondriale, une diminution de l'activation de la caspase-3 et finalement une augmentation de la viabilité cellulaire comparé au témoin non traité ou ne surexprimant pas le FGF1 (Pirou *et al.*, 2016).

Dans les cellules PC12, l'activité de différenciation du FGF1 intracellulaire est indépendante de la voie des FGFRs. En effet, la différenciation induite par la surexpression de FGF1 intracellulaire n'est pas affectée par le traitement par un inhibiteur de la phosphorylation des FGFRs (PD173074). En revanche, la différenciation induite par le rFGF1 extracellulaire est inhibée par ce traitement ou par l'ajout d'un anticorps neutralisant le FGF1 dans les cellules PC12 natives (Delmas *et al.*, 2016). Le laboratoire avait également montré que le rFGF1 extracellulaire active l'expression du FGF1 endogène et que celle-ci est requise pour l'activité neurotrophique du rFGF1 extracellulaire (Renaud *et al.*, 1996b). Le rFGF1 extracellulaire peut être internalisé dans le cytosol en se liant aux FGFRs activés (Citores *et al.*, 1999; Wiedlocha *et al.*, 1995) puis être transloqué dans le noyau où il pourrait participer à une boucle de rétrocontrôle positif en activant sa propre expression. Ainsi l'inhibition de la différenciation induite par le rFGF1 dans les cellules PC12 natives observée en présence d'inhibiteur de la phosphorylation des FGFRs pourrait refléter l'incapacité des FGFRs inactivés à internaliser le FGF1 et à activer son expression. Dans les cellules SH-SY5Y, l'ajout de rFGF1 extracellulaire dans le milieu de culture induit l'augmentation de l'expression du *FGF1* endogène (Pirou *et al.*, 2016), de façon similaire aux cellules PC12 (Renaud *et al.*, 1996b). Notre étude par RNA-Seq a montré que la surexpression de FGF1 humain induisait également une augmentation de l'expression du FGF1 endogène de rat. Ces résultats viennent donc conforter l'hypothèse que les activités neurotrophique et potentiellement anti-apoptotique du FGF1 sont médiées par une voie d'action intracrine dans les cellules PC12 et SH-SY5Y. Il est à noter qu'un long pré-traitement par le rFGF1 de 12 à 24h est requis pour pouvoir observer une activité anti-apoptotique dans ces lignées, ce qui pourrait suggérer l'existence de régulations transcriptionnelles plutôt qu'un mécanisme de signalisation direct. Pour le vérifier, il faudrait traiter par le rFGF1 des cellules transfectées par des siRNA dirigés contre l'ARNm du FGF1. Si notre hypothèse est correcte, nous ne devrions alors plus observer de protection contre l'apoptose dépendante de p53.

De façon surprenante, l'expression du *FGF1* endogène est également augmentée par l'activation de p53 après 16h de traitement par l'étoposide dans les cellules humaines SH-SY5Y. En effet, l'expression du FGF1 est réprimée par p53 dans des fibroblastes de rat (Bouleau *et al.*, 2005), tout comme celle du FGF2 dans des lignées de glioblastome ou d'hépatocarcinome (Ueba *et al.*, 1994). Dans une lignée primaire humaine de fibroblastes de peau, p53 réprime l'expression du *FGF2* par un mécanisme post-traductionnel indépendant de son activité transcriptionnelle (Galy *et al.*, 2001b). Dans ce dernier cas, p53 se fixe à l'ARNm du FGF2 et induit un changement conformationnel de

l'ARNm inhibant la formation du ribosome 80S et bloquant ainsi sa traduction (Galy *et al.*, 2001a). Dans les cellules PC12, des données non publiées du laboratoire ainsi que l'étude par RNA-Seq n'ont montré aucune régulation de l'expression du FGF1 par p53. Il est possible que les différents promoteurs du FGF1 puissent être régulés différemment par p53. Les promoteurs activés diffèrent selon le type cellulaire, ce qui expliquerait l'observation de régulations opposées. De plus, plusieurs promoteurs peuvent être activés au sein d'un même type cellulaire, comme c'est le cas par exemple dans des cellules épithéliales mammaires (Renaud *et al.*, 1996a), et la variation d'expression observée serait alors le résultat de la balance des régulations des différents promoteurs activés. Une étude par RT-PCR doit être menée dans les différentes lignées REtsAF, PC12 et SH-SY5Y afin de déterminer quel est le promoteur utilisé pour l'expression du FGF1 endogène, en utilisant des amorces spécifiques de chacun des exons alternatifs. Dans les cellules PC12, l'exploitation des résultats du RNA-Seq devra nous permettre de répondre à cette question. Il est également possible qu'il existe un biais de sélection dans les cellules SH-SY5Y : les cellules dont l'expression du FGF1 est augmentée sont plus résistantes à l'apoptose et on observe donc une augmentation des cellules surexprimant le FGF1 dans la population cellulaire sur des temps longs d'activation de p53. Pour le vérifier, il faudrait étudier l'effet de l'étoposide sur l'expression du FGF1 à des temps plus courts pour observer les régulations ayant lieu avant la mort des cellules les plus sensibles. Par exemple 4h ou 6h, la répression du FGF1 par l'étoposide étant transitoire et maximale à 4h dans les cellules REtsAF et plus détectable après 12h (Bouleau *et al.*, 2005).

Contrairement à ce qui a été observé dans les cellules PC12 ou SH-SY5Y, le rFGF1 extracellulaire ne protège pas les cellules de neuroblastome de souris N2a de l'apoptose dépendante de p53 et n'induit pas d'augmentation de l'expression du FGF1 endogène dans ces cellules. Cela pourrait laisser penser que l'activité anti-apoptotique du rFGF1 dépend en réalité de l'action du FGF1 endogène dans les cellules N2a. En effet, le traitement de ces cellules par le FGF2 active les MAPK ce qui indique que la voie des FGFRs est fonctionnelle dans ces cellules (Hwangpo *et al.*, 2012). Or la surexpression de FGF1 intracellulaire ne confère pas non plus de protection vis-à-vis de l'apoptose dépendante de p53 dans les cellules N2a, ce qui suggère que certains mécanismes de régulation du FGF1 et de ses fonctions sont absents de ces cellules. Il pourrait par exemple manquer un acteur nécessaire à la nucléarisation du FGF1 pour induire la régulation du FGF1 endogène et son activité anti-apoptotique. Indépendamment de sa nucléarisation, il pourrait également manquer un partenaire cellulaire nécessaire à son activité anti-apoptotique, comme un facteur de transcription par exemple. On peut également imaginer qu'un régulateur négatif de l'activité du FGF1 soit surexprimé dans ces cellules, comme par exemple la PKC δ ou la nucléoline qui régulent la phosphorylation du FGF1. L'hyperphosphorylation du FGF1 inhiberait son activité anti-apoptotique tout comme dans les

cellules PC12 et SH-SY5Y (Delmas *et al.*, 2016; Pirou *et al.*, 2016). Nous pourrions le vérifier en analysant l'activité du mutant non phosphorylable FGF1^{S130A} dans les cellules N2a. Il est donc indispensable de poursuivre l'étude des mécanismes d'action du FGF1 sur les cellules N2a en parallèle de la lignée humaine de neuroblastome SH-SY5Y pour pouvoir identifier les différences d'activation de voies de signalisation ou d'interactions du FGF1. Enfin, à notre connaissance il n'existe à ce jour aucune étude de l'expression du FGF1 dans un échantillon de tumeurs neuroblastiques. Il est indispensable de réaliser une collaboration avec une équipe de bioinformaticiens capable de réaliser une méta-étude des analyses transcriptomiques déjà réalisées sur les neuroblastomes afin d'étudier l'expression du FGF1 dans ces tumeurs neuronales, et vérifier si elle pourrait corrélérer avec une augmentation de la progression tumorale et/ou la chimiorésistance, comme c'est le cas dans d'autres types de cancers. Dans ce cas, des thérapies basées sur des siRNA stables ciblant l'ARNm du FGF1 pourraient être envisagées.

2 - La nucléarisation du FGF1 est requise pour son activité anti-apoptotique

Une précédente étude du laboratoire a démontré que la nucléarisation du FGF1 était requise pour ses activités neurotrophique et anti-apoptotique dans les cellules PC12 (Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009). En effet, la forme du FGF1 cytoplasmique déléetée de sa séquence de nucléarisation (FGF1^{ΔNLS}) n'est plus capable d'induire la différenciation neuronale, la survie sans sérum ou de protéger les cellules PC12 de l'apoptose dépendante de p53.

Dans les cellules humaines SH-SY5Y, le FGF1^{ΔNLS} ne possède pas non plus d'activité anti-apoptotique, suggérant que la nucléarisation du FGF1 est un mécanisme de régulation majeur de son activité et conservé dans deux types cellulaires et organismes différents. Il est intéressant de noter que parmi les partenaires établis ou putatifs du FGF1 se trouvent des protéines nucléaires ou nucléarisables comme la nucléoline (Sletten *et al.*, 2014), les lamines A/C (Bober *et al.*, 2016) ou encore p53 (qui n'interagit pas avec le FGF1^{ΔNLS} cytosolique) (Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009). De plus, le FGF1^{WT} inhibe une partie des activités transcriptionnelles de p53 dans les cellules REtsAF (inhibition de la transactivation de *BAX*), ainsi que dans les cellules PC12 (inhibition de la transactivation de *PUMA* et *NOXA*). Enfin, une expérience préliminaire de sous-fractionnement nucléaire dans les cellules PC12 réalisée au laboratoire montrait que le FGF1 semblait être détecté dans la fraction des protéines fortement liées à l'ADN comme le facteur de transcription TFIID.

Ces différents éléments nous ont amené à émettre l'hypothèse que les activités intracellulaires du FGF1 et notamment son activité anti-apoptotique pouvaient être médiées par une voie d'action nucléaire où le FGF1 agirait comme un facteur ou co-facteur de transcription, de façon dépendante ou non de p53. Le FGF1 pourrait ainsi fonctionner de façon semblable au VEGFR2 qui est capable

d'être transloqué dans le noyau, de s'associer au facteur de transcription SP1 et de réguler sa propre transcription en se fixant au promoteur proximal du *VEGFR2* (Domingues *et al.*, 2011), ou encore à l'EGF et l'EGFR dont l'association à la chromatine et les activités de co-facteur de transcription respectivement ont été décrites (Brand *et al.*, 2013; Rakowicz-Szulczynska *et al.*, 1986). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) à l'aide d'un anticorps dirigé contre le FGF1 sont en cours de mise au point au laboratoire afin de confirmer la liaison du FGF1 à la chromatine dans les cellules PC12 et SH-SY5Y. Si c'est le cas, des expériences de ChIP-Seq et ChIP-PCR seront menées afin d'identifier les cibles transcriptionnelles du FGF1 ou du complexe de transcription dont il ferait partie. Dans ce dernier cas, des expériences de co-immunoprécipitation pour identifier ses partenaires pourront être réalisées, ou bien une identification par spectrométrie de masse.

3 - Mutants de nucléarisation

Dans les cellules PC12, des expériences de fractionnement subcellulaire et d'immunofluorescence ont montré que la forme FGF1^{ΔNLS} était cytoplasmique (Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009). Le FGF1^{ΔNLS} est très faiblement détecté dans les cellules SH-SY5Y, même s'il faut noter que dans les cellules PC12 le niveau du FGF1^{ΔNLS} est toujours plus faible que celui du FGF1^{WT}. Pour résoudre ce problème nous pourrions utiliser la capacité du FGF1 à lier l'héparine et les HSPG, qui est conservée par le FGF1^{ΔNLS}, pour augmenter le niveau de FGF1^{ΔNLS} dans les fractions subcellulaires en les concentrant sur des billes d'héparine-sépharose. Des problèmes de pureté des fractions obtenues nous empêchent de pouvoir conclure avec certitude sur la localisation du FGF1^{ΔNLS} dans les cellules SH-SY5Y. Les résultats obtenus dans d'autres séries d'expériences montrent que la détection du FGF1^{ΔNLS} dans la fraction nucléaire est toujours associée à une contamination cytosolique (présence de tubuline), tandis que lorsque la fraction est pure le FGF1^{ΔNLS} n'est jamais détecté. Ces expériences n'ont pas été présentées dans l'article (Pirou *et al.*, 2016) en raison de problèmes de détection du témoin positif (FGF1^{WT}) ou de niveau d'expression trop faible du FGF1^{ΔNLS}. Puisqu'il n'existe actuellement pas d'anticorps anti-FGF1 qui fonctionne en immunofluorescence, et que les expériences d'immunofluorescence utilisant les tags V5 ou His ne sont pas efficaces, de nouvelles mises au point du protocole de fractionnement sont nécessaires. Ces expériences pourront être réalisées à partir de nouvelles transfections permettant l'obtention de populations polyclonales ou de clones isolés présentant un niveau d'expression du FGF1^{ΔNLS} plus important dans les cellules SH-SY5Y.

En plus de la séquence NLS1 située à son extrémité N-terminale (KKPK, appelée précédemment NLS pour FGF1^{ΔNLS}), le FGF1 possède une deuxième séquence de nucléarisation bipartite (NLS2) (Wesche *et al.*, 2005) ainsi qu'une séquence d'export nucléaire dans sa région C-terminale (Nilsen *et*

al., 2007). Afin de résoudre ces problèmes de localisation du FGF1^{ΔNLS} dans les cellules SH-SY5Y, nous avons donc généré de nouvelles formes mutantes du FGF1 possédant des mutations ponctuelles dans chacune de ces trois séquences (FGF1^{NLS1m}, FGF1^{NLS2m} et FGF1^{NESm}) afin de réguler le trafic nucléo-cytoplasmique. Les mutants FGF1^{NLS1m} et FGF1^{NLS2m} devant nous permettre d'étudier l'activité d'une forme cytoplasmique du FGF1, et le mutant FGF1^{NESm} nous permettant au contraire d'étudier l'activité d'une forme majoritairement nucléaire du FGF1. Nous avons étudié leur localisation subcellulaire dans les cellules SH-SY5Y.

La forme mutante FGF1^{NLS2m} (AA...KK) n'a jamais pu être détectée ni dans les fractions cytosoliques ou nucléaires, ni dans les extraits totaux, bien que les cellules soient résistantes à la généticine utilisée comme marqueur de sélection des cellules transfectées. Cette forme mutante a précédemment été étudiée dans les fibroblastes de souris NIH 3T3 sous sa forme recombinante, et est capable de se lier aux FGFRs, d'activer la voie des MAPK, d'être internalisée dans le cytosol mais pas d'être transloquée au noyau (Wesche *et al.*, 2005). Des travaux en cours au sein de l'équipe montrent que la transfection de vecteurs d'expression du FGF1^{NLS2m} dans les cellules COV434 issues d'une tumeur ovarienne de la granulosa conduisent à une expression correcte de cette forme mutante qui semble toutefois être cytosolique et nucléaire dans ces cellules. Il est possible qu'un problème au niveau du vecteur utilisé soit la source de ce défaut d'expression. Nous quantifierons et comparerons les niveaux d'ARNm du FGF1^{NLS2m} et du FGF1^{WT} par RT-PCR afin de déterminer si le problème se situe au niveau de l'expression du vecteur ou de la stabilité de la protéine dans ces cellules. Dans ce dernier cas, une nouvelle mutagenèse dirigée pourra être réalisée afin de muter les lysines en position 126 et 127 (KK...AA) en faisant l'hypothèse que cette nouvelle mutation n'influence pas la stabilité du FGF1 dans les cellules SH-SY5Y. En effet, cette séquence NLS2 est proche du domaine C-terminal du FGF1 qui contient des régions importantes pour l'activité du FGF1, comme son site de phosphorylation (Ser130) ainsi que le résidu Lys132, déterminant pour ses activités. D'autre part cette région est riche en acides aminés basiques et pourrait être impliquée la liaison du FGF1 à l'ADN. La modification de la structure tertiaire du FGF1 potentiellement occasionnée par ces mutations pourrait donc avoir un impact important sur la stabilité de la protéine.

Le FGF1^{NLS1m} et le FGF1^{NESm} sont détectés à des niveaux comparables au FGF1^{WT} et leurs localisations sont nucléaires et cytoplasmiques dans les cellules SH-SY5Y. Ainsi les mutations des séquences NLS1 et NES ne semblent pas avoir d'effet sur la localisation du FGF1 dans les cellules SH-SY5Y. Le FGF1 est une protéine de faible poids moléculaire (17 kDa, et 20 kDa pour les formes taggées) qui peut diffuser passivement vers le noyau, ce qui pourrait expliquer en partie les résultats observés pour ces formes mutantes. Cependant, différentes études ont montré l'efficacité de ces

mutations (FGF1^{ΔNLS}, FGF1^{NLS1m}, FGF1^{NLS2m}, FGF1^{NESm}) dans d'autres types cellulaires (Imamura *et al.*, 1990; Nilsen *et al.*, 2007; Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009; Wesche *et al.*, 2005). De plus, des mécanismes d'import nucléaire actif du FGF1 extracellulaire *via* sa séquence NLS1 ont été décrits. Ils nécessitent une activité Ran-GTPase, le partenaire intracellulaire du FGF1 LRRC59 (Skjerpen *et al.*, 2002a) ainsi que les karyophérines α1 et β1 (Zhen *et al.*, 2012). Il est possible que des mécanismes d'import nucléaire du FGF1 différents et non encore décrits soient impliqués dans les cellules SH-SY5Y. Nous pourrions tester l'implication de la protéine LRRC59 ainsi que des karyophérines α1 et β1 dans les cellules PC12 et SH-SY5Y. Nous pourrions également étudier l'effet d'une double mutation des séquences NLS1 et NLS2 sur la localisation subcellulaire du FGF1 dans les cellules SH-SY5Y. En ce qui concerne la forme FGF1^{NESm}, d'autres types de mutations de cette séquence ont été réalisées (Nilsen *et al.*, 2007) et devront être testées dans les cellules SH-SY5Y afin de pouvoir étudier l'impact d'une localisation majoritairement nucléaire sur son activité anti-apoptotique.

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

Les activités extracellulaires de la forme mutante FGF1^{K132E} qui présente une affinité réduite pour l'héparine ont été étudiées par différentes équipes. Cette forme mutante présente des activités neurotrophique et mitogénique fortement réduites par rapport à la forme sauvage (Burgess *et al.*, 1990; Klingenberg *et al.*, 1999; Renaud *et al.*, 1996b). La mutation K132E ne modifie pas la capacité du FGF1 extracellulaire à interagir avec ses récepteurs FGFRs, ni à activer les MAPK comme le FGF1^{WT} mais cette mutation inhibe l'activité neurotrophique du FGF1 dans les cellules PC12 (Renaud *et al.*, 1996b).

Nous avons montré que la mutation K132E inhibe l'activité anti-apoptotique du FGF1 intracellulaire dans les cellules PC12 et SH-SY5Y (Delmas *et al.*, 2016; Pirou *et al.*, 2016). Dans les cellules PC12, le FGF1^{K132E} intracellulaire ne possède pas d'activité neurotrophique, bien qu'il soit localisé à la fois dans le cytosol et dans le noyau (Delmas *et al.*, 2016). Ainsi dans ces cellules, le FGF1^{K132E} ne possède aucune activité neurotrophique, qu'il agisse de façon extra- ou intracellulaire.

Le mutant FGF1^{K132E} présente une affinité réduite pour l'héparine, ce qui peut laisser penser que cette mutation provoque une modification conformationnelle importante du FGF1. En plus d'inhiber son interaction avec l'héparine, celle-ci pourrait empêcher son interaction avec d'autres partenaires du FGF1 impliqués dans ses activités neurotrophique et anti-apoptotique, comme par exemple des facteurs de transcription. D'autre part, le résidu Lys132 se situe dans une région riche en acides aminés basiques (lysines) qui pourrait tenir lieu de domaine de liaison à l'ADN du FGF1. Dans l'hypothèse où le FGF1 agirait comme un facteur de transcription, une modification de ce domaine abrogerait ses activités. Enfin, la Lys132 est un des sites de méthylation connus du FGF1 (Harper and

Lobb, 1988), et la mutation K132E inhibe cette méthylation. Cela suggèrerait que la méthylation du FGF1 sur son résidu Lys132 est un mécanisme de régulation de son activité neurotrophique et anti-apoptotique.

5 - La phosphorylation du FGF1 inhibe son activité anti-apoptotique

Le résidu Lys132 se situe à proximité immédiate du site unique de phosphorylation du FGF1, le résidu Ser130. L'équipe de Wiedlocha a montré que la phosphorylation du FGF1 sur son résidu Ser130 par la PKC δ aurait lieu dans le noyau et serait régulé par la nucléoline, partenaire du FGF1. La phosphorylation du FGF1 pourrait induire une modification conformationnelle permettant d'exposer sa séquence NES, ce qui stimulerait son export nucléaire puis sa dégradation dans le cytosol (Klingenberg *et al.*, 1998; Mascarelli *et al.*, 1989; Sletten *et al.*, 2014; Wiedlocha *et al.*, 2005). Nous avons donc choisi d'étudier l'influence de la phosphorylation du FGF1 sur ses activités en générant une forme non phosphorylable (FGF1^{S130A}) et une forme mimant constitutivement la phosphorylation (FGF1^{S130D}) grâce à la charge négative apportée par l'acide aspartique en position 130.

Dans les cellules PC12, la surexpression de ces deux formes est capable d'induire la formation d'extensions neuritiques de façon comparable à la surexpression du FGF1^{WT}, suggérant que la phosphorylation du FGF1 ne joue pas de rôle dans son activité de différenciation. En revanche, l'étude de l'activité anti-apoptotique de ces formes montre que seul le FGF1 non phosphorylé (FGF1^{S130A}) protège les cellules PC12 et SH-SY5Y de l'apoptose dépendante de p53, contrairement au FGF1^{S130D}. Ainsi, la phosphorylation du FGF1 inhibe l'activité anti-apoptotique du FGF1 et est un mécanisme de régulation clé conservé dans deux types cellulaires et organismes différents. Puisque d'après Wiedlocha cette phosphorylation induit l'exportation cytosolique du FGF1, ces résultats soulignent l'importance de la localisation nucléaire du FGF1 pour son activité anti-apoptotique. Or dans les cellules PC12, les formes FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D} sont localisées à la fois dans le cytosol et dans le noyau, et nous n'avons détecté aucune différence de niveau entre ces deux formes dans la fraction nucléaire (Delmas *et al.*, 2016). Cela suggère que la phosphorylation du FGF1 n'influence pas la localisation du FGF1 dans ces cellules. En revanche, il est possible que la phosphorylation du FGF1 modifie ses interactions avec d'éventuels partenaires nucléaires impliqués dans son activité anti-apoptotique, ou qu'elle modifie ses sites de fixation chromatiniens putatifs et donc les régulations transcriptionnelles induites pour son activité anti-apoptotique. Ses interactions avec des partenaires impliqués dans la différenciation ou des sites de fixation régulant l'expression de gènes impliqués dans la différenciation ne seraient en revanche pas affectés. Pour le savoir, nous pourrions identifier par spectrométrie de masse ou par co-immunoprécipitation les éventuels partenaires du FGF1 selon son état de phosphorylation en comparant le FGF1^{S130A} au FGF1^{S130D}. Nous pourrions également

réaliser une étude comparative par RNA-Seq dans des cellules PC12 et SH-SY5Y exprimant le FGF1^{S130A} ou le FGF1^{S130D} afin de vérifier si la phosphorylation du FGF1 induit une modification de ses régulations transcriptionnelles (directes ou indirectes). Dans les cellules SH-SY5Y, la forme phosphomimétique FGF1^{S130D} ne protège pas les cellules de l'apoptose dépendante de p53 et semble même potentialiser la mort induite par l'activation de p53 (Pirou *et al.*, 2016). La forme phosphorylée du FGF1 pourrait entrer en compétition avec la forme non phosphorylée et inhiber l'interaction de cette dernière avec ses partenaires impliqués dans la régulation de la survie. Le FGF1^{S130D} pourrait ainsi agir comme un mutant dominant négatif du FGF1. Pour le vérifier, nous pourrions réaliser des co-transfections transitoires avec différentes doses de chacun des deux vecteurs d'expression et analyser la survie de ces cellules. Si cette hypothèse est correcte, une dose plus importante de FGF1^{S130D} devrait fortement inhiber l'activité anti-apoptotique du FGF1^{S130A}. Nous pourrions alors envisager l'injection de FGF1^{S130D} comme thérapie afin de neutraliser l'effet anti-apoptotique du FGF1 dans des tumeurs surexprimant le FGF1. Nous pourrions également étudier l'impact de l'expression de ces différentes formes de FGF1 sur la progression tumorale, en injectant des cellules SH-SY5Y exprimant ces différentes formes mutantes dans des souris nude et en comparant leur pouvoir tumorigène. Des données non publiées du laboratoire ont montré que l'injection dans des souris nude de cellules PC12 surexprimant le FGF1^{WT} additionné ou non d'un peptide signal de sécrétion ne semblait pas induire de différence dans la progression tumorale.

II Les régulations transcriptionnelles induites par p53 et le FGF1

Nous envisageons que le FGF1 puisse agir comme un facteur ou co-facteur de transcription et régule ou contribue à réguler l'expression de nombreux gènes. Des expériences sont en cours pour déterminer par immunoprécipitation grâce aux formes taggées V5/His du FGF1 si le FGF1 interagit ou non avec la chromatine. Si c'est le cas, des expériences de CHIP-Seq et CHIP-PCR seront menées pour identifier les gènes cibles putatifs du FGF1. Si ce n'est pas le cas, le FGF1 pourrait tout de même réguler la transcription de façon indirecte, par exemple en interagissant avec des facteurs de transcription et en régulant leurs activités. Afin d'identifier les régulations transcriptionnelles directes ou indirectes induites par le FGF1 d'une part, p53 d'autre part, et enfin FGF1 et p53, nous avons initié une étude transcriptomique par RNA-Seq dans les cellules de rat PC12 en analysant les gènes différentiellement exprimés après 8h d'activation de p53 par ajout d'étoposide, et/ou 48h d'induction de l'expression du FGF1 par la dexaméthasone (**Figure 50**).

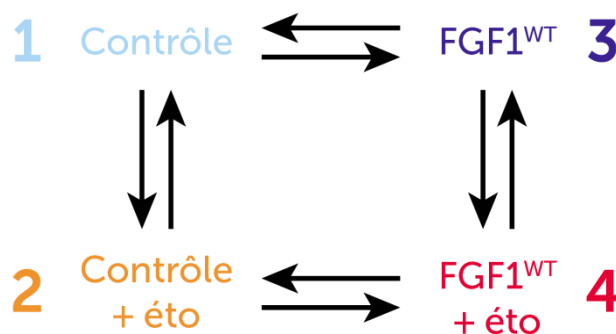


Figure 50 : Conditions et analyses différentielles réalisées

L'expérience de RNA-Seq a été réalisée en quatre conditions (1, 2, 3 et 4), chacune en duplicat. Toutes les cellules ont été traitées 48h à la dexaméthasone pour induire ou non l'expression du FGF1^{WT}, puis traitées ou non à l'étoposide (éto) pendant 8h afin d'induire l'apoptose dépendante de p53. Les analyses différentielles réalisées sont représentées par les flèches.

L'analyse différentielle effectuée entre les différentes conditions (**Figure 50**) a montré que de très nombreux gènes étaient significativement régulés par l'étoposide, le FGF1 ou la combinaison de ces deux facteurs. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'induction d'un stress génotoxique active plusieurs voies de réponses cellulaires et notamment la voie p53, elle-même au sommet d'une cascade de régulations transcriptionnelles. D'autre part, la surexpression de FGF1 dans les cellules PC12 induit leur différenciation en cellules neuronales de type sympathique, ce qui se visualise morphologiquement par la formation d'extensions neuritiques commençant à s'établir en réseau. Le processus de différenciation cellulaire est modulé par la régulation de nombreux gènes. D'autre part, l'analyse qualitative de notre expérience de RNA-Seq a montré que les régulations transcriptionnelles étaient hautement similaires au sein de chacun de nos quatre duplicats, ce qui conduit à un bruit de

fond très faible et permet d'obtenir des variations d'expression entre chaque condition qui peuvent être de faible amplitude mais statistiquement très significatives. L'analyse et la validation par RT-PCR d'une partie des résultats sont en cours, et des expériences plus approfondies sont nécessaires comme des études cinétiques plus fines de l'expression de ces gènes. Parmi les gènes significativement régulés se trouvaient beaucoup de facteurs de transcription, ce qui peut également participer à expliquer la grande variété de régulations observées. Les recherches bibliographiques montrent que certains de ces gènes candidats sont particulièrement intéressants pour la poursuite de notre étude et progresser dans la caractérisation des activités intracrines du FGF1 (neurotrophique et anti-apoptotique). Je ne discuterai ici que d'une partie d'entre eux comme les gènes codant les facteurs de transcription EGR-1, la famille ETS/ETV, c-Jun/c-Fos (formant le complexe AP-1), ainsi que les acteurs des voies de signalisation Wnt et PI3K/Akt/mTOR.

1 - Le facteur de transcription EGR-1

Dans notre étude par RNA-Seq, la surexpression du FGF1 induit l'augmentation de l'expression d'*EGR-1* dans les cellules PC12. Des mécanismes de régulation de la transcription induits par le FGF1 et impliquant EGR-1 ont été décrits dans des cellules endothéliales bovines. Le traitement de ces cellules par du rFGF1 extracellulaire induit une augmentation rapide de l'expression du facteur de transcription *EGR-1*, son accumulation nucléaire et sa fixation à une région spécifique (ERE pour EGR-Response Element) du promoteur proximal du *PDGF-A* (Delbridge and Khachigian, 1997). Ainsi en régulant l'expression de facteurs de transcription comme EGR-1, le FGF1 pourrait indirectement réguler l'expression de nombreux gènes. Une étude transcriptomique par microarray a été menée sur des cellules PC12 surexprimant ou non EGR-1. Parmi les gènes cibles putatifs dont l'expression est modifiée par la surexpression d'EGR-1, on retrouve notamment une répression de *MDM2*, *GADD45a*, *SerpinE1*, *c-Jun* ou encore *Stat1* (James *et al.*, 2005). À l'exception de *Stat1*, une ou plusieurs séquences ERE ont été identifiées dans une région de 1 kb en amont du site d'initiation putatif de la transcription de ces différents gènes. Cette répression de *MDM2* par EGR-1 pourrait expliquer la diminution surprenante de l'expression de *MDM2* observée dans notre étude et induite par la surexpression du FGF1. Par contre, la surexpression du FGF1 induit dans notre étude une augmentation de l'expression de *GADD45a*, *SerpinE1* et *c-Jun*, ce qui suggère que si une partie des régulations transcriptionnelles induites par le FGF1 pourrait être médiée par EGR-1, il existe certainement d'autres mécanismes médiant l'action du FGF1. Le FGF1 et EGR-1 pourraient éventuellement agir de façon indépendante sur des cibles transcriptionnelles communes induisant des régulations opposées. Il faut cependant noter que les cinétiques d'activation d'EGR-1 par le rFGF1 décrites dans les cellules endothéliales sont extrêmement précoces (de 30 minutes à 1h)

tandis que nous sommes à 48h d'induction de surexpression du FGF1 dans notre étude par RNA-Seq sur les cellules PC12.

Dans notre étude, l'étoposide seul induit également une augmentation de l'expression d'EGR-1, bien que plus faible que celle induite par le FGF1 (FGF1 : x 6 ; étoposide : x 2,3). EGR-1 pourrait donc induire *via* ses régulations transcriptionnelles des signaux pro- ou anti-apoptotiques contradictoires dans les cellules PC12. Une étude menée sur des lignées cellulaires de cancer du sein, d'ostéosarcome et de cancer de la prostate montre que le promoteur P1 de *p73* produisant la forme pro-apoptotique TAp73 contient 5 sites de liaison à EGR-1, chacun contribuant à l'augmentation de l'expression de TAp73 par EGR-1 dans ces différents types cellulaires. En revanche, le promoteur P2 produisant l'isoforme courte et anti-apoptotique Δ Np73 n'est pas régulé par EGR-1, il est cependant activé par TAp73 et p53. EGR-1 est requis pour l'induction de TAp73 par un stress génotoxique (étoposide) chez la souris *in vivo*. Le promoteur du gène *EGR-1* est positivement régulé par EGR-1, p53, TAp73 et Δ Np73. L'ensemble de ces régulations conduisent à une augmentation de l'apoptose, et EGR-1, p53 et p73 sont tous les trois requis pour atteindre un niveau maximal d'induction de l'apoptose par stress génotoxique *in vitro* et *in vivo* (Yu *et al.*, 2007). EGR-1 médie l'apoptose induite par le TGF- β_1 dans un modèle de fibrose pulmonaire chez la souris et active l'expression de gènes pro-apoptotiques comme *Fas*, *FasL*, *TNF*, *p53* ou *PTEN* (Lee *et al.*, 2004). À l'inverse, la lignée cellulaire de fibrosarcome H4 (dérivée de la lignée HT1080) exprime un niveau quasi-indétectable d'EGR-1, qui n'est pas augmenté suite à l'induction de dommages à l'ADN par irradiation aux UV, et est hypersensible aux UV malgré l'absence de $p53^{WT}$. La surexpression d'*EGR-1* dans cette lignée les protège de l'apoptose induite par les UV *via* une augmentation de la transactivation de rapporteurs EGR-1 corrélée à une augmentation de la phosphorylation d'EGR-1. L'utilisation d'inhibiteurs de PKC et tyrosine kinases inhibe la phosphorylation d'EGR-1 ainsi que son activité anti-apoptotique (Huang *et al.*, 1998). Dans les cellules H4 surexprimant *EGR-1* et $p53^{WT}$, l'effet anti-apoptotique d'EGR-1 est dominant par rapport à l'effet pro-apoptotique de p53 (de Belle *et al.*, 1999). Ainsi EGR-1 pourrait avoir un rôle pro- ou anti-apoptotique selon le type cellulaire considéré et/ou le stimulus utilisé. La phosphorylation d'EGR-1 pourrait ainsi être un mécanisme de régulation de ses activités transcriptionnelles. En effet, *in vivo* l'ovariectomie chez la souris induit la phosphorylation d'EGR-1 et est corrélée à une diminution de l'interaction d'EGR-1 avec le facteur de transcription SP1, modulant ainsi la capacité de SP1 à se lier à l'ADN et à activer ses gènes cibles (Srivastava *et al.*, 1998). Nous pourrions donc étudier et comparer l'état de phosphorylation d'EGR-1 lorsque son expression est induite soit par le FGF1 soit par l'étoposide dans notre modèle.

D'autre part dans les cellules PC12, l'équipe de Chiu a montré que l'induction des extensions neuritiques dans ces cellules par le traitement au rFGF1 était augmentée par la présence de la

protéine SH2B1 β et l'activation d'EGR-1. Suite au traitement au rFGF1, la protéine adaptatrice SH2B1 β permet une augmentation de l'activation de la voie MAPK MEK-ERK1/2 (MEK pour MAPKK, ERK pour Extracellular signal-Regulated Kinases ou MAPK) et une augmentation de la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 qui active l'expression d'EGR-1 (Lin *et al.*, 2009). Plus précisément, SH2B1 β est nucléarisé et interagit avec STAT3. La surexpression de SH2B1 β augmente la fixation des hétérodimères STAT3-SP1 sur le promoteur d'EGR-1 en réponse au rFGF1 et active son expression (Chang *et al.*, 2014).

Il est possible que les régulations de l'expression du FGF1 endogène par lui-même (rFGF1 ou surexpression du FGF1 intracellulaire) que nous avons observées dans les cellules PC12 et SH-SY5Y (Pirou *et al.*, 2016; Renaud *et al.*, 1996b) soient médiées par l'activation d'EGR-1. Nous pouvons formuler deux hypothèses sur les mécanismes de cette régulation, qui placent le FGF1 soit en aval soit en amont de l'activation d'EGR-1 :

- le FGF1 active la voie des MAPK (*via* les FGFRs pour le rFGF1, ou par un autre mécanisme pour le FGF1 intracellulaire), celle-ci induit l'expression d'EGR-1 qui à son tour activerait l'expression du FGF1 endogène. Nous pourrions vérifier d'une part si les différents promoteurs du FGF1 contiennent une ou plusieurs séquences ERE, et d'autre part si l'inhibition de l'expression d'EGR-1 par siRNA dans les cellules PC12 et SH-SY5Y a un effet sur la régulation de l'expression du FGF1 endogène par la surexpression du FGF1 ou par le rFGF1.
- le FGF1, par un autre mécanisme à déterminer, active sa propre expression et induit ensuite l'expression d'EGR-1.

Pour pouvoir trancher entre ces deux modèles, il est nécessaire d'étudier l'expression du FGF1 et d'EGR-1 par des cinétiques plus fines, et d'utiliser également des siRNA ciblant soit EGR-1 soit le FGF1. Il est d'ailleurs à noter que l'expression d'un inhibiteur dominant négatif d'EGR-1 dans les cellules PC12 inhibe la différenciation induite par le NGF, indépendamment de la voie MEK/ERK (Levkovitz *et al.*, 2001). Dans ce modèle, l'effet d'EGR-1 est indépendant de l'activation de la voie MEK/ERK ainsi que de sa fixation aux séquences ERE, mais dépend de sa capacité à interagir avec c-Jun, composant du complexe de transcription AP-1, et à l'activer (Levkovitz and Baraban, 2002). Il serait intéressant de vérifier si cet effet est retrouvé sur les activités neurotrophique et anti-apoptotique du FGF1, en utilisant des siRNA ciblant l'ARNm EGR-1 ou c-Jun dans des cellules traitées par le rFGF1 ou surexprimant le FGF1, ainsi qu'en bloquant la voie MEK à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques.

2 - La famille des facteurs de transcription ETS/ETV

Dans notre étude et parmi la famille des facteurs de transcription ETS, l'expression du gène *Etv1* est l'une des plus fortement induite par la surexpression de FGF1 tout comme les gènes *Etv4* et *Etv5* dans une moindre mesure, tandis qu'elle est fortement réprimée par l'ajout d'étoposide dans les cellules surexprimant le FGF1. Ces résultats ont été confirmés par analyse RT-PCR dans deux lignées cellulaires PC12 indépendantes surexprimant le FGF1^{WT} et le FGF1^{WT-V5/His}.

La famille des facteurs de transcription ETS comprend 28 membres chez l'Homme. Plus de 700 gènes cibles ont été identifiés à ce jour, impliqués dans une grande variété de processus biologiques comme l'apoptose, la croissance cellulaire ou encore l'angiogenèse (Findlay *et al.*, 2013). La dérégulation des facteurs ETS est également impliquée dans la progression tumorale (Kar and Gutierrez-Hartmann, 2013). D'autre part, les gènes impliqués dans la différenciation neuronale dopaminergique contiennent des motifs conservés qui peuvent être activés par *Etv1* (Flames and Hobert, 2009). Ainsi, la régulation d'*Etv1* induite par le FGF1 dans notre étude pourrait être liée au processus de différenciation des cellules PC12 en cellules de type neuronal et dopaminergiques.

En effet, plusieurs études ont décrit des interactions entre les voies de signalisation des FGFs et la famille ETS, principalement dans le processus de différenciation neuronale. *Etv4* est impliqué dans la différenciation des cellules PC12 et SH-SY5Y. La surexpression d'*Etv4* induit l'extension neuritique des cellules PC12 et augmente l'expression de marqueurs de différenciation comme les neurofilaments dans les cellules SH-SY5Y (Kandemir *et al.*, 2014). *Etv1*, 4 et 5 sont des cibles de la voie de signalisation des FGFRs/MAPK, l'expression d'*Etv1* est transitoirement augmentée au cours de la neurogenèse de la rétine de xénope et requise pour la différenciation neuronale de la rétine (Willardsen *et al.*, 2014). Les souris *Etv1*^{-/-} présentent des défauts sévères de connexions neuronales (Arber *et al.*, 2000). Dans les cellules SH-SY5Y, la surexpression de *FOXP2*, un gène codant pour un facteur de transcription et dont les mutations provoquent des altérations du langage, induit leur différenciation neuronale notamment en augmentant l'expression du *FGF1* et d'*Etv1* (Devanna *et al.*, 2014). De façon intéressante, dans cette même étude l'expression des inhibiteurs de facteurs de transcription *Id2* et *Id3* est initialement augmentée puis fortement réprimée, et l'expression d'*Id1* est réprimée. La surexpression d'une forme modifiée et sécrétée du FGF1 (sp-FGF1) dans la membrane chorioallantoïdienne d'embryons de poulet induit l'angiogenèse *in vivo* (Forough *et al.*, 2003) *via* l'induction de l'augmentation de l'expression de *PI3K*, *Akt* et *Ets1* ainsi que l'activation de la voie PI3K/Akt (Forough *et al.*, 2005, 2006; Weylie *et al.*, 2005).

L'expression du *FGF1* est régulé par quatre promoteurs chez les mammifères, mais nous ignorons actuellement lequel ou lesquels sont actifs dans les cellules PC12, SH-SY5Y ou N2a qui sont issues de

différentes espèces (respectivement rat, Homme et souris). Le promoteur 1.D humain possède un domaine SRE contenant un site Ets, et est activé par Ets2 mais pas Etv4 *via* une voie dépendante des petites GTPases Ras et Rac1 (Chotani *et al.*, 2000). Nous déterminerons quels sont les promoteurs activés dans ces différentes lignées par RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques de chacun des quatre exons alternatifs afin de déterminer ensuite si les facteurs de transcription de la famille Ets peuvent être impliqués dans la régulation de l'expression du *FGF1* endogène.

Ainsi, de par ses activités et ses liens avec les FGFs, la famille ETS semble être une piste intéressante et plusieurs de ses membres pourraient médier les activités de différenciation du FGF1. Pour le vérifier, nous pourrions transfecter des siRNA dirigés contre les ARNm d'*Etv1*, 4 ou 5 dans des cellules PC12 natives traitées par du rFGF1 ou bien surexprimant le FGF1 et étudier leur différenciation. Nous pourrions également étudier l'implication de ces facteurs dans l'activité anti-apoptotique du FGF1 ainsi que l'implication de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR dans notre modèle, en bloquant cette voie à différents niveaux *via* des inhibiteurs pharmacologiques des PI3K ou d'Akt.

3 - La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR

Il existe de nombreuses interconnexions entre les gènes régulés dans notre étude, et notamment avec la voie de survie PI3K/Akt/mTOR. Bien que les régulations transcriptionnelles des acteurs de cette voie ne soient pas parmi les plus frappantes, de nombreuses régulations de la voie p53 par des facteurs de croissance *via* la voie PI3K/Akt/mTOR et Ras/MAPK ont été décrites. La voie PI3K/Akt/mTOR peut directement moduler l'activité de p53 : la kinase Akt peut interagir avec MDM2 et le phosphoryler. Cette phosphorylation de MDM2 inhibe son interaction avec ARF et augmente sa translocation nucléaire et sa capacité à ubiquitiner et dégrader p53, ce qui conduit à une inhibition des activités de p53 (Ashcroft *et al.*, 2002; Mayo and Donner, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Akt inhibe également par phosphorylation l'activité des protéines pro-apoptotiques Bad et caspase-9. Akt phosphoryle les facteurs de transcription de la famille Forkhead, largement impliqués dans la mort par leur activation de l'expression de gènes pro-apoptotiques comme *FasL* ou *BIM*, et induit leur rétention cytoplasmique. La protéine IKK, inhibiteur de la voie de survie NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B), est phosphorylée par Akt ce qui conduit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui régule l'expression de gènes anti-apoptotiques comme les *IAPs* ou *BCL-x_L* (Vara *et al.*, 2004).

Dans l'intestin, la radiothérapie induit l'apoptose *via* une induction de p53 et PUMA, et celle-ci est inhibée par des traitements à l'IGF1 ou au FGF2. L'utilisation d'inhibiteurs de PI3K ou d'antagonistes de MDM2 restaure l'apoptose en présence de ces facteurs de croissance, tandis que la surexpression d'Akt supprime l'induction de PUMA et p53 par la radiothérapie (Qiu *et al.*, 2010).

Dans une lignée d'adénocarcinome mammaire de rat, le rFGF1 induit une augmentation de la phosphorylation d'Akt et d'ERK qui conduit à l'augmentation de l'expression de la métalloprotéase MMP9 impliquée dans l'invasion tumorale (Lungu *et al.*, 2008). Akt est également un activateur du facteur de transcription NF- κ B, dans ces cellules le rFGF1 induit la translocation nucléaire de NF- κ B et augmente la dégradation de l'inhibiteur cytoplasmique I κ B α (Lungu *et al.*, 2008).

De nombreuses régulations transcriptionnelles observées dans notre étude peuvent être des conséquences de l'activation des voies PI3K/Akt, et pourraient donc être le reflet de régulations de cette voie par des mécanismes non encore décrits. Le rFGF1 pourrait activer la voie PI3K/Akt *via* sa fixation aux FGFRs, mais nous ne savons pas comment le FGF1 intracellulaire peut réguler cette voie. Il est possible qu'il régule le niveau ou l'activité d'acteurs de cette voie, comme par exemple les PDKs qui activent Akt. De façon intéressante, la phosphorylation d'Akt est augmentée dans des cellules endothéliales déficientes pour *Serpine1* (*Serpine1*^{-/-}) par rapport aux cellules sauvages et PTEN y est inactivé par phosphorylation, conduisant ainsi à une hyperactivation de la voie PI3K/Akt/mTOR, à une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi qu'à une diminution de l'apoptose induite par la déplétion de sérum (diminution de l'activation des caspases-9 et-3) (Balsara *et al.*, 2006). Dans ces cellules, la serpinE1 régule positivement l'apoptose et négativement la prolifération, puisque l'ajout de serpinE1 recombinante inverse ces effets (Balsara *et al.*, 2006). Dans notre étude, l'expression de *Serpine1* est augmentée par le FGF1, or et bien qu'il faille le vérifier dans notre modèle, l'effet anti-apoptotique du FGF1 serait plutôt associé à une activation de la voie de survie PI3K/Akt et non une inhibition. Cependant la capacité de la serpinE1 de réguler l'activation de la voie PI3K/Akt dans ces cellules endothéliales est intéressante et doit être étudiée dans notre modèle neuronal. La serpinE1 pourrait y réguler la voie PI3K/Akt dans un sens opposé grâce par exemple à des partenaires différents dans ce type cellulaire. Le FGF1 pourrait ainsi réguler l'activation de la voie PI3K/Akt *via* sa modulation du niveau de SerpinE1. D'autre part, l'expression de la *Serpine1* est fortement réprimée par l'étoposide dans notre étude. La répression de son activité d'inhibiteur de protéase à sérine pourrait permettre l'activation de voies de mort impliquant ces protéases et indépendantes des caspases.

De plus, nous avons montré à l'aide d'études cinétiques fines que l'activité du FGF1 intracellulaire n'impliquait pas de modifications de phosphorylation des MAPK (MEK1-ERK1/2) dans les cellules PC12 (Renaud *et al.*, 1996b), nous étudierons de la même façon l'implication de la voie PI3K/Akt dans les activités neurotrophique et anti-apoptotique du rFGF1 et du FGF1 intracellulaire.

4 - La voie de signalisation JAK/STAT

Contrairement à la voie PI3K/Akt, de nombreux acteurs de la voie JAK/STAT sont transcriptionnellement régulés dans notre étude et notamment *Jak1* dont l'expression est augmentée par le FGF1 et réprimée par l'étoposide.

La phosphorylation constitutive des facteurs de transcription STATs est une caractéristique d'un grand nombre de lignées cellulaires cancéreuses humaines ou de tumeurs primaires, et la suractivation des kinases JAKs a également été impliquée dans la tumorigenèse (Pesu *et al.*, 2008; Yu and Jove, 2004). Les kinases JAK1, JAK2 et TYK2 médient l'effet chimioprotecteur du FGF2 vis-à-vis du cisplatine dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome, indépendamment de STAT1, STAT3 ou STAT5A/B (Carmo *et al.*, 2011). Le rFGF1 induit une augmentation de l'activation de STAT3 dans les cellules PC12 lorsque la protéine adaptatrice SH2B1 β est surexprimée (Chang *et al.*, 2014). Dans notre étude, l'expression de *Stat3* semble plutôt légèrement réprimée par le FGF1, mais cela mériterait d'être étudié par des cinétiques plus fines.

Dans notre étude par RNA-Seq, la surexpression seule de FGF1 semble activer l'expression de *Jak1*, *Stat5b* et *Stat6*. L'étoposide seul diminue l'expression de *Stat6* mais active celle de *Jak3*. L'ajout d'étoposide dans des cellules surexprimant le FGF1 diminue fortement l'expression de *Jak1* et augmente celle de *Jak3*. L'expression des autres membres de la voie ne semble pas être significativement régulée. L'analyse par RT-PCR de l'expression de *Jak1* sur des cinétiques plus étendues confirme la répression de *Jak1* induite par l'étoposide dans les cellules surexprimant le FGF1, ainsi que dans les cellules contrôle (non significatif dans le RNA-Seq), et ce dans deux clones indépendants surexprimant une forme taggée ou non du FGF1^{WT}. L'augmentation de l'expression de *Jak1* par la surexpression du FGF1 n'était en revanche pas suffisamment marquée dans toutes les séries pour être significative, ces expériences demandent donc à être répétées. Peu d'études ont décrit des interactions entre les FGFs et la voie JAK/STAT, et les régulations observées dans notre étude nous encouragent à poursuivre notre étude de cette voie et de ses différents acteurs, plus particulièrement STAT3, STAT5B, STAT6 et JAK3. Nous étudierons les régulations de leur expression par RT-PCR et vérifierons si celles-ci sont reflétées au niveau protéique. Nous étudierons également l'état de phosphorylation des STATs, reflet de l'activation de la voie, ainsi que leur localisation nucléaire dans notre modèle.

5 - Le complexe transcriptionnel AP-1 (Jun/Fos)

Dans notre étude, l'expression de *c-Fos*, *c-Jun* principalement ainsi que celle de *JunB* et *JunD* est induite par le FGF1 et semble indiquer un rôle du complexe transcriptionnel AP-1 dans le processus de différenciation neuronale induit par le FGF1 dans les cellules PC12.

Les protéines des familles Jun et Fos s'hétérodimérisent pour former le facteur de transcription AP-1. AP-1 est notamment impliqué dans la régulation de l'apoptose, la différenciation et la prolifération cellulaires où il pourrait avoir des effets opposés selon la composition de l'hétérodimère et le contexte cellulaire (Ameyar *et al.*, 2003; Hess, 2004; Shaulian, 2010; Shaulian and Karin, 2002). Dans les cellules PC12 et des cultures primaires de neurones sympathiques de rat, la privation de NGF induit l'apoptose ainsi qu'une augmentation du niveau protéique et de la phosphorylation de c-Jun (Estus *et al.*, 1994; Ham *et al.*, 1995). La microinjection nucléaire d'un mutant dominant négatif de c-Jun dans ces cultures primaires neuronales les protège de l'apoptose induite par la privation de NGF (Ham *et al.*, 1995). Dans les cellules PC12, le traitement par NGF ou FGF1 recombinants induit l'augmentation rapide de l'expression de c-Jun et Fos (Lungu *et al.*, 2008; Szeberenyi *et al.*, 1990). Ces effets apparemment contradictoires de l'ajout ou de la privation en NGF diffèrent dans leur cinétique : la privation en NGF induit une répression de c-Jun après 3 jours, tandis que l'activation de c-Jun et Fos après ajout de NGF ou FGF1 recombinants est observée dès quelques minutes de traitement mais n'est que transitoire et disparaît après quelques heures. Il est donc essentiel d'affiner nos études cinétiques pour la poursuite de notre analyse. D'autre part, il est intéressant de noter que le promoteur 1B du gène FGF1, majoritairement activé dans le système nerveux, contient un site putatif de fixation d'AP-1 (Alam *et al.*, 1996). Nous pourrions également vérifier l'impact de l'expression du mutant dominant négatif de c-Jun ou de siRNA ciblant c-Jun sur la régulation de l'expression du FGF1 endogène.

En plus de sa régulation par la composition du dimère, AP-1 est également régulé post-traductionnellement notamment par phosphorylation. La voie JNK est un régulateur majeur de c-Jun dont la phosphorylation peut réguler sa localisation nucléaire, ses interactions avec d'autres partenaires ou sa stabilité (Shaulian, 2010). La voie JNK peut être activée par une grande variété de stimuli incluant les facteurs de croissance et régule de nombreux processus comme notamment l'apoptose. Dans la lignée de neuroblastome SH-EP1, l'IGF1 inhibe l'apoptose induite par le MPP⁺ en bloquant l'activation de la voie JNK (Wang *et al.*, 2010a). Dans les neurones sympathiques de rat, la privation de NGF induit l'apoptose et l'augmentation de l'activation de la voie JNK, tandis que le rajout de NGF supprime totalement l'activité JNK et inhibe l'apoptose (Virdee *et al.*, 1997). Il existe trois gènes codant pour une dizaine d'isoformes de JNKs : *JNK1*, 2 et 3 (ou respectivement *MAPK8*, 9

et 10), et aucun d'entre eux n'est transcriptionnellement régulé dans notre étude. Cependant, nous pourrions étudier l'état de phosphorylation de c-Jun par JNK dans notre modèle.

6 - La voie de signalisation Wnt

Dans notre étude, l'expression de différents membres de la voie Wnt est régulée par l'étoposide et/ou le FGF1. L'expression d'APC est augmentée par la surexpression du FGF1, et diminuée par l'ajout d'étoposide dans des cellules surexprimant ou non le FGF1. L'expression du ligand Wnt7a est augmentée par l'ajout d'étoposide dans des cellules surexprimant ou non le FGF1, mais n'est pas modifiée par la surexpression du FGF1. Enfin, le FGF1 induit une augmentation de l'expression de *Dkk3*, ce qui semble cohérent avec la différenciation induite par le FGF1. Après 8h de traitement, l'étoposide induit une diminution de l'expression de *Dkk3*. Les résultats de l'analyse préliminaire par RT-PCR de l'expression de *Dkk3* ne montrent pas d'augmentation du niveau d'ARNm suite à l'expression du FGF1. Cette analyse devra être répétée sur une cinétique plus fine.

La voie de signalisation Wnt est impliquée dans le développement embryonnaire, et des altérations de cette voie sont corrélées à la tumorigenèse (Anastas and Moon, 2012). Dans la voie canonique, la liaison du ligand Wnt à ses récepteurs membranaires (familles Frizzled et LRP, pour Lipoprotein Receptor-related Protein) induit l'accumulation cytosolique puis la translocation nucléaire de la β -caténine qui joue alors un rôle de co-facteur auprès des facteurs de transcription TCF/LEF (T-Cell Factor/Lymphoid Enhancing Factor). La protéine APC (Adenomatosis Polyposis Coli) fait partie du complexe de dégradation de la β -caténine, activé en absence de liaison de Wnt à ses récepteurs. Dans les cellules PC12, l'expression d'APC est requise pour l'initiation de l'extension neuritique lors de la différenciation induite par le NGF, et son expression est particulièrement augmentée après 7 jours de traitement par le NGF (Dobashi *et al.*, 1996, 2000). Dans les cellules PC12, il a été montré que Wnt1 pouvait inhiber la différenciation induite par le NGF (Chou *et al.*, 2000; Shackleford *et al.*, 1993), cependant son expression n'est pas régulée dans notre modèle.

L'activation de la voie Wnt est impliquée dans la progression tumorale du cancer de l'ovaire (Arend *et al.*, 2013; Gatcliffe *et al.*, 2008), en particulier une activation de la voie Wnt/ β -caténine *via* le ligand Wnt7a (Yoshioka *et al.*, 2012). Le FGF1 est également surexprimé dans ce type de cancer, ce qui est associé à une augmentation de la progression tumorale, un mauvais pronostic pour les patientes et une chimiorésistance (Birrer *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2012). Une étude récente montre que la surexpression du FGF1 **et** de Wnt7a est corrélée à un mauvais pronostic de survie pour les patientes (King *et al.*, 2015). Des expériences de ChIP dans une lignée cellulaire de cancer ovarien exprimant de forts niveaux de Wnt7a et FGF1 montrent que la voie Wnt/ β -caténine régule directement l'expression du FGF1 *via* la présence d'un site de liaison au facteur de transcription TCF

au sein du promoteur 1C du FGF1. L'inhibition de l'expression du FGF1 par shRNA inhibe l'activité tumorale de Wnt7a, et la surexpression du FGF1 seule est capable d'induire la formation de tumeur. (King *et al.*, 2015). De plus, nous avons montré au laboratoire que le FGF1 inhibe l'apoptose dépendante de p53 dans deux lignées cellulaires dérivées du cancer de l'ovaire (résultats non publiés). Dans les cellules PC12, l'expression de Wnt7a est réprimée par le FGF1 et activée par l'étoposide, suggérant un rôle plutôt pro-apoptotique de Wnt7a dans les cellules PC12. D'autre part, le FGF1 active l'expression des gènes *APC* et *Dkk3*, deux inhibiteurs de la voie Wnt, alors que l'étoposide inhibe leur expression. Ces différents résultats suggèrent qu'il existe des interactions entre les voies FGF1/Wnt/p53. Il apparaît donc indispensable d'étudier l'état d'activation de cette voie dans notre modèle en transfectant un gène-rapporteur de TCF (TOPFLASH, (Korinek, 1997)) dans les cellules PC12 traitées ou non par l'étoposide et surexprimant ou non le FGF1 et en analysant la production de luciférase. Nous étudierons également par RT-PCR et Western-blot les régulations de l'expression d'APC et Wnt7a (au niveau des ARNm et des protéines) induites par le FGF1 et/ou p53 de façon plus approfondie pour déterminer si APC peut être un élément clé des interactions entre les voies FGF1/Wnt/p53. L'étude du niveau et de la localisation de la protéine β -caténine dans notre modèle sera également entreprise par Western-blot et immunofluorescence.

La protéine Dkk3 (Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3) est un inhibiteur sécrété de la voie Wnt. L'expression de *Dkk3* est réprimée dans un grand nombre de cancers (cancer du poumon, de la prostate, du côlon, du sein, du foie, des testicules...), et de nombreuses études pointent vers un rôle de suppresseur de tumeur de Dkk3 (Veeck and Dahl, 2012). Cependant, Dkk3 régule positivement l'angiogenèse et son expression est augmentée dans les vaisseaux sanguins de gliomes, de mélanomes (Untergasser *et al.*, 2007), du cancer gastrique (Mühlmann *et al.*, 2010), de carcinome de la prostate (Zenzmaier *et al.*, 2008) ou de cancer du pancréas (Fong *et al.*, 2009). Dans ce dernier type de cancer, sa surexpression est associée à une amélioration de l'efficacité des chimiothérapies et à un meilleur pronostic de survie (Fong *et al.*, 2009). Dans les cellules PC12, l'expression ectopique du ligand Wnt1 induit un phénotype de cellules plates de type épithélial, et non plus rondes comme dans les PC12 natives non différenciées. Le traitement des cellules Wnt1/PC12 par le NGF ou le FGF2 n'induit plus l'expression de gènes spécifiques des neurones ou des cellules chromaffines normalement observée dans la lignée parentale en réponse à ces stimuli de différenciation. Le traitement par le NGF n'est plus capable d'induire l'extension neuritique, contrairement au FGF2 recombinant (Shackleford *et al.*, 1993). Le FGF2 inhibe la différenciation d'odontoblastes et augmente l'expression de *Dkk3* (Sagomonyants and Mina, 2014). Dans les cellules PC12, l'activation de la voie Wnt canonique par le ligand Wnt7a *via* le complexe de récepteurs Frizzled5-LRP6 peut être inhibée par Dkk1 et Dkk3 (Caricasole *et al.*, 2003). Dans une lignée de glioblastome, la surexpression

de *Dkk3* induit l'apoptose *via* l'activation de la voie JNK (c-Jun N-terminal kinases) et des caspases-9 et -3. Le knockdown de *Dkk3* par siRNA dans ces cellules induit la croissance cellulaire (Mizobuchi *et al.*, 2008). De même, l'expression de *Dkk3* dans une lignée de cancer de la prostate induit l'apoptose de façon JNK-dépendante, la translocation mitochondriale de BAX et la diminution de l'expression de BCL-2 (Abarzua *et al.*, 2005). *In vivo*, l'injection d'un vecteur dérivé d'un adénovirus portant *Dkk3* dans des souris nude xénotreffées par des cellules de cancer de la prostate humain induit une forte inhibition de la croissance tumorale (Abarzua *et al.*, 2005). En revanche, la surexpression de *Dkk3* dans une lignée d'ostéosarcome protège les cellules de l'apoptose induite par la déplétion de sérum, la doxorubicine ou le cisplatine (Hoang *et al.*, 2004). Dans les cellules rénales HEK293, la surexpression de *Dkk3* inhibe l'apoptose induite par H₂O₂ de façon comparable aux cellules surexprimant BCL-xL, et inhibe l'apoptose induite par la staurosporine (Nakamura *et al.*, 2007). Ainsi, *Dkk3* semble posséder des rôles opposés dans la modulation de la survie selon les types cellulaires étudiés. En parallèle de l'étude d'APC, β -caténine et Wnt7a, nous examinerons les régulations de l'expression de *Dkk3* induites par le FGF1 et l'étoposide par RT-PCR et Western-blot dans notre modèle afin de déterminer le rôle putatif de *Dkk3* dans la signalisation du FGF1 et son activité pro- ou anti-apoptotique dans les cellules PC12.

Les rôles de la voie Wnt dans la différenciation et la survie cellulaire sont multiples et parfois opposés selon les types cellulaires considérés ainsi que l'état de différenciation des cellules étudiées. L'étude des interactions des voies FGF1/Wnt/p53 sera donc certainement complexe mais semble très prometteuse.

III Conclusions et perspectives

Le FGF1 est un facteur de croissance non sécrété, localisé dans le cytosol et le noyau. Il induit la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires. Il est également impliqué dans la progression tumorale et peut conférer une chimiorésistance aux tumeurs qui le surexpriment.

Notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années aux activités intracrines du FGF1 en tant que régulateur de la différenciation et de la survie cellulaires. L'équipe a ainsi montré que le FGF1 intracellulaire a une activité anti-apoptotique dans plusieurs modèles cellulaires : cellules REtsAF, PC12, SH-SY5Y suite à l'induction de l'apoptose dépendante de p53 *via* un stress génotoxique. Dans les cellules PC12, un modèle d'étude de la différenciation neuronale, le FGF1 possède également une activité neurotrophique.

À l'aide de différentes formes mutantes du FGF1, nous avons cherché à mieux caractériser les mécanismes régulant son activité anti-apoptotique dans les cellules PC12 et SH-SY5Y, ainsi que son activité neurotrophique dans les cellules PC12. Nous avons pu montrer que :

- le domaine C-terminal du FGF1 ainsi que ses modifications post-traductionnelles sont importants pour la régulation de ses activités intracellulaires ;
- la phosphorylation du FGF1 inhibe son activité anti-apoptotique dans les cellules PC12 et SH-SY5Y mais ne régule pas son activité de différenciation dans les cellules PC12.

En effet, nous avons montré dans les cellules PC12 et SH-SY5Y que les formes FGF1^{WT} et FGF1^{S130A} (non-phosphorylable) possédaient une activité anti-apoptotique, à l'inverse du FGF1^{K132E} et de la forme phosphomimétique FGF1^{S130D}. En revanche, les formes FGF1^{S130A} et FGF1^{S130D} sont toutes les deux capables d'induire la différenciation des cellules PC12 en neurones de type sympathique, de façon comparable au FGF1^{WT} et contrairement au FGF1^{K132E} (Delmas *et al.*, 2016; Pirou *et al.*, 2016).

Nos résultats montrent donc pour la première fois le rôle de la phosphorylation dans la régulation des activités du FGF1 et ce dans deux modèles cellulaires de rat et humain. L'importance du domaine C-terminal du FGF1 avait été démontrée dans l'interaction du rFGF1 extracellulaire avec les HSPG, cependant son implication dans la régulation des activités intracellulaires neurotrophique et anti-apoptotique du FGF1 n'avait jamais été étudiée auparavant.

Afin de préciser le rôle de ce domaine C-terminal, nous envisageons de générer de nouvelles formes mutantes du FGF1 dans cette région. Différentes formes du FGF1 tronquées de façon séquentielle seront générées afin d'étudier dans nos différents modèles leur impact sur les activités intracellulaires du FGF1 et de délimiter plus précisément la région impliquée dans la régulation de

ces activités. En effet, il faut noter qu'en plus des sites Ser130 et Lys132, le domaine C-terminal du FGF1 est riche en acides aminés basiques qui pourraient médier sa liaison à l'ADN. L'étude de ce domaine par délétions successives pourrait ainsi nous permettre de déterminer s'il existe une région régulant l'activité transcriptionnelle du FGF1 et progresser ainsi dans la compréhension des mécanismes d'action nucléaires du FGF1.

Nous avons précédemment montré que la nucléarisation du FGF1 était nécessaire à ses activités anti-apoptotique et neurotrophique dans les cellules PC12. Dans les cellules SH-SY5Y, le FGF1 délété de sa séquence de nucléarisation N-terminale (FGF1^{ΔNLS}) ne possède pas d'activité anti-apoptotique, ce qui est en accord avec ce que nous avons précédemment observé dans les cellules PC12 (Rodriguez-Enfedaque *et al.*, 2009) et indique que ce mécanisme semble être conservé dans une lignée cellulaire neuronale humaine. Cependant, bien que la localisation de cette forme mutante FGF1^{ΔNLS} dans les cellules PC12 soit clairement cytoplasmique, des mises au point supplémentaires du protocole de fractionnement subcellulaire sont nécessaires pour clarifier sa localisation dans les cellules SH-SY5Y. L'expression de nouvelles formes mutantes (FGF1^{NLS1m}, FGF1^{NLS2m}, FGF1^{NESm}) n'a pour le moment pas encore permis de résoudre ce problème. Une nouvelle forme doublement mutée dans les deux séquences NLS (FGF1^{NLS1m-NLS2m}) sera générée et exprimée dans les cellules SH-SY5Y, et sa localisation et son activité anti-apoptotique seront étudiées.

Nous avons formulé l'hypothèse que le FGF1 pourrait agir comme un facteur ou co-facteur de transcription, de façon dépendante ou non de p53 avec qui il interagit. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine par un anticorps dirigé contre le FGF1 sont en cours pour déterminer si le FGF1 peut se lier à la chromatine. Si ces premières expériences sont en accord avec nos hypothèses, elles seront suivies d'une étude par ChIP-Seq qui nous permettra d'identifier les gènes cibles du FGF1. En parallèle, nous mènerons des expériences de ChIP-PCR ciblant les gènes les plus fortement régulés par le FGF1 identifiés par notre étude par RNA-Seq.

D'autre part, les résultats préliminaires de l'analyse transcriptomique par RNA-Seq des régulations induites par le FGF1 et/ou p53 que j'ai initiée dans les cellules PC12 vont nous permettre de progresser dans la compréhension des mécanismes d'action nucléaires du FGF1. Plusieurs milliers de gènes sont significativement régulés par le FGF1 et/ou p53. Nous explorerons les pistes ainsi ouvertes en portant une attention particulière aux facteurs de transcription et acteurs des voies de signalisation. En effet, les résultats de l'étude RNA-Seq ainsi que les premiers tests préliminaires de validation par RT-PCR et notre analyse bibliographique nous ont amené à nous intéresser plus particulièrement aux facteurs de transcription EGR-1 et à la famille ETS (Etv1), ainsi qu'aux voies de signalisation JAK/STAT et Wnt. Nous compléterons l'exploitation des résultats de RNA-Seq par une

analyse des réseaux de gènes régulés *via* par exemple le logiciel open-source Cytoscape. Cette analyse nous permettra d'affiner les voies à explorer, d'établir des liaisons que notre analyse bibliographique n'avait pas identifiées.

Les régulations transcriptionnelles observées et induites par le FGF1 nous permettent de poser deux hypothèses :

- le FGF1 se fixe directement sur les promoteurs des gènes qu'il régule. Les expériences de CHIP nous permettront d'approfondir cette piste. Les analyses cinétiques plus fines de l'expression de gènes candidats issus de notre étude par RNA-Seq nous permettront de cibler ceux étant régulés plus précocément par le FGF1 et pouvant ainsi être des cibles transcriptionnelles directes du FGF1.
- le FGF1 régule la transcription en interagissant avec d'autres facteurs de transcription et en modulant leurs activités transcriptionnelles. Nous pourrions analyser les séquences de promoteurs des gènes régulés par le FGF1 et identifiés par RNA-Seq à la recherche de séquences consensus connues ciblées par des facteurs de transcription comme EGR-1 par exemple. Dans ce cas, nous envisagerons d'analyser par ChIP-Seq la fixation de ces facteurs de transcription à la chromatine et de déterminer si leur fixation peut être modifiée par la surexpression du FGF1.

En plus de la nécessité d'étendre notre étude cinétique, notre étude par RNA-Seq ne portait que sur une seule lignée cellulaire (PC12) ce qui rend les résultats plus difficiles à analyser. Réaliser ce type d'étude en parallèle sur les cellules PC12 et les lignées cellulaires de neuroblastome SH-SY5Y et N2a nous permettra de cibler plus facilement les régulations importantes pour les activités intracrines du FGF1. En effet, dans les cellules SH-SY5Y, le FGF1 présente la même activité anti-apoptotique que dans les cellules PC12, et est régulée de la même façon par sa phosphorylation, mais le FGF1 ne semble pas y posséder d'activité de différenciation évidente contrairement aux cellules PC12. De plus, le FGF1 ne possède pas d'activité de différenciation ou de survie dans les cellules de souris N2a. Ainsi, l'étude menée en parallèle sur ces trois lignées cellulaires permettra d'une part d'éliminer les régulations liées à la différenciation (PC12 vs SH-SY5Y), et d'autre part de ne retenir que les régulations communes aux cellules PC12 et SH-SY5Y par opposition à celles induites dans les cellules N2a, et qui seraient donc impliquées dans l'activité anti-apoptotique du FGF1.

Dans les neuroblastomes, la voie p53 est la voie principale de mort cellulaire et p53 n'y est que très rarement muté, ce qui suggère qu'il existe des modifications en amont de cette voie. Le rôle du FGF1 n'avait jamais été étudié dans ce modèle. Au vu de l'activité anti-apoptotique du FGF1 dans les

cellules SH-SY5Y, et étant les premiers à avoir montré un mode d'action intracrine de ce facteur dans un modèle de neuroblastome, il serait intéressant de vérifier si le FGF1 est un facteur impliqué dans la transformation tumorale des neuroblastomes. L'expression du FGF1 n'a pas été étudiée dans les neuroblastomes, nous souhaitons donc initier une collaboration avec une équipe de bio-informatique afin de réaliser une méta-analyse des études transcriptomiques déjà menées sur différents modèles de neuroblastomes (tumeurs primaires et lignées) pour identifier d'éventuelles dérégulations de l'expression du FGF1 et leurs corrélations avec la progression tumorale.

De nombreux facteurs de croissance et/ou leurs récepteurs peuvent être nucléarisés et agir par des voies intracrines et nucléaires, non seulement dans la famille des FGFs/FGFRs (Arese *et al.*, 1999; Beenken and Mohammadi, 2009; Bryant and Stow, 2005; Bugler *et al.*, 1991; Ornitz and Itoh, 2015; Radulescu, 2015; Stachowiak *et al.*, 2007; Terranova *et al.*, 2015), mais également dans d'autres familles de facteurs de croissance comme EGF/EGFR (Brand *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2009; Liccardi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012b), IGF1/IGF1R (Aleksic *et al.*, 2010; Packham *et al.*, 2015; Sarfstein *et al.*, 2012; Warsito *et al.*, 2012) ou VEGF/VEGFR (Domingues *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2007). Dans la plupart de ces études, la nucléarisation de ces facteurs de croissance et/ou de leurs récepteurs est associée à une prolifération cellulaire et/ou tumorale plus élevée, à une augmentation de la survie cellulaire et/ou à une résistance aux chimiothérapies. Dans les neuroblastomes, il a été montré que l'expression de quelques-uns de ces facteurs et/ou de leurs récepteurs était régulée, cependant les potentielles voies d'action intracrine et nucléaires de ces facteurs et récepteurs n'y ont pas été étudiées. D'autre part, les mécanismes d'action intracrines du FGF1 que nous avons décrit dans nos différents modèles pourraient être généralisés à d'autres types de cancers (prostate, ovaire, sein ou poumon) où une corrélation a été établie entre le niveau d'expression du FGF1 et la sévérité du diagnostic (Dorkin *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2015; Slattery *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2012).

Plus particulièrement, sa surexpression dans le cancer de l'ovaire est corrélée à un mauvais pronostic vital pour les patientes et à une chimiorésistance, et augmente la progression tumorale (King *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2012). Des travaux sont en cours dans l'équipe pour chercher à comprendre comment le FGF1 pourrait médier la chimiorésistance dans ces tumeurs. Les résultats préliminaires montrent que la surexpression du FGF1 dans les cellules ovariennes COV434 les protège de l'apoptose induite par des stress génotoxiques (étoposide et cisplatine). L'équipe travaille également sur la lignée humaine A2780, issue d'un adénocarcinome ovarien provenant d'une patiente n'ayant pas reçu de cisplatine. Une lignée dérivée, la lignée A2780CIS, a subi un traitement chronique au cisplatine, ce qui l'a rendue résistante à cet agent de chimiothérapie. De manière intéressante, les cellules A2780CIS surexpriment le *FGF1*. Le gène *FGF1* a été invalidé dans ces cellules *via* CRISPR/Cas9 afin de déterminer si le FGF1 est requis pour la maintenance du phénotype

de chimiorésistance. L'étude de l'impact de cette invalidation sur la survie cellulaire est actuellement en cours. Enfin, pour progresser dans la compréhension des mécanismes par lequel le FGF1 induirait la résistance à la chimiothérapie, une approche globale basée sur un criblage par ARN interférence sera prochainement mise en œuvre dans ce modèle. L'objectif de ce crible sera d'identifier des siRNA permettant de supprimer le phénotype de chimiorésistance induite par le FGF1.

Bibliographie

- Abarzua, F., Sakaguchi, M., Takaishi, M., Nasu, Y., Kurose, K., Ebara, S., Miyazaki, M., Namba, M., Kumon, H., and Huh, N. (2005). Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of c-Jun-NH2-kinase. *Cancer Res.* *65*, 9617–9622.
- Abraham, J.A., Mergia, A., Whang, J.L., Tumolo, A., Friedman, J., Hjerrild, K.A., Gospodarowicz, D., and Fiddes, J.C. (1986a). Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* *233*, 545–548.
- Abraham, J.A., Whang, J.L., Tumolo, A., Mergia, A., Friedman, J., Gospodarowicz, D., and Fiddes, J.C. (1986b). Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J* *5*, 2523–2528.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., and Akey, C.W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* *9*, 423–432.
- ADHR Consortium (2000). Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat. Genet.* *26*, 345–348.
- Adimoolam, S., and Ford, J.M. (2002). p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 12985–12990.
- Akiyama, N., Nabemoto, M., Hatori, Y., Nakamura, H., Hirabayashi, T., Fujino, H., Saito, T., and Murayama, T. (2006). Up-regulation of cytosolic phospholipase A2 α expression by N,N-diethylthiocarbamate in PC12 cells; involvement of reactive oxygen species and nitric oxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *215*, 218–227.
- Alam, K.Y., Frostholm, A., Hackshaw, K.V., Evans, J.E., Rotter, A., and Chiu, I.M. (1996). Characterization of the 1B promoter of fibroblast growth factor 1 and its expression in the adult and developing mouse brain. *J Biol Chem* *271*, 30263–30271.
- Aleksic, T., Chitnis, M.M., Perestenko, O.V., Gao, S., Thomas, P.H., Turner, G.D., Protheroe, A.S., Howarth, M., and Macaulay, V.M. (2010). Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor Translocates to the Nucleus of Human Tumor Cells. *Cancer Res.* *70*, 6412–6419.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *51*, 786–794.
- Alterio, J., Courtois, Y., Robelin, J., Bechet, D., and Martelly, I. (1990). Acidic and basic fibroblast growth factor mRNAs are expressed by skeletal muscle satellite cells. *Biochem Biophys Res Commun* *166*, 1205–1212.
- Amatruda, T.T., Sidell, N., Ranyard, J., and Koeffler, H.P. (1985). Retinoic acid treatment of human neuroblastoma cells is associated with decreased N-myc expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *126*, 1189–1195.
- Ambrosetti, D., Holmes, G., Mansukhani, A., and Basilico, C. (2008). Fibroblast growth factor signaling uses multiple mechanisms to inhibit Wnt-induced transcription in osteoblasts. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 4759–4771.
- Ameyar, M., Wisniewska, M., and Weitzman, J.B. (2003). A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* *85*, 747–752.
- Anastas, J.N., and Moon, R.T. (2012). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 11–26.
- Annis, M.G., Soucie, E.L., Dlugosz, P.J., Cruz-Aguado, J.A., Penn, L.Z., Leber, B., and Andrews, D.W. (2005). Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J.* *24*, 2096–2103.

- Antoine, M., Reimers, K., Dickson, C., and Kiefer, P. (1997). Fibroblast growth factor 3, a protein with dual subcellular localization, is targeted to the nucleus and nucleolus by the concerted action of two nuclear localization signals and a nucleolar retention signal. *J. Biol. Chem.* *272*, 29475–29481.
- Antoine, M., Reimers, K., Wirz, W., Gressner, A.M., Müller, R., and Kiefer, P. (2005). Fibroblast growth factor 3, a protein with a dual subcellular fate, is interacting with human ribosomal protein S2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *338*, 1248–1255.
- Araya, K., Fukumoto, S., Backenroth, R., Takeuchi, Y., Nakayama, K., Ito, N., Yoshii, N., Yamazaki, Y., Yamashita, T., Silver, J., *et al.* (2005). A Novel Mutation in Fibroblast Growth Factor 23 Gene as a Cause of Tumoral Calcinosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *90*, 5523–5527.
- Arber, S., Ladle, D.R., Lin, J.H., Frank, E., and Jessell, T.M. (2000). ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons. *Cell* *101*, 485–498.
- Arend, R.C., Londoño-Joshi, A.I., Straughn, J.M., and Buchsbaum, D.J. (2013). The Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer: A review. *Gynecol. Oncol.* *131*, 772–779.
- Arese, M., Chen, Y., Florkiewicz, R.Z., Gualandris, A., Shen, B., and Rifkin, D.B. (1999). Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals. *Mol. Biol. Cell* *10*, 1429–1444.
- Arias-Lopez, C., Lazaro-Trueba, I., Kerr, P., Lord, C.J., Dexter, T., Iravani, M., Ashworth, A., and Silva, A. (2006). p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Rep.* *7*, 219–224.
- Armelin, H.A. (1973). Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* *70*, 2702–2706.
- Arnaud, E., Touriol, C., Boutonnet, C., Gensac, M.-C., Vagner, S., Prats, H., and Prats, A.-C. (1999). A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 505–514.
- Ashcroft, M., Ludwig, R.L., Woods, D.B., Copeland, T.D., Weber, H.O., MacRae, E.J., and Vousden, K.H. (2002). Phosphorylation of HDM2 by Akt. *Oncogene* *21*, 1955–1962.
- Babajko, S., Leneuve, P., Loret, C., and Binoux, M. (1997). IGF-binding protein-6 is involved in growth inhibition in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: its production is both IGF- and cell density-dependent. *J. Endocrinol.* *152*, 221–227.
- Bailly, K., SOULET, F., LEROY, D., AMALRIC, F., and BOUCHE, G. (2000). Uncoupling of cell proliferation and differentiation activities of basic fibroblast growth factor. *FASEB J.* *14*, 333–344.
- Balagurumorthy, P., Sakamoto, H., Lewis, M.S., Zambrano, N., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Appella, E., and Harrington, R.E. (1995). Four p53 DNA-binding domain peptides bind natural p53-response elements and bend the DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 8591–8595.
- Baldin, V., Roman, A.-M., Bosc-Bierne, I., Amalric, F., and Bouche, G. (1990). Translocation of bFGF to the nucleus is G1 phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells. *EMBO J.* *9*, 1511.
- Balsara, R.D., Castellino, F.J., and Ploplis, V.A. (2006). A Novel Function of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Modulation of the AKT Pathway in Wild-type and Plasminogen Activator Inhibitor-1-deficient Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 22527–22536.
- Baptiste, N., Friedlander, P., Chen, X., and Prives, C. (2002). The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells. *Oncogene* *21*, 9–21.

- Barbacid, M. (1987). Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* *56*, 779–827.
- Barbieri, E. (2006). MDM2 inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death. *Mol. Cancer Ther.* *5*, 2358–2365.
- Bargonetti, J., Manfredi, J.J., Chen, X., Marshak, D.R., and Prives, C. (1993). A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev.* *7*, 2565–2574.
- Barritault, D., Arruti, C., and Courtois, Y. (1981). Is there a ubiquitous growth factor in the eye? *Differentiation* *18*, 29–42.
- Becker-Herman, S., Lantner, F., and Shachar, I. (2002). Id2 Negatively Regulates B Cell Differentiation in the Spleen. *J. Immunol.* *168*, 5507–5513.
- Beenken, A., and Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* *8*, 235–253.
- de Belle, I., Huang, R.-P., Fan, Y., Liu, C., Mercola, D., and Adamson, E.D. (1999). p53 and Egr-1 additively suppress transformed growth in HT1080 cells but Egr-1 counteracts p53-dependent apoptosis. *Oncogene* *18*.
- Bender, A., Opel, D., Naumann, I., Kappler, R., Friedman, L., Von Schweinitz, D., Debatin, K.M., and Fulda, S. (2011). PI3K inhibitors prime neuroblastoma cells for chemotherapy by shifting the balance towards pro-apoptotic Bcl-2 proteins and enhanced mitochondrial apoptosis. *Oncogene* *30*, 494–503.
- Bergeaud, M., Mathieu, L., Guillaume, A., Moll, U., Mignotte, B., Le Floch, N., Vayssière, J.-L., and Rincheval, V. (2013). Mitochondrial p53 mediates a transcription-independent regulation of cell respiration and interacts with the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase. *Cell Cycle* *12*, 2781–2793.
- Berger, W., Setinek, U., Mohr, T., Kindas-Mügge, I., Vetterlein, M., Dekan, G., Eckersberger, F., Caldas, C., and Micksche, M. (1999). Evidence for a role of FGF-2 and FGF receptors in the proliferation of non-small cell lung cancer cells. *Int. J. Cancer* *83*, 415–423.
- Bernett, M.J., Somasundaram, T., and Blaber, M. (2004). An atomic resolution structure for human fibroblast growth factor 1. *Proteins* *57*, 626–634.
- Beroukhi, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., *et al.* (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* *463*, 899–905.
- Bikfalvi, A., Dupuy, E., Inyang, A.L., Fayein, N., Leseche, G., Courtois, Y., and Tobelem, G. (1989). Binding, internalization, and degradation of basic fibroblast growth factor in human microvascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* *181*, 75–84.
- Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., Quarto, N., Mignatti, P., and Rifkin, D.B. (1995). Differential modulation of cell phenotype by different molecular weight forms of basic fibroblast growth factor: possible intracellular signaling by the high molecular weight forms. *J. Cell Biol.* *129*, 233–243.
- Billottet, C., Tuefferd, M., Gentien, D., Rapinat, A., Thiery, J.-P., Broët, P., and Jouanneau, J. (2008). Modulation of several waves of gene expression during FGF-1 induced epithelial-mesenchymal transition of carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* *104*, 826–839.
- Birrer, M.J., Johnson, M.E., Hao, K., Wong, K.K., Park, D.C., Bell, A., Welch, W.R., Berkowitz, R.S., and Mok, S.C. (2007). Whole genome oligonucleotide-based array comparative genomic

hybridization analysis identified fibroblast growth factor 1 as a prognostic marker for advanced-stage serous ovarian adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 25, 2281–2287.

- Boatright, K.M., and Salvesen, G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15, 725–731.
- Bober, J., Olsnes, S., Kostas, M., Bogacz, M., Zakrzewska, M., and Otlewski, J. (2016). Identification of new FGF1 binding partners-Implications for its intracellular function: On the Intracellular Function of FGF1. *IUBMB Life*.
- Bode, A.M., and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 4, 793–805.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., and Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 270, 7795–7798.
- Bonnet, H., Filhol, O., Truchet, I., Brethenou, P., Cochet, C., Amalric, F., and Bouche, G. (1996). Fibroblast growth factor-2 binds to the regulatory β subunit of CK2 and directly stimulates CK2 activity toward nucleolin. *J Biol Chem* 271, 24781–24787.
- Bos, J.L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682–4689.
- Bossard, C., Laurell, H., Van den Berghe, L., Meunier, S., Zanibellato, C., and Prats, H. (2003). Translokine is an intracellular mediator of FGF-2 trafficking. *Nat Cell Biol* 5, 433–439.
- Bouche, G., Gas, N., Prats, H., Baldin, V., Tauber, J.P., Teissié, J., and Amalric, F. (1987). Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0-G1 transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 6770–6774.
- Bouleau, S., Grimal, H., Rincheval, V., Godefroy, N., Mignotte, B., Vayssiere, J.L., and Renaud, F. (2005). FGF1 inhibits p53-dependent apoptosis and cell cycle arrest via an intracrine pathway. *Oncogene* 24, 7839–7849.
- Bouleau, S., Parvu-Ferecatu, I., Rodriguez-Enfedaque, A., Rincheval, V., Grimal, H., Mignotte, B., Vayssiere, J.L., and Renaud, F. (2007). Fibroblast Growth Factor 1 inhibits p53-dependent apoptosis in PC12 cells. *Apoptosis* 12, 1377–1387.
- Bourdon, J.-C. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* 19, 2122–2137.
- Brady, C.A., and Attardi, L.D. (2010). p53 at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 2527–2532.
- Brand, T.M., Iida, M., Li, C., and Wheeler, D.L. (2011). The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov. Med.* 12, 419.
- Brand, T.M., Iida, M., Luthar, N., Starr, M.M., Huppert, E.J., and Wheeler, D.L. (2013). Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother. Oncol.* 108, 370–377.
- Bredel, M., Pollack, I.F., Campbell, J.W., and Hamilton, R.L. (1997). Basic fibroblast growth factor expression as a predictor of prognosis in pediatric high-grade gliomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 3, 2157–2164.
- Brooks, C.L., and Gu, W. (2011). The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein Cell* 2, 456–462.
- Brooks, A.N., Kilgour, E., and Smith, P.D. (2012). Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clin Cancer Res* 18, 1855–1862.
- Brouwer, J.M., Westphal, D., Dewson, G., Robin, A.Y., Uren, R.T., Bartolo, R., Thompson, G.V., Colman, P.M., Kluck, R.M., and Czabotar, P.E. (2014). Bak Core and Latch Domains Separate

- during Activation, and Freed Core Domains Form Symmetric Homodimers. *Mol. Cell* 55, 938–946.
- Bryant, D.M., and Stow, J.L. (2005). Nuclear translocation of cell-surface receptors: lessons from fibroblast growth factor. *Traffic* 6, 947–954.
- Buehler, A., Martire, A., Strohm, C., Wolfram, S., Fernandez, B., Palmen, M., Wehrens, X.H.T., Doevendans, P.A., Franz, W.M., Schaper, W., *et al.* (2002). Angiogenesis-independent cardioprotection in FGF-1 transgenic mice. *Cardiovasc. Res.* 55, 768–777.
- Bugler, B., Amalric, F., and Prats, H. (1991). Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 11, 573–577.
- Burdine, R.D., Chen, E.B., Kwok, S.F., and Stern, M.J. (1997). egl-17 encodes an invertebrate fibroblast growth factor family member required specifically for sex myoblast migration in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 2433–2437.
- Burgess, W.H., Mehlman, T., Marshak, D.R., Fraser, B.A., and Maciag, T. (1986). Structural evidence that endothelial cell growth factor beta is the precursor of both endothelial cell growth factor alpha and acidic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 7216–7220.
- Burgess, W.H., Shaheen, A.M., Ravera, M., Jaye, M., Donohue, P.J., and Winkles, J.A. (1990). Possible dissociation of the heparin-binding and mitogenic activities of heparin-binding (acidic fibroblast) growth factor-1 from its receptor-binding activities by site-directed mutagenesis of a single lysine residue. *J Cell Biol* 111, 2129–2138.
- Campbell, H.G., Mehta, R., Neumann, A.A., Rubio, C., Baird, M., Slatter, T.L., and Braithwaite, A.W. (2013). Activation of p53 following ionizing radiation, but not other stressors, is dependent on the proline-rich domain (PRD). *Oncogene* 32, 827–836.
- Caricasole, A., Ferraro, T., Iacovelli, L., Barletta, E., Caruso, A., Melchiorri, D., Terstappen, G.C., and Nicoletti, F. (2003). Functional Characterization of WNT7A Signaling in PC12 Cells: INTERACTION WITH A FZD5-LRP6 RECEPTOR COMPLEX AND MODULATION BY DICKKOPF PROTEINS. *J. Biol. Chem.* 278, 37024–37031.
- Carmo, C.R., Lyons-Lewis, J., Seckl, M.J., and Costa-Pereira, A.P. (2011). A Novel Requirement for Janus Kinases as Mediators of Drug Resistance Induced by Fibroblast Growth Factor-2 in Human Cancer Cells. *PLoS ONE* 6, e19861.
- Caron de Fromental, C., and Soussi, T. (1992). TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes. Chromosomes Cancer* 4, 1–15.
- Carr, J., Bell, E., Pearson, A.D., Kees, U.R., Beris, H., Lunec, J., and Tweddle, D.A. (2006). Increased frequency of aberrations in the p53/MDM2/p14ARF pathway in neuroblastoma cell lines established at relapse. *Cancer Res.* 66, 2138–2145.
- Carracedo, A., and Pandolfi, P.P. (2008). The PTEN–PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 27, 5527–5541.
- Carreira, C.M., Landriscina, M., Bellum, S., Prudovsky, I., and Maciag, T. (2001). The comparative release of FGF1 by hypoxia and temperature stress. *Growth Factors* 18, 277–285.
- Carr-Wilkinson, J., O’Toole, K., Wood, K.M., Challen, C.C., Baker, A.G., Board, J.R., Evans, L., Cole, M., Cheung, N.-K.V., Boos, J., *et al.* (2010). High Frequency of p53/MDM2/p14ARF Pathway Abnormalities in Relapsed Neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* 16, 1108–1118.
- Cartron, P.-F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M., and Juin, P. (2004). The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol. Cell* 16, 807–818.

- Casciano, I., Mazzocco, K., Boni, L., Pagnan, G., Banelli, B., Allemanni, G., Ponzoni, M., Tonini, G.P., and Romani, M. (2002). Expression of Np73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ* 9, 246–251.
- Casciola-Rosen, L.A., Anhalt, G.J., and Rosen, A. (1995). DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J. Exp. Med.* 182, 1625–1634.
- Cattelani, S., Defferrari, R., Marsilio, S., Bussolari, R., Candini, O., Corradini, F., Ferrari-Amorotti, G., Guerzoni, C., Pecorari, L., Menin, C., *et al.* (2008). Impact of a Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene on Neuroblastoma Development and Aggressiveness: Results of a Pilot Study on 239 Patients. *Clin. Cancer Res.* 14, 3248–3253.
- Caulin, C., Salvesen, G.S., and Oshima, R.G. (1997). Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J. Cell Biol.* 138, 1379–1394.
- Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Wu, Q., Dataa, P., Alnemri, E.S., and Shi, Y. (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104, 769–780.
- Chambéry, D., Mohseni-Zadeh, S., de Gallé, B., and Babajko, S. (1999). N-myc regulation of type I insulin-like growth factor receptor in a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res.* 59, 2898–2902.
- Chang, J., Kim, D.-H., Lee, S.W., Choi, K.Y., and Sung, Y.C. (1995). Transactivation Ability of p53 Transcriptional Activation Domain Is Directly Related to the Binding Affinity to TATA-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 270, 25014–25019.
- Chang, Y.-J., Chen, K.-W., Chen, C.-J., Lin, M.-H., Sun, Y.-J., Lee, J.-L., Chiu, I.-M., and Chen, L. (2014). SH2B1 Interacts with STAT3 and Enhances Fibroblast Growth Factor 1-Induced Gene Expression during Neuronal Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1003–1019.
- Chaudhary, A.K., Yadav, N., Bhat, T.A., O'Malley, J., Kumar, S., and Chandra, D. (2016). A potential role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in mitochondrial membrane permeabilization and its implication in cancer therapy. *Drug Discov. Today* 21, 38–47.
- Chehab, N.H., Malikzay, A., Stavridi, E.S., and Halazonetis, T.D. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 13777–13782.
- Chen, J., and Sadowski, I. (2005). Identification of the mismatch repair genes PMS2 and MLH1 as p53 target genes by using serial analysis of binding elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4813–4818.
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Differential Targeting of Prosurvival Bcl-2 Proteins by Their BH3-Only Ligands Allows Complementary Apoptotic Function. *Mol. Cell* 17, 393–403.
- Chen, L., Iraci, N., Gherardi, S., Gamble, L.D., Wood, K.M., Perini, G., Lunec, J., and Tweddle, D.A. (2010). p53 Is a Direct Transcriptional Target of MYCN in Neuroblastoma. *Cancer Res.* 70, 1377–1388.
- Chen, M.-S., Lin, H.-K., Chiu, H., Lee, D.-C., Chung, Y.-F., and Chiu, I.-M. (2014). Human FGF1 promoter is active in ependymal cells and dopaminergic neurons in the brains of F1B-GFP transgenic mice: Human FGF1 Promoter in Transgenic Mice. *Dev. Neurobiol.* n/a-n/a.
- Chen, X., Zheng, Y., Zhu, J., Jiang, J., and Wang, J. (2001). p73 is transcriptionally regulated by DNA damage, p53, and p73. *Oncogene* 20, 769–774.

- Chen, Y., Kelm, R.J., Budd, R.C., Sobel, B.E., and Schneider, D.J. (2004). Inhibition of apoptosis and caspase-3 in vascular smooth muscle cells by plasminogen activator inhibitor type-1. *J. Cell. Biochem.* *92*, 178–188.
- Chène, P. (2001). The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene* *20*.
- Cheung, N.-K.V., and Dyer, M.A. (2013). Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 397–411.
- Cheung, H.H., Plenchette, S., Kern, C.J., Mahoney, D.J., and Korneluk, R.G. (2008). The RING domain of ciAP1 mediates the degradation of RING-bearing inhibitor of apoptosis proteins by distinct pathways. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2729–2740.
- Chi, Y.-H., Kumar, T.K.S., Kathir, K.M., Lin, D.-H., Zhu, G., Chiu, I.-M., and Yu, C. (2002). Investigation of the structural stability of the human acidic fibroblast growth factor by hydrogen-deuterium exchange. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 15350–15359.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* *81*, 505–512.
- Chipuk, J.E. (2004). Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Science* *303*, 1010–1014.
- Chiu, I.M., Touhalisky, K., and Baran, C. (2001). Multiple controlling mechanisms of FGF1 gene expression through multiple tissue-specific promoters. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* *70*, 155–174.
- Choi, D.Y., Toledo-Aral, J.J., Lin, H.Y., Ischenko, I., Medina, L., Safo, P., Mandel, G., Levinson, S.R., Haleboua, S., and Hayman, M.J. (2001). Fibroblast growth factor receptor 3 induces gene expression primarily through Ras-independent signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.* *276*, 5116–5122.
- Choi, J.H., Ryu, S.H., and Suh, P.G. (2007). On/off-regulation of phospholipase C-gamma 1-mediated signal transduction. *Adv Enzyme Regul* *47*, 104–116.
- Chotani, M.A., and Chiu, I.M. (1997). Differential regulation of human fibroblast growth factor 1 transcripts provides a distinct mechanism of cell-specific growth factor expression. *Cell Growth Differ* *8*, 999–1013.
- Chotani, M.A., Payson, R.A., Winkles, J.A., and Chiu, M. (1995). Human fibroblast growth factor 1 gene expression in vascular smooth muscle cells is modulated via an alternate promoter in response to serum and phorbol ester. *Nucleic Acids Res.* *23*, 434–441.
- Chotani, M.A., Touhalisky, K., and Chiu, I.M. (2000). The small GTPases Ras, Rac, and Cdc42 transcriptionally regulate expression of human fibroblast growth factor 1. *J Biol Chem* *275*, 30432–30438.
- Chou, A.H., Zheng, S., Itsukaichi, T., and Howard, B.D. (2000). Wnt-1 inhibits nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells by preventing the induction of some but not all late-response genes. *Mol. Brain Res.* *77*, 232–245.
- Chow, K.-H., Factor, R.E., and Ullman, K.S. (2012). The nuclear envelope environment and its cancer connections. *Nat. Rev. Cancer*.
- Ciccarone, V., Spengler, B.A., Meyers, M.B., Biedler, J.L., and Ross, R.A. (1989). Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res.* *49*, 219–225.

- Citores, L., Wesche, J., Kolpakova, E., and Olsnes, S. (1999). Uptake and intracellular transport of acidic fibroblast growth factor: evidence for free and cytoskeleton-anchored fibroblast growth factor receptors. *Mol Biol Cell* *10*, 3835–3848.
- Citores, L., Khnykin, D., Sorensen, V., Wesche, J., Klingenberg, O., Wiedlocha, A., and Olsnes, S. (2001). Modulation of intracellular transport of acidic fibroblast growth factor by mutations in the cytoplasmic receptor domain. *J Cell Sci* *114*, 1677–1689.
- Claus, P., Doring, F., Gringel, S., Muller-Ostermeyer, F., Fuhlrott, J., Kraft, T., and Grothe, C. (2003). Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein. *J. Biol. Chem.* *278*, 479–485.
- Claus, P., BRUNS, A., and Grothe, C. (2004). Fibroblast growth factor-223 binds directly to the survival of motoneuron protein and is associated with small nuclear RNAs. *Biochem J* *384*, 559–565.
- Coebergh, J.A., van de Putte, D.E.F., Snoeck, I.N., Ruivenkamp, C., van Haeringen, A., and Smit, L.M. (2014). A new variable phenotype in spinocerebellar ataxia 27 (SCA 27) caused by a deletion in the FGF14 gene. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* *18*, 413–415.
- Cohen-Jonathan, E., Toulas, C., Monteil, S., Couderc, B., Maret, A., and Bard, J.-J. (1997). Radioresistance Induced by the High Molecular Forms of the Basic Fibroblast Growth Factor Is Associated with an Increased G2 Delay and a Hyperphosphorylation of p34CDC2 in HeLa Cells. *Cancer Res.* *57*, 1364–1370.
- Collis, S.J., Tighe, A., Scott, S.D., Roberts, S.A., Hendry, J.H., and Margison, G.P. (2001). Ribozyme minigene-mediated RAD51 down-regulation increases radiosensitivity of human prostate cancer cells. *Nucleic Acids Res.* *29*, 1534–1538.
- Conte, C., Riant, E., Toutain, C., Pujol, F., Arnal, J.-F., Lenfant, F., and Prats, A.-C. (2008). FGF2 Translationally Induced by Hypoxia Is Involved in Negative and Positive Feedback Loops with HIF-1 α . *PLoS ONE* *3*, e3078.
- Conte, C., Ainaoui, N., Delluc-Clavieres, A., Khoury, M.P., Azar, R., Pujol, F., Martineau, Y., Pyronnet, S., and Prats, A.C. (2009). Fibroblast growth factor 1 induced during myogenesis by a transcription-translation coupling mechanism. *Nucleic Acids Res* *37*, 5267–5278.
- Coope, R.C., Browne, P.J., Yiangou, C., Bansal, G.S., Walters, J., Groome, N., Shousha, S., Johnston, C.L., Coombes, R.C., and Gomm, J.J. (1997). The location of acidic fibroblast growth factor in the breast is dependent on the activity of proteases present in breast cancer tissue. *Br J Cancer* *75*, 1621–1630.
- Costello, B., Meymandi, A., and Freeman, J.A. (1990). Factors influencing GAP-43 gene expression in PC12 pheochromocytoma cells. *J. Neurosci.* *10*, 1398–1406.
- Cotlarciuc, I., Malik, R., Holliday, E.G., Ahmadi, K.R., Paré, G., Psaty, B.M., Fornage, M., Hasan, N., Rinne, P.E., Ikram, M.A., *et al.* (2014). Effect of genetic variants associated with plasma homocysteine levels on stroke risk. *Stroke* *45*, 1920–1924.
- Cregan, S.P., Dawson, V.L., and Slack, R.S. (2004). Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* *23*, 2785–2796.
- Croce, M., Corrias, M.V., Rigo, V., and Ferrini, S. (2015). New immunotherapeutic strategies for the treatment of neuroblastoma. *Immunotherapy* *7*, 285–300.
- Crook, N.E., Clem, R.J., and Miller, L.K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.* *67*, 2168–2174.
- Cui, H., Schroering, A., and Ding, H.-F. (2002). p53 Mediates DNA Damaging Drug-induced Apoptosis through a Caspase-9-dependent Pathway in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells 1 Supported in part

by a grant from the Ohio Cancer Research Associates and Howard Temin Award CA-78534 from the National Cancer Institute, NIH. 1. *Mol. Cancer Ther.* 1, 679–686.

- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2013a). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 49–63.
- Czabotar, P.E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Yao, S., Robin, A.Y., Smith, B.J., *et al.* (2013b). Bax Crystal Structures Reveal How BH3 Domains Activate Bax and Nucleate Its Oligomerization to Induce Apoptosis. *Cell* 152, 519–531.
- Dai, H., Smith, A., Meng, X.W., Schneider, P.A., Pang, Y.-P., and Kaufmann, S.H. (2011). Transient binding of an activator BH3 domain to the Bak BH3-binding groove initiates Bak oligomerization. *J. Cell Biol.* 194, 39–48.
- Dai, H., Pang, Y.-P., Ramirez-Alvarado, M., and Kaufmann, S.H. (2014). Evaluation of the BH3-only Protein Puma as a Direct Bak Activator. *J. Biol. Chem.* 289, 89–99.
- Dai, H., Meng, W., and Kaufmann, S. (2016). BCL2 Family, Mitochondrial Apoptosis, and Beyond. *Cancer Transl. Med.* 2, 7.
- Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A., and Basilico, C. (2005). Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 233–247.
- Dang, C.V., and Lee, W.M. (1989). Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myb, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J. Biol. Chem.* 264, 18019–18023.
- Das, A., Banik, N.L., and Ray, S.K. (2006). Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to flavonoids. *Int. J. Cancer* 119, 2575–2585.
- Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B., and Greenberg, M.E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol. Cell* 6, 41–51.
- Datta, S.R., Ranger, A.M., Lin, M.Z., Sturgill, J.F., Ma, Y.-C., Cowan, C.W., Dikkes, P., Korsmeyer, S.J., and Greenberg, M.E. (2002). Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev. Cell* 3, 631–643.
- Deffie, A., Wu, H., Reinke, V., and Lozano, G. (1993). The tumor suppressor p53 regulates its own transcription. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3415–3423.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817–825.
- Delbridge, G.J., and Khachigian, L.M. (1997). FGF-1-induced platelet-derived growth factor-A chain gene expression in endothelial cells involves transcriptional activation by early growth response factor-1. *Circ. Res.* 81, 282–288.
- Delbridge, A.R.D., Grabow, S., Strasser, A., and Vaux, D.L. (2016). Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 16, 99–109.
- Delehedde, M., Seve, M., Sergeant, N., Wartelle, I., Lyon, M., Rudland, P.S., and Fernig, D.G. (2000). Fibroblast Growth Factor-2 Stimulation of p42/44MAPK Phosphorylation and IKB Degradation Is Regulated by Heparan Sulfate/Heparin in Rat Mammary Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 275, 33905–33910.
- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., and Old, L.J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2420–2424.

- Delmas, E., Jah, N., Pirou, C., Bouleau, S., Le Floch, N., Vayssière, J.-L., Mignotte, B., and Renaud, F. (2016). FGF1 C-terminal domain and phosphorylation regulate intracrine FGF1 signaling for its neurotrophic and anti-apoptotic activities. *Cell Death Dis.* 7, e2079.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J. Cell Biol.* 144, 891–901.
- Desire, L., Courtois, Y., and Jeanny, J.C. (1998). Suppression of fibroblast growth factors 1 and 2 by antisense oligonucleotides in embryonic chick retinal cells in vitro inhibits neuronal differentiation and survival. *Exp Cell Res* 241, 210–221.
- DeStefano, G.M., Fantauzzo, K.A., Petukhova, L., Kurban, M., Tadin-Strapps, M., Levy, B., Warburton, D., Cirulli, E.T., Han, Y., Sun, X., *et al.* (2013). Position effect on FGF13 associated with X-linked congenital generalized hypertrichosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 7790–7795.
- Devanna, P., Middelbeek, J., and Vernes, S.C. (2014). FOXP2 drives neuronal differentiation by interacting with retinoic acid signaling pathways. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Di Serio, C., Doria, L., Pellerito, S., Prudovsky, I., Micucci, I., Massi, D., Landriscina, M., Marchionni, N., Masotti, G., and Tarantini, F. (2008). The release of fibroblast growth factor-1 from melanoma cells requires copper ions and is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt intracellular signaling pathway. *Cancer Lett* 267, 67–74.
- Dobashi, Y., Bhattacharjee, R.N., Toyoshima, K., and Akiyama, T. (1996). Upregulation of the APC gene product during neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 479–483.
- Dobashi, Y., Katayama, K., Kawai, M., Akiyama, T., and Kameya, T. (2000). APC Protein Is Required for Initiation of Neuronal Differentiation in Rat Pheochromocytoma PC12 Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 685–691.
- Dodé, C., Levilliers, J., Dupont, J.-M., De Paepe, A., Le Dû, N., Soussi-Yanicostas, N., Coimbra, R.S., Delmaghani, S., Compain-Nouaille, S., Baverel, F., *et al.* (2003). Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat. Genet.* 33, 463–465.
- Domingues, I., Rino, J., Demmers, J.A.A., de Lanerolle, P., and Santos, S.C.R. (2011). VEGFR2 translocates to the nucleus to regulate its own transcription. *PLoS One* 6, e25668.
- Donato, N.J. (1998). Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis Stimulates p53 Accumulation and p21WAF1 Proteolysis in ME-180 Cells. *J. Biol. Chem.* 273, 5067–5072.
- Dorkin, T.J., Robinson, M.C., Marsh, C., Neal, D.E., and Leung, H.Y. (1999). aFGF immunoreactivity in prostate cancer and its co-localization with bFGF and FGF8. *J. Pathol.* 189, 564–569.
- Douc-Rasy, S., Barrois, M., Echeynne, M., Kaghad, M., Blanc, E., Raguenez, G., Goldschneider, D., Terrier-Lacombe, M.-J., Hartmann, O., Moll, U., *et al.* (2002). Δ N-p73 α accumulates in human neuroblastic tumors. *Am. J. Pathol.* 160, 631–639.
- Dreyfuss, J.L., Regatieri, C.V., Jarrouge, T.R., Cavalheiro, R.P., Sampaio, L.O., and Nader, H.B. (2009). Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *Acad Bras Cienc* 81, 409–429.
- Du, H., Wolf, J., Schafer, B., Moldoveanu, T., Chipuk, J.E., and Kuwana, T. (2011). BH3 Domains other than Bim and Bid Can Directly Activate Bax/Bak. *J. Biol. Chem.* 286, 491–501.
- Duchesne, L., Tissot, B., Rudd, T.R., Dell, A., and Fernig, D.G. (2006). N-Glycosylation of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Regulates Ligand and Heparan Sulfate Co-receptor Binding. *J. Biol. Chem.* 281, 27178–27189.

- Dudka, A.A., Sweet, S.M.M., and Heath, J.K. (2010). Signal transducers and activators of transcription-3 binding to the fibroblast growth factor receptor is activated by receptor amplification. *Cancer Res.* *70*, 3391–3401.
- Dufour, C., Guenou, H., Kaabeche, K., Bouvard, D., Sanjay, A., and Marie, P.J. (2008). FGFR2-Cbl interaction in lipid rafts triggers attenuation of PI3K/Akt signaling and osteoblast survival. *Bone* *42*, 1032–1039.
- Dumaz, N., Milne, D.M., and Meek, D.W. (1999). Protein kinase CK1 is a p53-threonine 18 kinase which requires prior phosphorylation of serine 15. *FEBS Lett.* *463*, 312–316.
- E, G., Cao, Y., Bhattacharya, S., Dutta, S., Wang, E., and Mukhopadhyay, D. (2012). Endogenous Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) Maintains Endothelial Cell Homeostasis by Regulating VEGF Receptor-2 Transcription. *J. Biol. Chem.* *287*, 3029–3041.
- Eckhart, L., Ban, J., Fischer, H., and Tschachler, E. (2000). Caspase-14: Analysis of Gene Structure and mRNA Expression during Keratinocyte Differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *277*, 655–659.
- Eckhart, L., Ballaun, C., Uthman, A., Kittel, C., Stichenwirth, M., Buchberger, M., Fischer, H., Sipos, W., and Tschachler, E. (2005). Identification and Characterization of a Novel Mammalian Caspase with Proapoptotic Activity. *J. Biol. Chem.* *280*, 35077–35080.
- Eckhart, L., Ballaun, C., Hermann, M., VandeBerg, J.L., Sipos, W., Uthman, A., Fischer, H., and Tschachler, E. (2008). Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Mol. Biol. Evol.* *25*, 831–841.
- Edwin, F., Singh, R., Endersby, R., Baker, S.J., and Patel, T.B. (2006). The Tumor Suppressor PTEN Is Necessary for Human Sprouty 2-mediated Inhibition of Cell Proliferation. *J. Biol. Chem.* *281*, 4816–4822.
- Eggert, A., Grotzer, M.A., Zuzak, T.J., Wiewrodt, B.R., Ho, R., Ikegaki, N., and Brodeur, G.M. (2001). Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res.* *61*, 1314–1319.
- Einarson, M.B., and Chao, M.V. (1995). Regulation of Id1 and its association with basic helix-loop-helix proteins during nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 4175–4183.
- Einsele-Scholz, S., Malmsheimer, S., Bertram, K., Stehle, D., Johanning, J., Manz, M., Daniel, P.T., Gillissen, B.F., Schulze-Osthoff, K., and Essmann, F. (2016). Bok is a genuine multi-BH-domain protein that triggers apoptosis in the absence of Bax and Bak. *J. Cell Sci.* *129*, 2213–2223.
- El Yazidi, I., Renaud, F., Laurent, M., Courtois, Y., and Boilly-Marer, Y. (1998). Production and oestrogen regulation of FGF1 in normal and cancer breast cells. *Biochim Biophys Acta* *1403*, 127–140.
- Elde, R., Cao, Y.H., Cintra, A., Brelje, T.C., Pelto-Huikko, M., Junttila, T., Fuxe, K., Pettersson, R.F., and Hokfelt, T. (1991). Prominent expression of acidic fibroblast growth factor in motor and sensory neurons. *Neuron* *7*, 349–364.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* *35*, 495–516.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* *391*, 43–50.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C., and Comella, J.X. (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived

neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J. Neurochem.* 75, 991–1003.

- Engelmann, G.L., Dionne, C.A., and Jaye, M.C. (1993). Acidic fibroblast growth factor and heart development. Role in myocyte proliferation and capillary angiogenesis. *Circ Res* 72, 7–19.
- Entesarian, M., Dahlqvist, J., Shashi, V., Stanley, C.S., Falahat, B., Reardon, W., and Dahl, N. (2007). FGF10 missense mutations in aplasia of lacrimal and salivary glands (ALSG). *Eur. J. Hum. Genet.* 15, 379–382.
- Esch, F., Ueno, N., Baird, A., Hill, F., Denoroy, L., Ling, N., Gospodarowicz, D., and Guillemin, R. (1985). Primary structure of bovine brain acidic fibroblast growth factor (FGF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133, 554–562.
- Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J.-L., and Mignotte, B. (2012). The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 942, 157–183.
- Estus, S., Zaks, W.J., Freeman, R.S., Gruda, M., Bravo, R., and Johnson, E.M. (1994). Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J. Cell Biol.* 127, 1717–1727.
- Eswarakumar, V.P., Lax, I., and Schlessinger, J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 139–149.
- Fagerström, S., Pählman, S., Gestblom, C., and Nånberg, E. (1996). Protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 775–785.
- Falardeau, J., Chung, W.C.J., Beenken, A., Raivio, T., Plummer, L., Sidis, Y., Jacobson-Dickman, E.E., Eliseenkova, A.V., Ma, J., Dwyer, A., *et al.* (2008). Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J. Clin. Invest.* 118, 2822–2831.
- Fang, H., Placencio, V.R., and DeClerck, Y.A. (2012). Protumorigenic Activity of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Through an Antiapoptotic Function. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 104, 1470–1484.
- Fang, X., Stachowiak, E.K., Dunham-Ems, S.M., Klejbor, I., and Stachowiak, M.K. (2005). Control of CREB-binding protein signaling by nuclear fibroblast growth factor receptor-1: a novel mechanism of gene regulation. *J Biol Chem* 280, 28451–28462.
- Farrow, S.N., White, J.H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K.T., Grinham, C.J., Martinou, J.C., and Brown, R. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374, 731–733.
- Ferecatu, I., Bergeaud, M., Rodríguez-Enfedaque, A., Le Floch, N., Oliver, L., Rincheval, V., Renaud, F., Vallette, F.M., Mignotte, B., and Vayssièrè, J.-L. (2009). Mitochondrial localization of the low level p53 protein in proliferative cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 772–777.
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669–676.
- Fiandalo, M.V., and Kyprianou, N. (2012). Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp. Oncol.* 34, 165.
- Fillippovich, I., Sorokina, N., Gatei, M., Haupt, Y., Hobson, K., Moallem, E., Spring, K., Mould, M., McGuckin, M.A., Lavin, M.F., *et al.* (2001). Transactivation-deficient p73a (p73Dexon2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogene* 20, 514–522.
- Findlay, V.J., LaRue, A.C., Turner, D.P., Watson, P.M., and Watson, D.K. (2013). Understanding the Role of ETS-Mediated Gene Regulation in Complex Biological Processes. In *Advances in Cancer Research*, (Elsevier), pp. 1–61.

- Fioravanti, L., Cappelletti, V., Coradini, D., Miodini, P., Borsani, G., Daidone, M.G., and Di Fronzo, G. (1997). int-2 Oncogene amplification and prognosis in node-negative breast carcinoma. *Int. J. Cancer* *74*, 620–624.
- Fiscella, M., Ullrich, S.J., Zambrano, N., Shields, M.T., Lin, D., Lees-Miller, S.P., Anderson, C.W., Mercer, W.E., and Appella, E. (1993). Mutation of the serine 15 phosphorylation site of human p53 reduces the ability of p53 to inhibit cell cycle progression. *Oncogene* *8*, 1519–1528.
- Fischer, U., Jänicke, R.U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* *10*, 76–100.
- Flames, N., and Hobert, O. (2009). Gene regulatory logic of dopamine neuron differentiation. *Nature* *458*, 885–889.
- Florkiewicz, R.Z., and Sommer, A. (1989). Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *86*, 3978–3981.
- Florkiewicz, R.Z., Majack, R.A., Buechler, R.D., and Florkiewicz, E. (1995). Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J. Cell. Physiol.* *162*, 388–399.
- Folkman, J., and Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science* *235*, 442–447.
- Fong, D., Hermann, M., Untergasser, G., Pirkebner, D., Draxl, A., Heitz, M., Moser, P., Margreiter, R., Hengster, P., and Amberger, A. (2009). Dkk-3 expression in the tumor endothelium: A novel prognostic marker of pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Sci.* *100*, 1414–1420.
- Forough, R., Wang, X., Martinez-Lemus, L.A., Thomas, D., Sun, Z., Motamed, K., Parker, J.L., and Meininger, G.A. (2003). Cell-based and direct gene transfer-induced angiogenesis via a secreted chimeric fibroblast growth factor-1 (sp-FGF-1) in the chick chorioallantoic membrane (CAM). *Angiogenesis* *6*, 47–54.
- Forough, R., Weylie, B., Patel, C., Ambrus, S., Singh, U.S., and Zhu, J. (2005). Role of AKT/PKB signaling in fibroblast growth factor-1 (FGF-1)-induced angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane (CAM). *J. Cell. Biochem.* *94*, 109–116.
- Forough, R., Weylie, B., Collins, C., Parker, J.L., Zhu, J., Barhoumi, R., and Watson, D.K. (2006). Transcription Factor Ets-1 Regulates Fibroblast Growth Factor-1-Mediated Angiogenesis in vivo: Role of Ets-1 in the Regulation of the PI3K/AKT/MMP-1 Pathway. *J. Vasc. Res.* *43*, 327–337.
- Förthmann, B., Grothe, C., and Claus, P. (2015). A nuclear odyssey: fibroblast growth factor-2 (FGF-2) as a regulator of nuclear homeostasis in the nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* *72*, 1651–1662.
- Friedman, P.N., Chen, X., Bargonetti, J., and Prives, C. (1993). The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 3319–3323.
- Fu, Y.M., Spirito, P., Yu, Z.X., Biro, S., Sasse, J., Lei, J., Ferrans, V.J., Epstein, S.E., and Casscells, W. (1991). Acidic fibroblast growth factor in the developing rat embryo. *J Cell Biol* *114*, 1261–1273.
- Fulda, S. (2009). The PI3K/Akt/mTOR pathway as therapeutic target in neuroblastoma. *Curr. Cancer Drug Targets* *9*, 729–737.
- Fulda, S., and Debatin, K.-M. (2003). Apoptosis pathways in neuroblastoma therapy. *Cancer Lett.* *197*, 131–135.
- Fulda, S., and Debatin, K.-M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* *25*, 4798–4811.

- Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I., and Debatin, K.-M. (1997). The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* *57*, 3823–3829.
- Fulda, S., Susin, S.A., Kroemer, G., and Debatin, K.-M. (1998). Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* *58*, 4453–4460.
- Fulda, S., Kufer, M.U., Meyer, E., van Valen, F., Dockhorn-Dworniczak, B., and Debatin, K.-M. (2001). Sensitization for death receptor-or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* *20*, 5865–5877.
- Gallagher, S.J., Kefford, R.F., and Rizos, H. (2006). The ARF tumour suppressor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 1637–1641.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* *64*, 7011–7021.
- Galy, B., Créancier, L., Prado-Lourenço, L., Prats, A.-C., and Prats, H. (2001a). p53 directs conformational change and translation initiation blockade of human fibroblast growth factor 2 mRNA. *Oncogene* *20*.
- Galy, B., Créancier, L., Zanibellato, C., Prats, A.-C., and Prats, H. (2001b). Tumour suppressor p53 inhibits human fibroblast growth factor 2 expression by a post-transcriptional mechanism. *Oncogene* *20*.
- Gamble, L.D., Kees, U.R., Tweddle, D.A., and Lunec, J. (2012). MYCN sensitizes neuroblastoma to the MDM2-p53 antagonists Nutlin-3 and MI-63. *Oncogene* *31*, 752–763.
- Gatcliffe, T.A., Monk, B.J., Planutis, K., and Holcombe, R.F. (2008). Wnt signaling in ovarian tumorigenesis. *Int. J. Gynecol. Cancer* *18*, 954–962.
- Gecz, J., Baker, E., Donnelly, A., Ming, J.E., McDonald-McGinn, D.M., Spinner, N.B., Zackai, E.H., Sutherland, G.R., and Mulley, J.C. (1999). Fibroblast growth factor homologous factor 2 (FHF2): gene structure, expression and mapping to the Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome region in Xq26 delineated by a duplication breakpoint in a BFLS-like patient. *Hum. Genet.* *104*, 56–63.
- Geng, X., Xie, L., and Xing, H. (2015). PI3K Inhibitor Combined With Chemotherapy Can Enhance the Apoptosis of Neuroblastoma Cells In Vitro and In Vivo. *Technol. Cancer Res. Treat.*
- Gentilella, A., Passiatore, G., Deshmane, S., Turco, M.C., and Khalili, K. (2008). Activation of BAG3 by Egr-1 in response to FGF-2 in neuroblastoma cells. *Oncogene* *27*, 5011–5018.
- Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R.V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., *et al.* (1996). Proteolytic activation of protein kinase C δ by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J. Exp. Med.* *184*, 2399–2404.
- Gilbertson, R.J., and Rich, J.N. (2007). Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 733–736.
- Gimenez-Cassina, A., and Danial, N.N. (2015). Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins. *Trends Endocrinol. Metab.* *26*, 165–175.
- Gimenez-Gallego, G., Rodkey, J., Bennett, C., Rios-Candelore, M., DiSalvo, J., and Thomas, K. (1985). Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete amino acid sequence and homologies. *Science* *230*, 1385–1388.
- Giri, D., Ropiquet, F., and Ittmann, M. (1999). Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* *5*, 1063–1071.

- Goldfarb, M., Schoorlemmer, J., Williams, A., Diwakar, S., Wang, Q., Huang, X., Giza, J., Tchetchik, D., Kelley, K., Vega, A., *et al.* (2007). Fibroblast Growth Factor Homologous Factors Control Neuronal Excitability through Modulation of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* 55, 449–463.
- Goldman, S.C., Chen, C.-Y., Lansing, T.J., Gilmer, T.M., and Kastan, M.B. (1996). The p53 signal transduction pathway is intact in human neuroblastoma despite cytoplasmic localization. *Am. J. Pathol.* 148, 1381.
- Goldsmith, K.C., and Hogarty, M.D. (2005). Targeting programmed cell death pathways with experimental therapeutics: opportunities in high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett.* 228, 133–141.
- Gomez, J., Vernadakis, A., Kentroti, S., Boutou, E., Hurel, C., Mamalaki, A., and Matsas, R. (1998). Overexpression of the neuron-specific molecule bm88 in mouse neuroblastoma cells: Altered responsiveness to growth factors. *J. Neurosci. Res.* 51, 119–128.
- Gospodarowicz, D. (1974). Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249, 123–127.
- Gospodarowicz, D., and Moran, J.S. (1975). Mitogenic effect of fibroblast growth factor on early passage cultures of human and murine fibroblasts. *J. Cell Biol.* 66, 451–457.
- Gospodarowicz, D., Jones, K.L., and Sato, G. (1974). Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci U A* 71, 2295–2299.
- Gospodarowicz, D., Weseman, J., Moran, J.S., and Lindstrom, J. (1976a). Effect of fibroblast growth factor on the division and fusion of bovine myoblasts. *J. Cell Biol.* 70, 395–405.
- Gospodarowicz, D., Moran, J., Braun, D., and Birdwell, C. (1976b). Clonal growth of bovine vascular endothelial cells: fibroblast growth factor as a survival agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 4120–4124.
- Gospodarowicz, D., Moran, J.S., and Braun, D.L. (1977). Control of proliferation of bovine vascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 91, 377–385.
- Grewal, T., and Enrich, C. (2009). Annexins — Modulators of EGF receptor signalling and trafficking. *Cell. Signal.* 21, 847–858.
- Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C., and Hickman, J.A. (1999). Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J. Cell Biol.* 144, 903–914.
- Gringel, S., van Bergeijk, J., Haastert, K., Grothe, C., and Claus, P. (2004). Nuclear fibroblast growth factor-2 interacts specifically with splicing factor SF3a66. *Biol. Chem.* 385, 1203–1208.
- Gross, S.R., Sin, C.G.T., Barraclough, R., and Rudland, P.S. (2014). Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 1551–1579.
- Gu, W., and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595–606.
- Gu, L., Zhang, H., He, J., Li, J., Huang, M., and Zhou, M. (2012). MDM2 regulates MYCN mRNA stabilization and translation in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 31, 1342–1353.
- Gualandris, A., Arese, M., Shen, B., and Rifkin, D.B. (1999). Modulation of cell growth and transformation by doxycycline-regulated FGF-2 expression in NIH-3T3 cells. *J. Cell. Physiol.* 181, 273–284.
- Guo, C., Liu, S., and Sun, M.-Z. (2013). Potential role of Anxa1 in cancer. *Future Oncol.* 9, 1773–1793.

- Gupta, S. (2003). Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int. J. Oncol.* 22, 15–20.
- Haaf, T., Golub, E.I., Reddy, G., Radding, C.M., and Ward, D.C. (1995). Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 2298–2302.
- Halazonetis, T.D., and Kandil, A.N. (1993). Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *EMBO J.* 12, 5057–5064.
- Hallahan, D.E., Dunphy, E., Virudachalam, S., Sukhatme, V.P., Kufe, D.W., and Weichselbaum, R.R. (1995). C-jun and Egr-1 participate in DNA synthesis and cell survival in response to ionizing radiation exposure. *J. Biol. Chem.* 270, 30303–30309.
- Ham, J., Babij, C., Whitfield, J., Pfarr, C.M., Lallemand, D., Yaniv, M., and Rubin, L.L. (1995). A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* 14, 927–939.
- Hanada, N., Lo, H.-W., Day, C.-P., Pan, Y., Nakajima, Y., and Hung, M.-C. (2006). Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol. Carcinog.* 45, 10–17.
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., and Nishida, E. (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat. Cell Biol.* 4, 850–858.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hannon, K., Kudla, A.J., McAvoy, M.J., Clase, K.L., and Olwin, B.B. (1996). Differentially expressed fibroblast growth factors regulate skeletal muscle development through autocrine and paracrine mechanisms. *J. Cell Biol.* 132, 1151–1159.
- Harper, J.W., and Lobb, R.R. (1988). Reductive methylation of lysine residues in acidic fibroblast growth factor: effect on mitogenic activity and heparin affinity. *Biochemistry (Mosc.)* 27, 671–678.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805–816.
- Harrison, D.A. (2012). The JAK/STAT Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011205–a011205.
- Haugsten, E.M., Sorensen, V., Brech, A., Olsnes, S., and Wesche, J. (2005). Different intracellular trafficking of FGF1 endocytosed by the four homologous FGF receptors. *J Cell Sci* 118, 3869–3881.
- He, J., Gu, L., Zhang, H., and Zhou, M. (2011). Crosstalk between MYCN and MDM2-p53 signal pathways regulates tumor cell growth and apoptosis in neuroblastoma. *Cell Cycle* 10, 2994–3002.
- Henkels, K.M., and Turchi, J.J. (1997). Induction of apoptosis in cisplatin-sensitive and-resistant human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 57, 4488–4492.
- Hennessey, J.A., Marcou, C.A., Wang, C., Wei, E.Q., Wang, C., Tester, D.J., Torchio, M., Dagradi, F., Crotti, L., Schwartz, P.J., *et al.* (2013). FGF12 is a candidate Brugada syndrome locus. *Heart Rhythm* 10, 1886–1894.
- Henriksson, M.L., Edin, S., Dahlin, A.M., Oldenborg, P.A., Oberg, A., Van Guelpen, B., Rutegard, J., Stenling, R., and Palmqvist, R. (2011). Colorectal cancer cells activate adjacent fibroblasts resulting in FGF1/FGFR3 signaling and increased invasion. *Am J Pathol* 178, 1387–1394.
- Hermeking, H. (2007). p53 Enters the MicroRNA World. *Cancer Cell* 12, 414–418.

- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.-C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 σ s a p53-Regulated Inhibitor of G2/M Progression. *Mol. Cell* *1*, 3–11.
- Hess, J. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell Sci.* *117*, 5965–5973.
- van Heumen, W.R., Claxton, C., and Pickles, J.O. (1999). Fibroblast growth factor receptor-4 splice variants cause deletion of a critical tyrosine. *IUBMB Life* *48*, 73–78.
- Hidai, C., Masako, O., Ikeda, H., Nagashima, H., Matsuoka, R., Quertermous, T., Kasanuki, H., Kokubun, S., and Kawana, M. (2003). FGF-1 enhanced cardiogenesis in differentiating embryonal carcinoma cell cultures, which was opposite to the effect of FGF-2. *J Mol Cell Cardiol* *35*, 421–425.
- Higgins, S., Wong, S.H.X., Richner, M., Rowe, C.L., Newgreen, D.F., Werther, G.A., and Russo, V.C. (2009). Fibroblast Growth Factor 2 Reactivates G1 Checkpoint in SK-N-MC Cells via Regulation of p21, Inhibitor of Differentiation Genes (Id1-3), and Epithelium-Mesenchyme Transition-Like Events. *Endocrinology* *150*, 4044–4055.
- Ho, R. (2005). Proliferation of Human Neuroblastomas Mediated by the Epidermal Growth Factor Receptor. *Cancer Res.* *65*, 9868–9875.
- Ho, R., Eggert, A., Hishiki, T., Minturn, J.E., Ikegaki, N., Foster, P., Camoratto, A.M., Evans, A.E., and Brodeur, G.M. (2002). Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res.* *62*, 6462–6466.
- Hoang, B.H., Kubo, T., Healey, J.H., Yang, R., Nathan, S.S., Kolb, E.A., Mazza, B., Meyers, P.A., and Gorlick, R. (2004). Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt- β -catenin pathway. *Cancer Res.* *64*, 2734–2739.
- Hockenbery, D., Nuñez, G., Millman, C., Schreiber, R.D., and Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* *348*, 334–336.
- Hoebeek, J., Michels, E., Pattyn, F., Combaret, V., Vermeulen, J., Yigit, N., Hoyoux, C., Laureys, G., Paepe, A.D., Speleman, F., *et al.* (2009). Aberrant methylation of candidate tumor suppressor genes in neuroblastoma. *Cancer Lett.* *273*, 336–346.
- Hoffman, W.H., Biade, S., Zilfou, J.T., Chen, J., and Murphy, M. (2002). Transcriptional Repression of the Anti-apoptoticsurvivin Gene by Wild Type p53. *J. Biol. Chem.* *277*, 3247–3257.
- Holley, R.W., and Kiernan, J.A. (1974). Control of the initiation of DNA synthesis in 3T3 cells: low-molecular-weight nutrients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *71*, 2942–2945.
- Honda, R., and Yasuda, H. (1999). Association of p19ARF with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J.* *18*, 22–27.
- Hortala, M., Estival, A., Pradayrol, L., Susini, C., and Clemente, F. (2005). Identification of c-Jun as a critical mediator for the intracrine 24 kDa FGF-2 isoform-induced cell proliferation. *Int. J. Cancer* *114*, 863–869.
- Hosang, M., and Shooter, E.M. (1987). The internalization of nerve growth factor by high-affinity receptors on pheochromocytoma PC12 cells. *EMBO J.* *6*, 1197.
- Hossain, M.M., Banik, N.L., and Ray, S.K. (2012). Survivin knockdown increased anti-cancer effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate in human malignant neuroblastoma SK-N-BE2 and SH-SY5Y cells. *Exp. Cell Res.* *318*, 1597–1610.
- Howe, C.L., and Mobley, W.C. (2004). Signaling endosome hypothesis: A cellular mechanism for long distance communication. *J. Neurobiol.* *58*, 207–216.

- Howe, C.L., Valletta, J.S., Rusnak, A.S., and Mobley, W.C. (2001). NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* 32, 801–814.
- Hsu, S.-C., and Hung, M.-C. (2007). Characterization of a Novel Tripartite Nuclear Localization Sequence in the EGFR Family. *J. Biol. Chem.* 282, 10432–10440.
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G., and Goeddel, D.V. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299–308.
- Hsu, S.-C., Miller, S.A., Wang, Y., and Hung, M.-C. (2009). Nuclear EGFR is required for cisplatin resistance and DNA repair. *Am J Transl Res* 1, 249–258.
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., and Hsueh, A.J. (1997). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12401–12406.
- Hsu, Y.C., Liao, W.C., Kao, C.Y., and Chiu, I.M. (2010). Regulation of FGF1 gene promoter through transcription factor RFX1. *J Biol Chem* 285, 13885–13895.
- Hsu, Y.C., Kao, C.Y., Chung, Y.F., Chen, M.S., and Chiu, I.M. (2012). Ciliogenic RFX transcription factors regulate FGF1 gene promoter. *J Cell Biochem* 113, 2511–2522.
- Hu, Y. (1998). WD-40 Repeat Region Regulates Apaf-1 Self-association and Procaspase-9 Activation. *J. Biol. Chem.* 273, 33489–33494.
- Huang, A., Jin, H., and Wright, J.A. (1994). Aberrant expression of basic fibroblast growth factor in NIH-3T3 cells alters drug resistance and gene amplification potential. *Exp. Cell Res.* 213, 335–339.
- Huang, L., Xu, Y., Cai, G., Guan, Z., and Cai, S. (2012). Downregulation of S100A4 expression by RNA interference suppresses cell growth and invasion in human colorectal cancer cells. *Oncol. Rep.* 27, 917–922.
- Huang, R.-P., Fan, Y., deBelle, I., Ni, Z., Matheny, W., and Adamson, E.D. (1998). Egr-1 inhibits apoptosis during the UV response: correlation of cell survival with Egr-1 phosphorylation. *Cell Death Differ.* 5.
- Huang, W.-C., Chen, Y.-J., Li, L.-Y., Wei, Y.-L., Hsu, S.-C., Tsai, S.-L., Chiu, P.-C., Huang, W.-P., Wang, Y.-N., Chen, C.-H., *et al.* (2011). Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells. *J. Biol. Chem.* 286, 20558–20568.
- Huang, Y., Jin, C., Hamana, T., Liu, J., Wang, C., An, L., McKeehan, W.L., and Wang, F. (2015). Overexpression of FGF9 in Prostate Epithelial Cells Augments Reactive Stroma Formation and Promotes Prostate Cancer Progression. *Int. J. Biol. Sci.* 11, 948–960.
- Humpton, T.J., and Vousden, K.H. (2016). Regulation of Cellular Metabolism and Hypoxia by p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a026146.
- Hung, L.-Y., Tseng, J.T., Lee, Y.-C., Xia, W., Wang, Y.-N., Wu, M.-L., Chuang, Y.-H., Lai, C.-H., and Chang, W.-C. (2008). Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleic Acids Res.* 36, 4337–4351.
- Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., and Lane, D.P. (1992). Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 71, 875–886.

- Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C., and Chu, G. (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 424–428.
- Hwangpo, T.A., Jordan, J.D., Premisrut, P.K., Jayamaran, G., Licht, J.D., Iyengar, R., and Neves, S.R. (2012). G Protein-regulated Inducer of Neurite Outgrowth (GRIN) Modulates Sprouty Protein Repression of Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Activation by Growth Factor Stimulation. *J. Biol. Chem.* *287*, 13674–13685.
- Ichimiya, S., Nimura, Y., Kageyama, H., Takada, N., Sunahara, M., Shishikura, T., Nakamura, Y., Sakiyama, S., Seki, N., Ohira, M., *et al.* (1999). p73 at chromosome 1p36.3 is lost in advanced stage neuroblastoma but its mutation is infrequent. *Oncogene* *18*, 1061–1066.
- Imamura, T., Engleka, K., Zhan, X., Tokita, Y., Forough, R., Roeder, D., Jackson, A., Maier, J.A., Hla, T., and Maciag, T. (1990). Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science* *249*, 1567–1570.
- Imamura, T., Oka, S., Tanahashi, T., and Okita, Y. (1994). Cell cycle-dependent nuclear localization of exogenously added fibroblast growth factor-1 in BALB/c 3T3 and human vascular endothelial cells. *Exp Cell Res* *215*, 363–372.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* *388*, 190–195.
- Ishiguro, A., Spirin, K.S., Shiohara, M., Tobler, A., Gombart, A.F., Israel, M.A., Norton, J.D., and Koeffler, H.P. (1996). Id2 expression increases with differentiation of human myeloid cells. *Blood* *87*, 5225–5231.
- Itahana, K., Mao, H., Jin, A., Itahana, Y., Clegg, H.V., Lindström, M.S., Bhat, K.P., Godfrey, V.L., Evan, G.I., and Zhang, Y. (2007). Targeted inactivation of Mdm2 RING finger E3 ubiquitin ligase activity in the mouse reveals mechanistic insights into p53 regulation. *Cancer Cell* *12*, 355–366.
- Ito, A., Lai, C.H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E., and Yao, T.P. (2001). p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J.* *20*, 1331–1340.
- Itoh, N. (2007). The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biol Pharm Bull* *30*, 1819–1825.
- Itoh, N., and Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* *268*, 10932–10937.
- Itoh, N., and Ornitz, D.M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* *20*, 563–569.
- Itoh, N., and Ornitz, D.M. (2008). Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev. Dyn.* *237*, 18–27.
- Itoh, N., and Ornitz, D.M. (2011). Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem* *149*, 121–130.
- Itoh, H., Hattori, Y., Sakamoto, H., Ishii, H., Kishi, T., Sasaki, H., Yoshida, T., Koono, M., Sugimura, T., and Terada, M. (1994). Preferential alternative splicing in cancer generates a K-sam messenger RNA with higher transforming activity. *Cancer Res.* *54*, 3237–3241.
- Ivanov, A. (2003). Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks. *J. Cell Sci.* *116*, 4095–4106.

- Jaboin, J., Kim, C.J., Kaplan, D.R., and Thiele, C.J. (2002). Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res.* *62*, 6756–6763.
- Jackson, R.J. (1991). mRNA translation. Initiation without an end. *Nature* *353*, 14–15.
- Jackson, A., Friedman, S., Zhan, X., Engleka, K.A., Forough, R., and Maciag, T. (1992). Heat shock induces the release of fibroblast growth factor 1 from NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 10691–10695.
- Jackson, A., Tarantini, F., Gamble, S., Friedman, S., and Maciag, T. (1995). The release of fibroblast growth factor-1 from NIH 3T3 cells in response to temperature involves the function of cysteine residues. *J Biol Chem* *270*, 33–36.
- Jackson, R.L., Busch, S.J., and Cardin, A.D. (1991). Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol. Rev.* *71*, 481–539.
- Jacobson, M.D., Weil, M., and Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* *88*, 347–354.
- Jacquemin, E., Halley, C., Alterio, J., Laurent, M., Courtois, Y., and Jeanny, J.C. (1990). Localization of acidic fibroblast growth factor (aFGF) mRNA in mouse and bovine retina by in situ hybridization. *Neurosci Lett* *116*, 23–28.
- Jaganathan, S., Yue, P., Paladino, D.C., Bogdanovic, J., Huo, Q., and Turkson, J. (2011). A functional nuclear epidermal growth factor receptor, SRC and Stat3 heteromeric complex in pancreatic cancer cells. *PloS One* *6*, e19605.
- James, Conway, and Morris (2005). Genomic profiling of the neuronal target genes of the plasticity-related transcription factor - Zif268. *J. Neurochem.* *95*, 796–810.
- Janardhanan, R., Banik, N.L., and Ray, S.K. (2009). N-Myc down regulation induced differentiation, early cell cycle exit, and apoptosis in human malignant neuroblastoma cells having wild type or mutant p53. *Biochem. Pharmacol.* *78*, 1105–1114.
- Janet, T., Lüdecke, G., Otten, U., and Unsicker, K. (1995). Heterogeneity of human neuroblastoma cell lines in their proliferative responses to basic FGF, NGF, and EGF: correlation with expression of growth factors and growth factor receptors. *J. Neurosci. Res.* *40*, 707–715.
- Javerzat, S., Auguste, P., and Bikfalvi, A. (2002). The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol. Med.* *8*, 483–489.
- Jayanthi, S., Kathir, K.M., Rajalingam, D., Furr, M., Daily, A., Thurman, R., Rutherford, L., Chandrashekar, R., Adams, P., Prudovsky, I., *et al.* (2014). Copper binding affinity of the C2B domain of synaptotagmin-1 and its potential role in the nonclassical secretion of Acidic Fibroblast Growth Factor. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Jaye, M., Howk, R., Burgess, W., Ricca, G.A., Chiu, I.M., Ravera, M.W., O'Brien, S.J., Modi, W.S., Maciag, T., and Drohan, W.N. (1986). Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science* *233*, 541–545.
- Jeremias, I., Stahnke, K., and Debatin, K.-M. (2005). CD95/Apo-1/Fas: independent cell death induced by doxorubicin in normal cultured cardiomyocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* *54*, 655–662.
- Jiang, P., Du, W., Heese, K., and Wu, M. (2006). The Bad Guy Cooperates with Good Cop p53: Bad Is Transcriptionally Up-Regulated by p53 and Forms a Bad/p53 Complex at the Mitochondria To Induce Apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 9071–9082.

- Johnsen, J.I., Segerström, L., Orrego, A., Elfman, L., Henriksson, M., K\va agedal, B., Eksborg, S., Sveinbjörnsson, B., and Kogner, P. (2008). Inhibitors of mammalian target of rapamycin downregulate MYCN protein expression and inhibit neuroblastoma growth in vitro and in vivo. *Oncogene* 27, 2910–2922.
- Johnson, D.E., Lu, J., Chen, H., Werner, S., and Williams, L.T. (1991). The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4627–4634.
- Johnston, C.L., Cox, H.C., Gomm, J.J., and Coombes, R.C. (1995). Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs) Localize in Different Cellular Compartments: A SPLICE VARIANT OF FGFR-3 LOCALIZES TO THE NUCLEUS. *J. Biol. Chem.* 270, 30643–30650.
- Jouanneau, J., Gavrilovic, J., Caruelle, D., Jaye, M., Moens, G., Caruelle, J.P., and Thiery, J.P. (1991). Secreted or nonsecreted forms of acidic fibroblast growth factor produced by transfected epithelial cells influence cell morphology, motility, and invasive potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2893–2897.
- Jouanneau, J., Plouet, J., Moens, G., and Thiery, J.P. (1997). FGF-2 and FGF-1 expressed in rat bladder carcinoma cells have similar angiogenic potential but different tumorigenic properties in vivo. *Oncogene* 14, 671–676.
- Jovanovic, I.P., Radosavljevic, G.D., Simovic-Markovic, B.J., Stojanovic, S.P., Stefanovic, S.M., Pejnovic, N.N., and Arsenijevic, N.N. (2014). Clinical significance of Cyclin D1, FGF3 and p21 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *JBUON* 19, 944–952.
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.-C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.-M., Dumont, X., *et al.* (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90, 809–819.
- Kahle, P., Barker, P.A., Shooter, E.M., and Hertel, C. (1994). p75 nerve growth factor receptor modulates p140trkA kinase activity, but not ligand internalization, in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 38, 599–606.
- Kan, S., Elanko, N., Johnson, D., Cornejo-Roldan, L., Cook, J., Reich, E.W., Tomkins, S., Verloes, A., Twigg, S.R., Rannan-Eliya, S., *et al.* (2002). Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 472–486.
- Kanai, M., Göke, M., Tsunekawa, S., and Podolsky, D.K. (1997). Signal transduction pathway of human fibroblast growth factor receptor 3 Identification of a novel 66-kDa phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* 272, 6621–6628.
- Kandemir, B., Caglayan, B., Hausott, B., Erdogan, B., Dag, U., Demir, O., Sogut, M.S., Klimaschewski, L., and Kurnaz, I.A. (2014). Pea3 transcription factor promotes neurite outgrowth. *Front. Mol. Neurosci.* 7.
- Kao, C.Y., Hsu, Y.C., Liu, J.W., Lee, D.C., Chung, Y.F., and Chiu, I.M. (2013). The mood stabilizer valproate activates human FGF1 gene promoter through inhibiting HDAC and GSK-3 activities. *J Neurochem.*
- Kar, A., and Gutierrez-Hartmann, A. (2013). Molecular mechanisms of ETS transcription factor-mediated tumorigenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48, 522–543.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., and Fornace, A.J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71, 587–597.

- Keller, D.M., Zeng, X., Wang, Y., Zhang, Q.H., Kapoor, M., Shu, H., Goodman, R., Lozano, G., Zhao, Y., and Lu, H. (2001). A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1. *Mol. Cell* 7, 283–292.
- Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., and Vogelstein, B. (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252, 1708–1711.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Khanna, K.K., Keating, K.E., Kozlov, S., Scott, S., Gatei, M., Hobson, K., Taya, Y., Gabrielli, B., Chan, D., Lees-Miller, S.P., *et al.* (1998). ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat. Genet.* 20, 398–400.
- Kharitonov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., *et al.* (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* 115, 1627–1635.
- Kiefer, P., and Dickson, C. (1995). Nucleolar association of fibroblast growth factor 3 via specific sequence motifs has inhibitory effects on cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4364–4374.
- Kiefer, M.C., Brauer, M.J., Powers, V.C., Wu, J.J., Umansky, S.R., Tomei, L.D., and Barr, P.J. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 736–739.
- Kiefer, P., Acland, P., Pappin, D., Peters, G., and Dickson, C. (1994). Competition between nuclear localization and secretory signals determines the subcellular fate of a single CUG-initiated form of FGF3. *EMBO J.* 13, 4126.
- Kikuno, N., Shiina, H., Urakami, S., Kawamoto, K., Hirata, H., Tanaka, Y., Majid, S., Igawa, M., and Dahiya, R. (2008). Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells. *Int. J. Cancer* 123, 552–560.
- Kim, H.-P., Yoon, Y.-K., Kim, J.-W., Han, S.-W., Hur, H.-S., Park, J., Lee, J.-H., Oh, D.-Y., Im, S.-A., Bang, Y.-J., *et al.* (2009). Lapatinib, a dual EGFR and HER2 tyrosine kinase inhibitor, downregulates thymidylate synthase by inhibiting the nuclear translocation of EGFR and HER2. *PloS One* 4, e5933.
- Kim, M.-S., Kim, C.J., Jung, H.S., Seo, M.R., Juhnn, Y.-S., Shin, H.Y., Ahn, H.S., Thiele, C.J., and Chi, J.G. (2004a). Fibroblast growth factor 2 induces differentiation and apoptosis of Askin tumour cells. *J. Pathol.* 202, 103–112.
- Kim, S., Kang, J., Qiao, J., Thomas, R.P., Evers, B.M., and Chung, D.H. (2004b). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition down-regulates survivin and facilitates TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastomas. *J. Pediatr. Surg.* 39, 516–521.
- King, M.L., Lindberg, M.E., Stodden, G.R., Okuda, H., Ebers, S.D., Johnson, A., Montag, A., Lengyel, E., MacLean II, J.A., and Hayashi, K. (2015). WNT7A/ β -catenin signaling induces FGF1 and influences sensitivity to niclosamide in ovarian cancer. *Oncogene* 34, 3452–3462.
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., and Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biol.*
- Kirov, A., Al-Hashimi, H., Solomon, P., Mazur, C., Thorpe, P.E., Sims, P.J., Tarantini, F., Kumar, T.K.S., and Prudovsky, I. (2012). Phosphatidylserine externalization and membrane blebbing are involved in the nonclassical export of FGF1. *J. Cell. Biochem.* 113, 956–966.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579–5588.

- Kiuru-Kuhlefelt, S., Sarlomo-Rikala, M., Larramendy, M.L., Söderlund, M., Hedman, K., Miettinen, M., and Knuutila, S. (2000). FGF4 and INT2 oncogenes are amplified and expressed in Kaposi's sarcoma. *Mod. Pathol.* *13*, 433–437.
- Klingenberg, O., Widlocha, A., Rapak, A., Munoz, R., Falnes, P., and Olsnes, S. (1998). Inability of the acidic fibroblast growth factor mutant K132E to stimulate DNA synthesis after translocation into cells. *J Biol Chem* *273*, 11164–11172.
- Klingenberg, O., Wiedlocha, A., and Olsnes, S. (1999). Effects of mutations of a phosphorylation site in an exposed loop in acidic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* *274*, 18081–18086.
- Klingenberg, O., Wiedlocha, A., Citores, L., and Olsnes, S. (2000). Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activity for translocation of exogenous aFGF to the cytosol and nucleus. *J Biol Chem* *275*, 11972–11980.
- Kobet, E., Zeng, X., Zhu, Y., Keller, D., and Lu, H. (2000). MDM2 inhibits p300-mediated p53 acetylation and activation by forming a ternary complex with the two proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 12547–12552.
- Kolpakova, E., Wiedlocha, A., Stenmark, H., Klingenberg, O., Falnes, P.O., and Olsnes, S. (1998). Cloning of an intracellular protein that binds selectively to mitogenic acidic fibroblast growth factor. *Biochem J* *336 (Pt 1)*, 213–222.
- Kolset, S.O., and Tveit, H. (2008). Serglycin—structure and biology. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 1073–1085.
- Korinek, V. (1997). Constitutive Transcriptional Activation by a beta -Catenin-Tcf Complex in APC-/- Colon Carcinoma. *Science* *275*, 1784–1787.
- Kornmann, M., Ishiwata, T., Beger, H.G., and Korc, M. (1997). Fibroblast growth factor-5 stimulates mitogenic signaling and is overexpressed in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine actions. *Oncogene* *15*, 1417–1424.
- Kovalenko, D., Yang, X., Chen, P.-Y., Nadeau, R.J., Zubanova, O., Pigeon, K., and Friesel, R. (2006). A role for extracellular and transmembrane domains of Sef in Sef-mediated inhibition of FGF signaling. *Cell. Signal.* *18*, 1958–1966.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R., and May, P. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J. Virol.* *31*, 472–483.
- Kruse, J.-P., and Gu, W. (2009). Modes of p53 Regulation. *Cell* *137*, 609–622.
- Kumari, R., Kohli, S., and Das, S. (2014). p53 regulation upon genotoxic stress: intricacies and complexities. *Mol. Cell. Oncol.* *1*, e969653.
- Kunkel, T.A., and Erie, D.A. (2005). DNA Mismatch Repair. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 681–710.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2005). BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly. *Mol. Cell* *17*, 525–535.
- La Rosa, S., Sessa, F., Colombo, L., Tibiletti, M.G., Furlan, D., and Capella, C. (2001). Expression of acidic fibroblast growth factor (aFGF) and fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) in breast fibroadenomas. *J Clin Pathol* *54*, 37–41.
- Lampugnani, M.G., Orsenigo, F., Gagliani, M.C., Tacchetti, C., and Dejana, E. (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J. Cell Biol.* *174*, 593–604.
- Landriscina, M., Bagala, C., Mandinova, A., Soldi, R., Micucci, I., Bellum, S., Prudovsky, I., and Maciag, T. (2001a). Copper induces the assembly of a multiprotein aggregate implicated in the release of fibroblast growth factor 1 in response to stress. *J Biol Chem* *276*, 25549–25557.

- Landriscina, M., Soldi, R., Bagala, C., Micucci, I., Bellum, S., Tarantini, F., Prudovsky, I., and Maciag, T. (2001b). S100A13 participates in the release of fibroblast growth factor 1 in response to heat shock in vitro. *J Biol Chem* 276, 22544–22552.
- Lane, D.P., and Benchimol, S. (1990). p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev.* 4, 1–8.
- Lane, D.P., and Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261–263.
- LaVallee, T.M., Tarantini, F., Gamble, S., Mouta Carreira, C., Jackson, A., and Maciag, T. (1998). Synaptotagmin-1 is required for fibroblast growth factor-1 release. *J Biol Chem* 273, 22217–22223.
- Lavenius, E., Parrow, V., Nånberg, E., and Pålman, S. (1994). Basic FGF and IGF-I Promote Differentiation of Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Culture. *Growth Factors* 10, 29–39.
- Lavin, M.F., and Gueven, N. (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ.* 13, 941–950.
- Lavrik, I.N. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* 115, 2665–2672.
- Lebrin, F., Chambaz, E.M., and Bianchini, L. (2001). A role for protein kinase CK2 in cell proliferation: evidence using a kinase-inactive mutant of CK2 catalytic subunit alpha. *Oncogene* 20, 2010–2022.
- Lee, C.G., Cho, S.J., Kang, M.J., Chapoval, S.P., Lee, P.J., Noble, P.W., Yehualaeshet, T., Lu, B., Flavell, R.A., Milbrandt, J., *et al.* (2004). Early Growth Response Gene 1–mediated Apoptosis Is Essential for Transforming Growth Factor β 1-induced Pulmonary Fibrosis. *J. Exp. Med.* 200, 377–389.
- Lee, T.-H., Seng, S., Sekine, M., Hinton, C., Fu, Y., Avraham, H.K., and Avraham, S. (2007). Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med.* 4, e186.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 183–192.
- Leu, J.I.-J., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., and George, D.L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak–Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol.* 6, 443–450.
- Levkovitz, Y., and Baraban, J.M. (2002). A dominant negative Egr inhibitor blocks nerve growth factor-induced neurite outgrowth by suppressing c-Jun activation: role of an Egr/c-Jun complex. *J. Neurosci.* 22, 3845–3854.
- Levkovitz, Y., O’Donovan, K.J., and Baraban, J.M. (2001). Blockade of NGF-induced neurite outgrowth by a dominant-negative inhibitor of the egr family of transcription regulatory factors. *J. Neurosci.* 21, 45–52.
- Li, M. (2003). Mono- Versus Polyubiquitination: Differential Control of p53 Fate by Mdm2. *Science* 302, 1972–1975.
- Li, J., and Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194–6206.
- Li, W., and Keller, G. (2000). VEGF nuclear accumulation correlates with phenotypical changes in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 113, 1525–1534.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491–501.

- Li, J., Yin, Q., and Wu, H. (2013). Structural Basis of Signal Transduction in the TNF Receptor Superfamily. In *Advances in Immunology*, (Elsevier), pp. 135–153.
- Li, J., Wei, Z., Li, H., Dang, Q., Zhang, Z., Wang, L., Gao, W., Zhang, P., Yang, D., Liu, J., *et al.* (2015). Clinicopathological significance of fibroblast growth factor 1 in non-small cell lung cancer. *Hum. Pathol.* *46*, 1821–1828.
- Li, N., Song, M.M., Chen, X.H., Liu, L.H., and Li, F.S. (2012). S100A4 siRNA inhibits human pancreatic cancer cell invasion in vitro. *Biomed. Environ. Sci.* *BES 25*, 465–470.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479–489.
- Li, Z., Jaboin, J., Dennis, P.A., and Thiele, C.J. (2005). Genetic and pharmacologic identification of Akt as a mediator of brain-derived neurotrophic factor/TrkB rescue of neuroblastoma cells from chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res.* *65*, 2070–2075.
- Liang, S.-H., and Clarke, M.F. (1999). A Bipartite Nuclear Localization Signal Is Required for p53 Nuclear Import Regulated by a Carboxyl-terminal Domain. *J. Biol. Chem.* *274*, 32699–32703.
- Liao, P., Wang, W., Shen, M., Pan, W., Zhang, K., Wang, R., Chen, T., Chen, Y., Chen, H., and Wang, P. (2014). A positive feedback loop between EBP2 and c-Myc regulates rDNA transcription, cell proliferation, and tumorigenesis. *Cell Death Dis.* *5*, e1032.
- Liccardi, G., Hartley, J.A., and Hochhauser, D. (2011). EGFR Nuclear Translocation Modulates DNA Repair following Cisplatin and Ionizing Radiation Treatment. *Cancer Res.* *71*, 1103–1114.
- Lim, R., Liu, Y.X., and Zaheer, A. (1990). Glia maturation factor beta regulates the growth of N18 neuroblastoma cells. *Dev. Biol.* *137*, 444–450.
- Lin, S.-Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K.Y., Bourguignon, L., and Hung, M.-C. (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol.* *3*, 802–808.
- Lin, W.-F., Chen, C.-J., Chang, Y.-J., Chen, S.-L., Chiu, I.-M., and Chen, L. (2009). SH2B1 β enhances fibroblast growth factor 1 (FGF1)-induced neurite outgrowth through MEK-ERK1/2-STAT3-Egr1 pathway. *Cell. Signal.* *21*, 1060–1072.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., *et al.* (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell* *6*, 1389–1399.
- Linzer, D.I., and Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* *17*, 43–52.
- Lippens, S., Kockx, M., Knaapen, M., Mortier, L., Polakowska, R., Verheyen, A., Garmyn, M., Zwijsen, A., Formstecher, P., Huylebroeck, D., *et al.* (2000). Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ.* *7*, 1218–1224.
- Lithgow, T., van Driel, R., Bertram, J.F., and Strasser, A. (1994). The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *5*, 411–417.
- Liu, B., Chen, Y., and St Clair, D.K. (2008). ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic. Biol. Med.* *44*, 1529–1535.

- Liu, C., Dib-Hajj, S.D., and Waxman, S.G. (2001). Fibroblast growth factor homologous factor 1B binds to the C terminus of the tetrodotoxin-resistant sodium channel rNav1.9a (NaN). *J. Biol. Chem.* 276, 18925–18933.
- Liu, C., Dib-Hajj, S.D., Renganathan, M., Cummins, T.R., and Waxman, S.G. (2003). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *J. Biol. Chem.* 278, 1029–1036.
- Liu, X., Yue, P., Khuri, F.R., and Sun, S.-Y. (2004). p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res.* 64, 5078–5083.
- Liu, Y., Ray, S.K., Yang, X.Q., Luntz-Leybman, V., and Chiu, I.M. (1998). A splice variant of E2-2 basic helix-loop-helix protein represses the brain-specific fibroblast growth factor 1 promoter through the binding to an imperfect E-box. *J Biol Chem* 273, 19269–19276.
- LIZCANO, J.M., MORRICE, N., and COHEN, P. (2000). Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem. J.* 349, 547–557.
- Lo, H.-W., Hsu, S.-C., Ali-Seyed, M., Gunduz, M., Xia, W., Wei, Y., Bartholomeusz, G., Shih, J.-Y., and Hung, M.-C. (2005). Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 7, 575–589.
- Lo, H.-W., Ali-Seyed, M., Wu, Y., Bartholomeusz, G., Hsu, S.-C., and Hung, M.-C. (2006). Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin β 1 and CRM1. *J. Cell. Biochem.* 98, 1570–1583.
- Lo, H.-W., Cao, X., Zhu, H., and Ali-Osman, F. (2010). Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes. *Mol. Cancer Res. MCR* 8, 232–245.
- Lobb, R.R., Alderman, E.M., and Fett, J.W. (1985). Induction of angiogenesis by bovine brain derived class 1 heparin-binding growth factor. *Biochemistry (Mosc.)* 24, 4969–4973.
- Lorenzo, E., Ruiz-Ruiz, C., Quesada, A.J., Hernandez, G., Rodriguez, A., Lopez-Rivas, A., and Redondo, J.M. (2002). Doxorubicin Induces Apoptosis and CD95 Gene Expression in Human Primary Endothelial Cells through a p53-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 277, 10883–10892.
- Lou, J.-Y., Laezza, F., Gerber, B.R., Xiao, M., Yamada, K.A., Hartmann, H., Craig, A.M., Nerbonne, J.M., and Ornitz, D.M. (2005). Fibroblast growth factor 14 is an intracellular modulator of voltage-gated sodium channels: FGF14 regulates sodium channel activity. *J. Physiol.* 569, 179–193.
- Lu, W.X., and Chang, K.J. (1991). Insulin-like growth factor-1 and dibutyryl CAMP induce differentiation and decrease opioid receptor binding activity in N4TG1 neuroblastoma cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 2, 284–293.
- Lüdecke, G., and Unsicker, K. (1990). Mitogenic Effect of Neurotrophic Factors on Human IMR 32 Neuroblastoma Cells. *Cancer.*
- Lungu, G., Covalada, L., Mendes, O., Martini-Stoica, H., and Stoica, G. (2008). FGF-1-induced matrix metalloproteinase-9 expression in breast cancer cells is mediated by increased activities of NF- κ B and activating protein-1. *Mol. Carcinog.* 47, 424–435.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481–490.
- Luo, X., Hutley, L.J., Webster, J.A., Kim, Y.-H., Liu, D.-F., Newell, F.S., Widberg, C.H., Bachmann, A., Turner, N., Schmitz-Peiffer, C., *et al.* (2012). Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI) as a potent negative regulator of adipogenesis and modulator of autocrine/paracrine adipogenic factors. *Diabetes* 61, 124–136.

- Luo, Y., Hurwitz, J., and Massagué, J. (1995). Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 375, 159–161.
- Lüthi, A.U., and Martin, S.J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates - <http://bioinf.gen.tcd.ie/casbah/>. *Cell Death Differ.* 14, 641–650.
- Luu, H.H., Zhou, L., Haydon, R.C., Deyrup, A.T., Montag, A.G., Huo, D., Heck, R., Heizmann, C.W., Peabody, T.D., Simon, M.A., *et al.* (2005). Increased expression of S100A6 is associated with decreased metastasis and inhibition of cell migration and anchorage independent growth in human osteosarcoma. *Cancer Lett.* 229, 135–148.
- MacFarlane, M., and Williams, A.C. (2004). Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep.* 5, 674–678.
- MacLachlan, T.K., and El-Deiry, W.S. (2002). Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 9492–9497.
- Madden, S.L., and Rauscher, F.J. (1993). Positive and Negative Regulation of Transcription and Cell Growth Mediated by the EGR Family of Zinc-Finger Gene Products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 684, 75–84.
- Madiai, F., Hackshaw, K.V., and Chiu, I.-M. (1999). Characterization of the Entire Transcription Unit of the Mouse Fibroblast Growth Factor 1 (FGF-1) Gene: TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION OF THE FGF-1.A mRNA. *J. Biol. Chem.* 274, 11937–11944.
- Maher, P.A. (1996). Nuclear Translocation of fibroblast growth factor (FGF) receptors in response to FGF-2. *J. Cell Biol.* 134, 529–536.
- Maier, J.A., Morelli, D., Menard, S., Colnaghi, M.I., and Balsari, A. (1996). Tumor-necrosis-factor-induced fibroblast growth factor-1 acts as a survival factor in a transformed endothelial cell line. *Am J Pathol* 149, 945–952.
- Malecki, J., Wiedlocha, A., Wesche, J., and Olsnes, S. (2002). Vesicle transmembrane potential is required for translocation to the cytosol of externally added FGF-1. *EMBO J* 21, 4480–4490.
- Malecki, J., Wesche, J., Skjerpen, C.S., Wiedlocha, A., and Olsnes, S. (2004). Translocation of FGF-1 and FGF-2 across vesicular membranes occurs during G1-phase by a common mechanism. *Mol Biol Cell* 15, 801–814.
- Malladi, S., Challa-Malladi, M., Fearnhead, H.O., and Bratton, S.B. (2009). The Apaf-1–procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer. *EMBO J.* 28, 1916–1925.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129, 1261–1274.
- Marcel, V., Petit, I., Murray-Zmijewski, F., de Rugy, T.G., Fernandes, K., Meuray, V., Diot, A., Lane, D.P., Aberdam, D., and Bourdon, J.C. (2012). Diverse p63 and p73 isoforms regulate $\Delta 133p53$ expression through modulation of the internal TP53 promoter activity. *Cell Death Differ.* 19, 816–826.
- Marchenko, N.D. (2000). Death Signal-induced Localization of p53 Protein to Mitochondria. A POTENTIAL ROLE IN APOPTOTIC SIGNALING. *J. Biol. Chem.* 275, 16202–16212.
- Maret, A., Galy, B., Arnaud, E., Bayard, F., and Prats, H. (1995). Inhibition of fibroblast growth factor 2 expression by antisense RNA induced a loss of the transformed phenotype in a human hepatoma cell line. *Cancer Res.* 55, 5075–5079.
- Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., and Hoeijmakers, J.H.J. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 465–481.

- Martineau, Y., Le Bec, C., Monbrun, L., Allo, V., Chiu, I.-M., Danos, O., Moine, H., Prats, H., and Prats, A.-C. (2004). Internal Ribosome Entry Site Structural Motifs Conserved among Mammalian Fibroblast Growth Factor 1 Alternatively Spliced mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 7622–7635.
- Mascarelli, F., Raulais, D., and Courtois, Y. (1989). Fibroblast growth factor phosphorylation and receptors in rod outer segments. *EMBO J* *8*, 2265–2273.
- Mashima, T., Naito, M., Noguchi, K., Miller, D.K., Nicholson, D.W., and Tsuruo, T. (1997). Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* *14*.
- Mathiasen, I.S., and Jäättelä, M. (2002). Triggering caspase-independent cell death to combat cancer. *Trends Mol. Med.* *8*, 212–220.
- Mathieu, M., Chatelain, E., Ornitz, D., Bresnick, J., Mason, I., Kiefer, P., and Dickson, C. (1995a). Receptor Binding and Mitogenic Properties of Mouse Fibroblast Growth Factor 3 - Modulation Of Response By Heparin. *J. Biol. Chem.* *270*, 24197–24203.
- Mathieu, M., Kiefer, P., Mason, I., and Dickson, C. (1995b). Fibroblast growth factor (FGF) 3 from *Xenopus laevis* (XFGF3) binds with high affinity to FGF receptor 2. *J. Biol. Chem.* *270*, 6779–6787.
- Matsuyama, D., and Kawahara, K. (2009). Proliferation of neonatal cardiomyocytes by connexin43 knockdown via synergistic inactivation of p38 MAPK and increased expression of FGF1. *Basic Res. Cardiol.* *104*, 631–642.
- Mattsson, M.E., Enberg, G., Ruusala, A., Hall, K., and Pahlman, S. (1986). Mitogenic response of human SH-SY5Y neuroblastoma cells to insulin-like growth factor I and II is dependent on the stage of differentiation. *J. Cell Biol.* *102*, 1949–1954.
- Maxwell, M., Naber, S.P., Wolfe, H.J., Hedley-Whyte, E.T., Galanopoulos, T., Neville-Golden, J., and Antoniades, H.N. (1991). Expression of angiogenic growth factor genes in primary human astrocytomas may contribute to their growth and progression. *Cancer Res* *51*, 1345–1351.
- Mayo, L.D., and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 11598–11603.
- McGinnis, K.M., Gnegy, M.E., and Wang, K.K. (1999). Endogenous Bax Translocation in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells and Cerebellar Granule Neurons Undergoing Apoptosis. *J. Neurochem.* *72*, 1899–1906.
- McKenzie, P.P., Guichard, S.M., Middlemas, D.S., Ashmun, R.A., Danks, M.K., and Harris, L.C. (1999). Wild-type p53 can induce p21 and apoptosis in neuroblastoma cells but the DNA damage-induced G1 checkpoint function. *Clin. Cancer Res.* *5*, 4199–4207.
- McKinney, K., Mattia, M., Gottifredi, V., and Prives, C. (2004). p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus. *Mol. Cell* *16*, 413–424.
- Meek, D.W. (2015). Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem. J.* *469*, 325–346.
- Mellert, H., Sykes, S.M., Murphy, M.E., and McMahon, S.B. (2007). The ARF/oncogene pathway activates p53 acetylation within the DNA binding domain. *Cell Cycle* *6*, 1304–1306.
- Mena, M.A., Casarejos, M.J., Gimenez-Gallego, G., and De Yébenes, J.G. (1995). Fibroblast growth factors: structure-activity on dopamine neurons in vitro. *J. Neural Transm.-Park. Dis. Dement. Sect.* *9*, 1–14.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* *114*, 181–190.

- Mignatti, P., Morimoto, T., and Rifkin, D.B. (1992). Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J. Cell. Physiol.* *151*, 81–93.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* *11*, 577–590.
- Miki, T., Bottaro, D.P., Fleming, T.P., Smith, C.L., Burgess, W.H., Chan, A.M., and Aaronson, S.A. (1992). Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 246–250.
- Milbrandt, J. (1987). A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* *238*, 797–799.
- Millau, J.-F., Bastien, N., and Drouin, R. (2009). P53 transcriptional activities: A general overview and some thoughts. *Mutat. Res. Mutat. Res.* *681*, 118–133.
- Milne, D.M., Palmer, R.H., and Meek, D.W. (1992). Mutation of the casein kinase II phosphorylation site abolishes the anti-proliferative activity of p53. *Nucleic Acids Res.* *20*, 5565–5570.
- Milunsky, J., Zhao, G., Maher, T., Colby, R., and Everman, D. (2006). LADD syndrome is caused by FGF10 mutations: FGF10 mutations cause LADD syndrome. *Clin. Genet.* *69*, 349–354.
- Minet, E., Michel, G., Remacle, J., and Michiels, C. (2000). Role of HIF-1 as a transcription factor involved in embryonic development, cancer progression and apoptosis. *Int. J. Mol. Med.* *5*, 253–260.
- Mitin, N.Y., Ramocki, M.B., Zullo, A.J., Der, C.J., Konieczny, S.F., and Taparowsky, E.J. (2004). Identification and Characterization of Rain, a Novel Ras-interacting Protein with a Unique Subcellular Localization. *J. Biol. Chem.* *279*, 22353–22361.
- Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* *80*, 293–299.
- Mizobuchi, Y., Matsuzaki, K., Kuwayama, K., Kitazato, K., Mure, H., Kageji, T., and Nagahiro, S. (2008). REIC/Dkk-3 induces cell death in human malignant glioma. *Neuro-Oncol.* *10*, 244–253.
- Mizukoshi, E., Suzuki, M., Loupatov, A., Uruno, T., Hayashi, H., Misono, T., Kaul, S.C., Wadhwa, R., and Imamura, T. (1999). Fibroblast growth factor-1 interacts with the glucose-regulated protein GRP75/mortalin. *Biochem J* *343 Pt 2*, 461–466.
- Mizukoshi, E., Suzuki, M., Misono, T., Loupatov, A., Munekata, E., Kaul, S.C., Wadhwa, R., and Imamura, T. (2001). Cell-cycle dependent tyrosine phosphorylation on mortalin regulates its interaction with fibroblast growth factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* *280*, 1203–1209.
- Mohammad, R.M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.-Y., Lin, L.-T., Siegelin, M.D., Fimognari, C., Kumar, N.B., Dou, Q.P., *et al.* (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. In *Seminars in Cancer Biology*, (Elsevier), pp. S78–S103.
- Mohammadi, M., Honegger, A.M., Rotin, D., Fischer, R., Bellot, F., Li, W., Dionne, C.A., Jaye, M., Rubinstein, M., and Schlessinger, J. (1991). A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 5068–5078.
- Mohlin, S.A., Wigerup, C., and Pålman, S. (2011). Neuroblastoma aggressiveness in relation to sympathetic neuronal differentiation stage. *Semin. Cancer Biol.* *21*, 276–282.
- Moldoveanu, T., Grace, C.R., Llambi, F., Nourse, A., Fitzgerald, P., Gehring, K., Kriwacki, R.W., and Green, D.R. (2013). BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 589–597.

- Moll, U.M., LaQuaglia, M., Bénard, J., and Riou, G. (1995). Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 4407–4411.
- Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T.A., Dyer, M.J., Mason, D.Y., and Greaves, M.F. (1992). Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *40*, 1819–1825.
- Moore, J.W., Dionne, C., Jaye, M., and Swain, J.L. (1991). The mRNAs encoding acidic FGF, basic FGF and FGF receptor are coordinately downregulated during myogenic differentiation. *Development* *111*, 741–748.
- Morizane, Y. (2005). X-Linked Inhibitor of Apoptosis Functions as Ubiquitin Ligase toward Mature Caspase-9 and Cytosolic Smac/DIABLO. *J. Biochem. (Tokyo)* *137*, 125–132.
- Moroni, M.C., Hickman, E.S., Lazzerini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Müller, H., and Helin, K. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat. Cell Biol.* *3*, 552–558.
- Moss, S.E., and Morgan, R.O. (2004). The annexins. *Genome Biol.* *5*, 1.
- Mouta Carreira, C., LaVallee, T.M., Tarantini, F., Jackson, A., Lathrop, J.T., Hampton, B., Burgess, W.H., and Maciag, T. (1998). S100A13 is involved in the regulation of fibroblast growth factor-1 and p40 synaptotagmin-1 release in vitro. *J Biol Chem* *273*, 22224–22231.
- Muenke, M., Gripp, K.W., McDonald-McGinn, D.M., Gaudenz, K., Whitaker, L.A., Bartlett, S.P., Markowitz, R.I., Robin, N.H., Nwokoro, N., Mulvihill, J.J., *et al.* (1997). A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *60*, 555.
- Mühlmann, G., Untergasser, G., Zitt, M., Zitt, M., Maier, H., Mikuz, G., Kronberger, I.E., Haffner, M.C., Gunsilius, E., and Öfner, D. (2010). Immunohistochemically detectable dickkopf-3 expression in tumor vessels predicts survival in gastric cancer. *Virchows Arch.* *456*, 635–646.
- Müller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M., *et al.* (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med.* *188*, 2033–2045.
- Munoz-Fontela, C., González, D., Marcos-Villar, L., Campagna, M., Gallego, P., González-Santamaría, J., Herranz, D., Gu, W., Serrano, M., Aaronson, S.A., *et al.* (2011). Acetylation is indispensable for p53 antiviral activity. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 3701–3705.
- Munoz-Sanjuan, I., Smallwood, P.M., and Nathans, J. (2000). Isoform diversity among fibroblast growth factor homologous factors is generated by alternative promoter usage and differential splicing. *J. Biol. Chem.* *275*, 2589–2597.
- Myers, R.L., Payson, R.A., Chotani, M.A., Deaven, L.L., and Chiu, I.M. (1993). Gene structure and differential expression of acidic fibroblast growth factor mRNA: identification and distribution of four different transcripts. *Oncogene* *8*, 341–349.
- Myers, R.L., Ray, S.K., Eldridge, R., Chotani, M.A., and Chiu, I.M. (1995a). Functional characterization of the brain-specific FGF-1 promoter, FGF-1.B. *J Biol Chem* *270*, 8257–8266.
- Myers, R.L., Chedid, M., Tronick, S.R., and Chiu, I.M. (1995b). Different fibroblast growth factor 1 (FGF-1) transcripts in neural tissues, glioblastomas and kidney carcinoma cell lines. *Oncogene* *11*, 785–789.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* *88*, 355–365.
- Nagata, Y., and Todokoro, K. (1994). Activation of helix-loop-helix proteins Id1, Id2 and Id3 during neural differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *199*, 1355–1362.

- Nakagawa, T., Takahashi, M., Ozaki, T., Watanabe, K., Hayashi, S., Hosoda, M., Todo, S., and Nakagawara, A. (2003). Negative autoregulation of p73 and p53 by Δ Np73 in regulating differentiation and survival of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett.* *197*, 105–109.
- Nakagawara, A., Arima, M., Azar, C.G., Scavarda, N.J., and Brodeur, G.M. (1992). Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res.* *52*, 1364–1368.
- Nakagawara, A., Arima-Nakagawara, M., Scavarda, N.J., Azar, C.G., Cantor, A.B., and Brodeur, G.M. (1993). Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* *328*, 847–854.
- Nakagawara, A., Azar, C.G., Scavarda, N.J., and Brodeur, G.M. (1994). Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 759–767.
- Nakamura, R.E., Hunter, D.D., Yi, H., Brunken, W.J., and Hackam, A.S. (2007). Identification of two novel activities of the Wnt signaling regulator Dickkopf 3 and characterization of its expression in the mouse retina. *BMC Cell Biol.* *8*, 52.
- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Mol. Cell* *7*, 683–694.
- Nedjadi, T., Kitteringham, N., Campbell, F., Jenkins, R.E., Park, B.K., Navarro, P., Ashcroft, F., Tepikin, A., Neoptolemos, J.P., and Costello, E. (2009). S100A6 binds to annexin 2 in pancreatic cancer cells and promotes pancreatic cancer cell motility. *Br. J. Cancer* *101*, 1145–1154.
- Niculescu, A.B., Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S.I. (1998). Effects of p21Cip1/Waf1 at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 629–643.
- Nilsen, T., Rosendal, K.R., Sorensen, V., Wesche, J., Olsnes, S., and Wiedlocha, A. (2007). A Nuclear Export Sequence Located on a beta-Strand in Fibroblast Growth Factor-1. *J. Biol. Chem.* *282*, 26245–26256.
- Nugent, M.A., and Edelman, E.R. (1992). Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: a mechanism for cooperativity. *Biochemistry (Mosc.)* *31*, 8876–8883.
- Nugent, M.A., and Iozzo, R.V. (2000). Fibroblast growth factor-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *32*, 115–120.
- Nunez, G., Seto, M., Seremetis, S., Ferrero, D., Grignani, F., Korsmeyer, S.J., and Dalla-Favera, R. (1989). Growth- and tumor-promoting effects of deregulated BCL2 in human B-lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 4589–4593.
- Nunez, G., London, L., Hockenbery, D., Alexander, M., McKearn, J.P., and Korsmeyer, S.J. (1990). Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *144*, 3602–3610.
- Nurcombe, V., Ford, M.D., Wildschut, J.A., and Bartlett, P.F. (1993). Developmental regulation of neural response to FGF-1 and FGF-2 by heparan sulfate proteoglycan. *Science* *260*, 103–106.
- Obersler, P., Hloch, P., Ramsperger, U., and Stahl, H. (1993). p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *EMBO J.* *12*, 2389.
- O'Connell, P.A., Surette, A.P., Liwski, R.S., Svenningsson, P., and Waisman, D.M. (2010). S100A10 regulates plasminogen-dependent macrophage invasion. *Blood* *116*, 1136–1146.

- Ohlsson, C., Kley, N., Werner, H., and LeRoith, D. (1998). p53 regulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor expression and IGF-I-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1. *Endocrinology* *139*, 1101–1107.
- Okada-Ban, M., Moens, G., Thiery, J.P., and Jouanneau, J. (1999). Nuclear 24 kD fibroblast growth factor (FGF)-2 confers metastatic properties on rat bladder carcinoma cells. *Oncogene* *18*, 6719–6724.
- Okoshi, R., Ando, K., Suenaga, Y., Sang, M., Kubo, N., Kizaki, H., Nakagawara, A., and Ozaki, T. (2009). Transcriptional regulation of tumor suppressor p53 by cAMP-responsive element-binding protein/AMP-activated protein kinase complex in response to glucose deprivation. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *14*, 1429–1440.
- Okunieff, P., Fenton, B.M., Zhang, L., Kern, F.G., Wu, T., Greg, J.R., and Ding, I. (2003). Fibroblast growth factors (FGFs) increase breast tumor growth rate, metastases, blood flow, and oxygenation without significant change in vascular density. *Adv Exp Med Biol* *530*, 593–601.
- Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a001008–a001008.
- Olsen, S.K., Garbi, M., Zampieri, N., Eliseenkova, A.V., Ornitz, D.M., Goldfarb, M., and Mohammadi, M. (2003). Fibroblast Growth Factor (FGF) Homologous Factors Share Structural but Not Functional Homology with FGFs. *J. Biol. Chem.* *278*, 34226–34236.
- Olsnes, S., Klingenberg, O., and Wiedłocha, A. (2003). Transport of exogenous growth factors and cytokines to the cytosol and to the nucleus. *Physiol. Rev.* *83*, 163–182.
- Olsson, A., Manzl, C., Strasser, A., and Villunger, A. (2007). How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression? *Cell Death Differ.* *14*, 1561–1575.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* *74*, 609–619.
- Opel, D., Poremba, C., Simon, T., Debatin, K.-M., and Fulda, S. (2007). Activation of Akt Predicts Poor Outcome in Neuroblastoma. *Cancer Res.* *67*, 735–745.
- Oren, M., Maltzman, W., and Levine, A.J. (1981). Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* *1*, 101–110.
- Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *4*, 215–266.
- Orre, L.M., Panizza, E., Kaminsky, V.O., Vernet, E., Gräslund, T., Zhivotovsky, B., and Lehtiö, J. (2013). S100A4 interacts with p53 in the nucleus and promotes p53 degradation. *Oncogene* *32*, 5531–5540.
- Owen-Schaub, L.B., Zhang, W., Cusack, J.C., Angelo, L.S., Santee, S.M., Fujiwara, T., Roth, J.A., Deisseroth, A.B., Zhang, W.-W., and Kruzel, E. (1995). Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 3032–3040.
- Pablo, J.L., and Pitt, G.S. (2014). Fibroblast Growth Factor Homologous Factors New Roles in Neuronal Health and Disease. *The Neuroscientist* 1073858414562217.
- Packham, S., Warsito, D., Lin, Y., Sadi, S., Karlsson, R., Sehat, B., and Larsson, O. (2015). Nuclear translocation of IGF-1R via p150Glued and an importin- β /RanBP2-dependent pathway in cancer cells. *Oncogene* *34*, 2227–2238.

- Pahlman, S., Meyerson, G., Lindgren, E., Schalling, M., and Johansson, I. (1991). Insulin-like growth factor I shifts from promoting cell division to potentiating maturation during neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 9994–9998.
- Palmen, M., Daemen, M.J., De Windt, L.J., Willems, J., Dassen, W.R., Heeneman, S., Zimmermann, R., Van Bilsen, M., and Doevendans, P.A. (2004). Fibroblast growth factor-1 improves cardiac functional recovery and enhances cell survival after ischemia and reperfusion: a fibroblast growth factor receptor, protein kinase C, and tyrosine kinase-dependent mechanism. *J Am Coll Cardiol* *44*, 1113–1123.
- Pant, V., and Lozano, G. (2014). Limiting the power of p53 through the ubiquitin proteasome pathway. *Genes Dev.* *28*, 1739–1751.
- Pant, V., Xiong, S., Iwakuma, T., Quintás-Cardama, A., and Lozano, G. (2011). Heterodimerization of Mdm2 and Mdm4 is critical for regulating p53 activity during embryogenesis but dispensable for p53 and Mdm2 stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11995–12000.
- Pantoliano, M.W., Horlick, R.A., Springer, B.A., Van Dyk, D.E., Tobery, T., Wetmore, D.R., Lear, J.D., Nahapetian, A.T., Bradley, J.D., and Sisk, W.P. (1994). Multivalent Ligand-Receptor Binding Interactions in the Fibroblast Growth Factor System Produce a Cooperative Growth Factor and Heparin Mechanism for Receptor Dimerization. *Biochemistry (Mosc.)* *33*, 10229–10248.
- Park, H.H., Lo, Y.-C., Lin, S.-C., Wang, L., Yang, J.K., and Wu, H. (2007). The Death Domain Superfamily in Intracellular Signaling of Apoptosis and Inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 561–586.
- Parrow, V., Fagerström, S., Meyerson, G., Nånberg, E., and Pahlman, S. (1995). Protein kinase C- α and ϵ are enriched in growth cones of differentiating SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* *41*, 782–791.
- Passiatore, G., Gentilella, A., Rom, S., Pacifici, M., Bergonzini, V., and Peruzzi, F. (2011). Induction of Id-1 by FGF-2 involves activity of EGR-1 and sensitizes neuroblastoma cells to cell death. *J. Cell. Physiol.* *226*, 1763–1770.
- Patry, V., Bugler, B., Maret, A., Potier, M., and Prats, H. (1997). Endogenous basic fibroblast growth factor isoforms involved in different intracellular protein complexes. *Biochem. J.* *326*, 259–264.
- Pavletich, N.P., Chambers, K.A., and Pabo, C.O. (1993). The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev.* *7*, 2556–2564.
- Payson, R.A., Canatan, H., Chotani, M.A., Wang, W.P., Harris, S.E., Myers, R.L., and Chiu, I.M. (1993). Cloning of two novel forms of human acidic fibroblast growth factor (aFGF) mRNA. *Nucleic Acids Res* *21*, 489–495.
- Payson, R.A., Chotani, M.A., and Chiu, I.M. (1998). Regulation of a promoter of the fibroblast growth factor 1 gene in prostate and breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* *66*, 93–103.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P.P., *et al.* (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* *406*, 207–210.
- Peng, H., Myers, J., Fang, X., Stachowiak, E.K., Maher, P.A., Martins, G.G., Popescu, G., Berezney, R., and Stachowiak, M.K. (2002). Integrative nuclear FGFR1 signaling (INFS) pathway mediates activation of the tyrosine hydroxylase gene by angiotensin II, depolarization and protein kinase C. *J. Neurochem.* *81*, 506–524.
- Perfumo, C., Parodi, S., Mazzocco, K., Defferrari, R., Inga, A., Haupt, R., Fronza, G., and Tonini, G.P. (2008). Impact of MDM2 SNP309 genotype on progression and survival of stage 4 neuroblastoma. *Eur. J. Cancer* *44*, 2634–2639.

- Pesu, M., Laurence, A., Kishore, N., Zwillich, S.H., Chan, G., and O'Shea, J.J. (2008). Therapeutic targeting of Janus kinases. *Immunol. Rev.* 223, 132–142.
- Philippe, J.M., Renaud, F., Courtois, Y., and Laurent, M. (1996). Cloning of multiple chicken FGF1 mRNAs and their differential expression during development of whole embryo and of the lens. *DNA Cell Biol.* 15, 703–715.
- Phipps, K.D., Surette, A.P., O'Connell, P.A., and Waisman, D.M. (2011). Plasminogen Receptor S100A10 Is Essential for the Migration of Tumor-Promoting Macrophages into Tumor Sites. *Cancer Res.* 71, 6676–6683.
- Phung, Y.T., Bekker, J.M., Hallmark, O.G., and Black, S.M. (1999). Both neuronal NO synthase and nitric oxide are required for PC12 cell differentiation: a cGMP independent pathway. *Mol. Brain Res.* 64, 165–178.
- Pietrzak, M., and Puzianowska-Kuznicka, M. (2008). p53-dependent repression of the human MCL-1 gene encoding an anti-apoptotic member of the BCL-2 family: the role of Sp1 and of basic transcription factor binding sites in the MCL-1 promoter. *Biol. Chem.* 389.
- Pinna, L.A., and Meggio, F. (1997). Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog. Cell Cycle Res.* 3, 77–97.
- Piotrowicz, R.S., Martin, J.L., Dillman, W.H., and Levin, E.G. (1997). The 27-kDa Heat Shock Protein Facilitates Basic Fibroblast Growth Factor Release from Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 272, 7042–7047.
- Pirou, C., Montazer-Torbati, F., Jah, N., Delmas, E., Lasbleiz, C., Mignotte, B., and Renaud, F. (2016). FGF1 protects neuroblastoma SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis through an intracrine pathway regulated by FGF1 phosphorylation. *J. Neurosci. en préparation.*
- Pirvola, U., Cao, Y., Oellig, C., Suoqiang, Z., Pettersson, R.F., and Ylikoski, J. (1995). The site of action of neuronal acidic fibroblast growth factor is the organ of Corti of the rat cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9269–9273.
- Placencio, V.R., and DeClerck, Y.A. (2015). Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cancer: Rationale and Insight for Future Therapeutic Testing. *Cancer Res.* 75, 2969–2974.
- Planque, N. (2006). Nuclear trafficking of secreted factors and cell-surface receptors: new pathways to regulate cell proliferation and differentiation, and involvement in cancers. *Cell Commun Signal* 4, 7.
- Pollock, P.M., Gartside, M.G., Dejeza, L.C., Powell, M.A., Mallon, M.A., Davies, H., Mohammadi, M., Futreal, P.A., Stratton, M.R., Trent, J.M., *et al.* (2007). Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene* 26, 7158–7162.
- Ponimaskin, E., Dityateva, G., Ruonala, M.O., Fukata, M., Fukata, Y., Kobe, F., Wouters, F.S., Delling, M., Bredt, D.S., Schachner, M., *et al.* (2008). Fibroblast Growth Factor-Regulated Palmitoylation of the Neural Cell Adhesion Molecule Determines Neuronal Morphogenesis. *J. Neurosci.* 28, 8897–8907.
- Pop, C., and Salvesen, G.S. (2009). Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *J. Biol. Chem.* 284, 21777–21781.
- Post, A., Pannekoek, W.-J., Ross, S.H., Verlaan, I., Brouwer, P.M., and Bos, J.L. (2013). Rasip1 mediates Rap1 regulation of Rho in endothelial barrier function through ArhGAP29. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 11427–11432.
- Potthoff, M.J., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2012). Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine. *Genes Dev.* 26, 312–324.

- Powers, C.J., McLeskey, S.W., and Wellstein, A. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7, 165–197.
- Prats, H., Kaghad, M., Prats, A.C., Klagsbrun, M., Lélias, J.M., Liauzun, P., Chalon, P., Tauber, J.P., Amalric, F., and Smith, J.A. (1989). High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 1836–1840.
- Prudovsky, I., Tarantini, F., Landriscina, M., Neivandt, D., Soldi, R., Kirov, A., Small, D., Kathir, K.M., Rajalingam, D., and Kumar, T.K. (2008). Secretion without Golgi. *J Cell Biochem* 103, 1327–1343.
- Prudovsky, I., Kumar, T.K., Sterling, S., and Neivandt, D. (2013). Protein-phospholipid interactions in nonclassical protein secretion: problem and methods of study. *Int J Mol Sci* 14, 3734–3772.
- Pyerin, W. (1994). Human casein kinase II: structures, genes, expression and requirement in cell growth stimulation. *Adv. Enzyme Regul.* 34, 225–246.
- Qiu, W., Leibowitz, B., Zhang, L., and Yu, J. (2010). Growth factors protect intestinal stem cells from radiation-induced apoptosis by suppressing PUMA through the PI3K/AKT/p53 axis. *Oncogene* 29, 1622–1632.
- Quarto, N., and Amalric, F. (1994). Heparan sulfate proteoglycans as transducers of FGF-2 signalling. *J. Cell Sci.* 107, 3201–3212.
- Quarto, N., Finger, F.P., and Rifkin, D.B. (1991). The NH₂-terminal extension of high molecular weight bFGF is a nuclear targeting signal. *J. Cell. Physiol.* 147, 311–318.
- Quarto, N., Fong, K.D., and Longaker, M.T. (2005). Gene profiling of cells expressing different FGF-2 forms. *Gene* 356, 49–68.
- Radulescu, R.T. (2015). The nucleocrine pathway comes of age. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* 56, 343.
- Raguenez, G., Desire, L., Lantrua, V., and Courtois, Y. (1999). BCL-2 is upregulated in human SH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated by overexpression of fibroblast growth factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 258, 745–751.
- Raju, R., Palapetta, S.M., Sandhya, V.K., Sahu, A., Alipoor, A., Balakrishnan, L., Advani, J., George, B., Kini, K.R., Geetha, N.P., *et al.* (2014). A Network Map of FGF-1/FGFR Signaling System. *J. Signal Transduct.* 2014, 1–16.
- Rakowicz-Szulczynska, E.M. (1993). Identification of the cell surface and nuclear receptors for NGF in a breast carcinoma cell line. *J. Cell. Physiol.* 154, 64–70.
- Rakowicz-Szulczynska, E.M., and Koprowski, H. (1989). Antagonistic effect of PDGF and NGF on transcription of ribosomal DNA and tumor cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 649–656.
- Rakowicz-Szulczynska, E.M., Rodeck, U., Herlyn, M., and Koprowski, H. (1986). Chromatin binding of epidermal growth factor, nerve growth factor, and platelet-derived growth factor in cells bearing the appropriate surface receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 3728–3732.
- Rakowicz-Szulczynska, E.M., Reddy, U., Vorbrodt, A., Herlyn, D., and Koprowski, H. (1991). Chromatin and cell surface receptors mediate melanoma cell growth response to nerve growth factor. *Mol. Carcinog.* 4, 388–396.
- Rand, V., Huang, J., Stockwell, T., Ferriera, S., Buzko, O., Levy, S., Busam, D., Li, K., Edwards, J.B., Eberhart, C., *et al.* (2005). Sequence survey of receptor tyrosine kinases reveals mutations in glioblastomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14344–14349.

- Rao, L., Perez, D., and White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* 135, 1441–1455.
- Raper, S.E., Burwen, S.J., Barker, M.E., and Jones, A.L. (1987). Translocation of epidermal growth factor to the hepatocyte nucleus during rat liver regeneration. *Gastroenterology* 92, 1243–1250.
- Rapraeger, A.C., Krufka, A., and Olwin, B.B. (1991). Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252, 1705–1708.
- Rawlings, J.S., Rosler, K.M., and Harrison, D.A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* 117, 1281–1283.
- Ray, S.K., Yang, X.Q., and Chiu, I.M. (1997). Transcriptional activation of fibroblast growth factor 1.B promoter is mediated through an 18-base pair cis-acting element. *J Biol Chem* 272, 7546–7555.
- Reilly, J.F., and Maher, P.A. (2001). Importin β -Mediated Nuclear Import of Fibroblast Growth Factor Receptor Role in Cell Proliferation. *J. Cell Biol.* 152, 1307–1312.
- Reimers, K., Antoine, M., Zapatka, M., Blecken, V., Dickson, C., and Kiefer, P. (2001). NoBP, a Nuclear Fibroblast Growth Factor 3 Binding Protein, Is Cell Cycle Regulated and Promotes Cell Growth. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4996–5007.
- Reisman, D., Elkind, N.B., Roy, B., Beamon, J., and Rotter, V. (1993). c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 4, 57–65.
- Relf, M., LeJeune, S., Scott, P.A., Fox, S., Smith, K., Leek, R., Moghaddam, A., Whitehouse, R., Bicknell, R., and Harris, A.L. (1997). Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor β -1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res.* 57, 963–969.
- Renaud, F., Oliver, L., Desset, S., Tassin, J., Romquin, N., Courtois, Y., and Laurent, M. (1994). Up-regulation of aFGF expression in quiescent cells is related to cell survival. *J Cell Physiol* 158, 435–443.
- Renaud, F., El Yazidi, I., Boilly-Marer, Y., Courtois, Y., and Laurent, M. (1996a). Expression and regulation by serum of multiple FGF1 mRNA in normal transformed, and malignant human mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 219, 679–685.
- Renaud, F., Desset, S., Oliver, L., Gimenez-Gallego, G., Van Obberghen, E., Courtois, Y., and Laurent, M. (1996b). The neurotrophic activity of fibroblast growth factor 1 (FGF1) depends on endogenous FGF1 expression and is independent of the mitogen-activated protein kinase cascade pathway. *J Biol Chem* 271, 2801–2811.
- Renko, M., Quarto, N., Morimoto, T., and Rifkin, D.B. (1990). Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species. *J. Cell. Physiol.* 144, 108–114.
- Rieckmann, T., Kotevic, I., and Trueb, B. (2008). The cell surface receptor FGFR1 forms constitutive dimers that promote cell adhesion. *Exp. Cell Res.* 314, 1071–1081.
- Riedl, S.J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 897–907.
- Riedl, S.J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S.W., Liddington, R.C., and Salvesen, G.S. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104, 791–800.

- Rikhof, B., Corn, P.G., and El-Deiry, W.S. (2003). Caspase 10 Levels are Increased Following DNA Damage in a p53-Dependent Manner. *Cancer Biol. Ther.* 2, 705–710.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 402–412.
- Rincheval, V., Renaud, F., Lemaire, C., Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (1999). Inhibition of Bcl-2-dependent cell survival by a caspase inhibitor: a possible new pathway for Bcl-2 to regulate cell death. *FEBS Lett.* 460, 203–206.
- Robles, A.I., Bemmels, N.A., Foraker, A.B., and Harris, C.C. (2001). APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res.* 61, 6660–6664.
- Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Lane, D.P., and Hay, R.T. (2000). Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8458–8467.
- Rodriguez-Enfedaque, A., Bouleau, S., Laurent, M., Courtois, Y., Mignotte, B., Vayssiere, J.L., and Renaud, F. (2009). FGF1 nuclear translocation is required for both its neurotrophic activity and its p53-dependent apoptosis protection. *Biochim Biophys Acta* 1793, 1719–1727.
- Romero, A., Pineda-Lucena, A., and Gimenez-Gallego, G. (1996). X-ray structure of native full-length human fibroblast-growth factor at 0.25-nm resolution. *Eur J Biochem* 241, 453–461.
- Ropiquet, F., Giri, D., Kwabi-Addo, B., Mansukhani, A., and Ittmann, M. (2000). Increased expression of fibroblast growth factor 6 in human prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Cancer Res.* 60, 4245–4250.
- Rosen, A., Sevela, P., Klein, M., Dobianer, K., Hruza, C., Czerwenka, K., Hanak, H., Vavra, N., Salzer, H., Leodolter, S., *et al.* (1993). First experience with FGF-3 (INT-2) amplification in women with epithelial ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 67, 1122.
- Rothbard, J., Jessop, T., and Wender, P. (2005). Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 495–504.
- Roubin, R., Naert, K., Popovici, C., Vatcher, G., Coulier, F., Thierry-Mieg, J., Pontarotti, P., Birnbaum, D., Baillie, D., and Thierry-Mieg, D. (1999). *let-756*, a *C. elegans* *fgf* essential for worm development. *Oncogene* 18.
- Roy Choudhury, S., Karmakar, S., Banik, N.L., and Ray, S.K. (2010). Synergistic efficacy of sorafenib and genistein in growth inhibition by down regulating angiogenic and survival factors and increasing apoptosis through upregulation of p53 and p21 in malignant neuroblastoma cells having N-Myc amplification or non-amplification. *Invest. New Drugs* 28, 812–824.
- Russo, V.C., Andaloro, E., Fornaro, S.A., Najdovska, S., Newgreen, D.F., Bach, L.A., and Werther, G.A. (2004). Fibroblast growth factor-2 over-rides insulin-like growth factor-I induced proliferation and cell survival in human neuroblastoma cells. *J. Cell. Physiol.* 199, 371–380.
- Sabbieti, M.G., Marchetti, L., Gabrielli, M.G., Menghi, M., Materazzi, S., Menghi, G., Raisz, L.G., and Hurley, M.M. (2005). Prostaglandins differently regulate FGF-2 and FGF receptor expression and induce nuclear translocation in osteoblasts via MAPK kinase. *Cell Tissue Res.* 319, 267–278.
- Sagomyants, K., and Mina, M. (2014). Biphasic effects of FGF2 on odontoblast differentiation involve changes in the BMP and Wnt signaling pathways. *Connect. Tissue Res.* 55, 53–56.
- Sahu, U., Sidhar, H., Ghate, P.S., Advirao, G.M., Raghavan, S.C., and Giri, R.K. (2013). A Novel Anticancer Agent, MPTQ, Induces Neuro-2a Neuroblastoma Cell Death through p53-Dependent, Caspase-Dependent and -Independent Apoptotic Pathways. *PLoS ONE* 8, e66430.

- Saito, S. 'i., Yamaguchi, H., Higashimoto, Y., Chao, C., Xu, Y., Fornace, A.J., Appella, E., and Anderson, C.W. (2003). Phosphorylation Site Interdependence of Human p53 Post-translational Modifications in Response to Stress. *J. Biol. Chem.* *278*, 37536–37544.
- Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Lewis, M.S., Anderson, C.W., Erickson, J.W., Appella, E., and Xie, D. (1997). Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry (Mosc.)* *36*, 10117–10124.
- Saksela, O., Moscatelli, D., Sommer, A., and Rifkin, D.B. (1988). Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J. Cell Biol.* *107*, 743–751.
- Santos, S.C.R., Miguel, C., Domingues, I., Calado, A., Zhu, Z., Wu, Y., and Dias, S. (2007). VEGF and VEGFR-2 (KDR) internalization is required for endothelial recovery during wound healing. *Exp. Cell Res.* *313*, 1561–1574.
- Sarfstein, R., Pasmanik-Chor, M., Yeheskel, A., Edry, L., Shomron, N., Warman, N., Wertheimer, E., Maor, S., Shochat, L., and Werner, H. (2012). Insulin-like Growth Factor-I Receptor (IGF-IR) Translocates to Nucleus and Autoregulates IGF-IR Gene Expression in Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* *287*, 2766–2776.
- Sarosiek, K.A., Chi, X., Bachman, J.A., Sims, J.J., Montero, J., Patel, L., Flanagan, A., Andrews, D.W., Sorger, P., and Letai, A. (2013). BID Preferentially Activates BAK while BIM Preferentially Activates BAX, Affecting Chemotherapy Response. *Mol. Cell* *51*, 751–765.
- Sarrazin, S., Lamanna, W.C., and Esko, J.D. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*.
- Sawey, E.T., Chanrion, M., Cai, C., Wu, G., Zhang, J., Zender, L., Zhao, A., Busuttil, R.W., Yee, H., Stein, L., *et al.* (2011). Identification of a Therapeutic Strategy Targeting Amplified FGF19 in Liver Cancer by Oncogenomic Screening. *Cancer Cell* *19*, 347–358.
- Sax, J.K., Fei, P., Murphy, M.E., Bernhard, E., Korsmeyer, S.J., and El-Deiry, W.S. (2002). BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat. Cell Biol.* *4*, 842–849.
- Scheil, S., Lüdecke, G., and Unsicker, K. (1994). Interleukin-1 beta and interferon gamma interact with fibroblast growth factor-2 in the control of neuroblastoma cell proliferation and differentiation. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* *12*, 405–410.
- Schell, U., Hehr, A., Feldman, G.J., Robin, N.H., Zackai, E.H., de Die-Smulders, C., Viskochil, D.H., Stewart, J.M., Wolff, G., Ohashi, H., *et al.* (1995). Mutations in FGFR1 and FGFR2 cause familial and sporadic Pfeiffer syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 323–328.
- Schneider, B.P., Winer, E.P., Foulkes, W.D., Garber, J., Perou, C.M., Richardson, A., Sledge, G.W., and Carey, L.A. (2008a). Triple-Negative Breast Cancer: Risk Factors to Potential Targets. *Clin. Cancer Res.* *14*, 8010–8018.
- Schneider, D.J., Chen, Y., and Sobel, B.E. (2008b). The effect of plasminogen activator inhibitor type 1 on apoptosis. *Thromb. Haemost.*
- Schnurch, H., and Risau, W. (1991). Differentiating and mature neurons express the acidic fibroblast growth factor gene during chick neural development. *Development* *111*, 1143–1154.
- Schoorlemmer, J. (2002). Fibroblast Growth Factor Homologous Factors and the Islet Brain-2 Scaffold Protein Regulate Activation of a Stress-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* *277*, 49111–49119.
- Schoorlemmer, J., and Goldfarb, M. (2001). Fibroblast growth factor homologous factors are intracellular signaling proteins. *Curr. Biol.* *11*, 793–797.

- Schuler, M., Maurer, U., Goldstein, J.C., Breitenbücher, F., Hoffarth, S., Waterhouse, N.J., and Green, D.R. (2003). p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. *Cell Death Differ.* *10*, 451–460.
- Schwab, M. (2004). MYCN in neuronal tumours. *Cancer Lett.* *204*, 179–187.
- Schweigerer, L., Ledoux, D., Fleischmann, G., and Barritault, D. (1991). Enhanced MYCN oncogene expression in human neuroblastoma cells is associated with altered FGF receptor expression and cellular growth response to basic FGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *179*, 1449–1454.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 721–732.
- Sensi, A., Ceruti, S., Trevisi, P., Gualandi, F., Busi, M., Donati, I., Neri, M., Ferlini, A., and Martini, A. (2011). LAMM syndrome with middle ear dysplasia associated with compound heterozygosity for FGF3 mutations. *Am. J. Med. Genet. A.* *155A*, 1096–1101.
- Sentman, C.L., Shutter, J.R., Hockenbery, D., Kanagawa, O., and Korsmeyer, S.J. (1991). bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* *67*, 879–888.
- Shackelford, G.M., Willert, K., Wang, J., and Varmus, H.E. (1993). The Wnt-1 proto-oncogene induces changes in morphology, gene expression, and growth factor responsiveness in PC12 cells. *Neuron* *11*, 865–875.
- Shain, S.A., Saric, T., Ke, L.D., Nannen, D., and Yoas, S. (1996). Endogenous fibroblast growth factor-1 or fibroblast growth factor-2 modulate prostate cancer cell proliferation. *Cell Growth Differ* *7*, 573–586.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., and Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* *22*, 526–539.
- Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., and Andrews, D.W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1813*, 508–520.
- Shaulian, E. (2010). AP-1 — The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell. Signal.* *22*, 894–899.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* *4*, E131–E136.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V. (1990). Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 6565–6577.
- Shen, B., Arese, M., Gualandris, A., and Rifkin, D.B. (1998). Intracellular association of FGF-2 with the ribosomal protein L6/TAXREB107. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *252*, 524–528.
- Sheng, Z., Lewis, J.A., and Chirico, W.J. (2004). Nuclear and Nucleolar Localization of 18-kDa Fibroblast Growth Factor-2 Is Controlled by C-terminal Signals. *J. Biol. Chem.* *279*, 40153–40160.
- Sheng, Z., Liang, Y., Lin, C.Y., Comai, L., and Chirico, W.J. (2005). Direct regulation of rRNA transcription by fibroblast growth factor 2. *Mol Cell Biol* *25*, 9419–9426.
- Sherman, L., Stocker, K.M., Morrison, R., and Ciment, G. (1993). Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts intracellularly to cause the transdifferentiation of avian neural crest-derived Schwann cell precursors into melanocytes. *Development* *118*, 1313–1326.
- Shi, C., Wu, F., Yew, D.T., Xu, J., and Zhu, Y. (2010). Bilobalide prevents apoptosis through activation of the PI3K/Akt pathway in SH-SY5Y cells. *Apoptosis* *15*, 715–727.

- Shi, E., Kan, M., Xu, J., Wang, F., Hou, J., and McKeehan, W.L. (1993). Control of fibroblast growth factor receptor kinase signal transduction by heterodimerization of combinatorial splice variants. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 3907–3918.
- Shieh, S.-Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* *91*, 325–334.
- Shin, J.T., Opalenik, S.R., Wehby, J.N., Mahesh, V.K., Jackson, A., Tarantini, F., Maciag, T., and Thompson, J.A. (1996). Serum-starvation induces the extracellular appearance of FGF-1. *Biochim Biophys Acta* *1312*, 27–38.
- Shiozaki, E.N., Chai, J., Rigotti, D.J., Riedl, S.J., Li, P., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Fairman, R., and Shi, Y. (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol. Cell* *11*, 519–527.
- Sieuwerts, A.M., Martens, J.W.M., Dorssers, L.C.J., Klijn, J.G.M., and Foekens, J.A. (2002). Differential effects of fibroblast growth factors on expression of genes of the plasminogen activator and insulin-like growth factor systems by human breast fibroblasts. *Thromb. Haemost.* *87*, 674–683.
- Silke, J., Kratina, T., Chu, D., Ekert, P.G., Day, C.L., Pakusch, M., Huang, D.C.S., and Vaux, D.L. (2005). Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16182–16187.
- Simoës-Wust, A.P., Sigrist, B., Belyanskaya, L., Donaldson, S.H., Stahel, R.A., and Zangemeister-Wittke, U. (2005). Δ Np73 antisense activates PUMA and induces apoptosis in neuroblastoma cells. *J. Neurooncol.* *72*, 29–34.
- Skjerpen, C.S., Wesche, J., and Olsnes, S. (2002a). Identification of ribosome-binding protein p34 as an intracellular protein that binds acidic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* *277*, 23864–23871.
- Skjerpen, C.S., Nilsen, T., Wesche, J., and Olsnes, S. (2002b). Binding of FGF-1 variants to protein kinase CK2 correlates with mitogenicity. *EMBO J* *21*, 4058–4069.
- Slack, A., Chen, Z., Tonelli, R., Pule, M., Hunt, L., Pession, A., and Shohet, J.M. (2005). The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 731–736.
- Slattery, M.L., John, E.M., Stern, M.C., Herrick, J., Lundgreen, A., Giuliano, A.R., Hines, L., Baumgartner, K.B., Torres-Mejia, G., and Wolff, R.K. (2013). Associations with growth factor genes (FGF1, FGF2, PDGFB, FGFR2, NRG2, EGF, ERBB2) with breast cancer risk and survival: the Breast Cancer Health Disparities Study. *Breast Cancer Res Treat* *140*, 587–601.
- Sletten, T., Kostas, M., Bober, J., Sorensen, V., Yadollahi, M., Olsnes, S., Tomala, J., Otlewski, J., Zakrzewska, M., and Wiedlocha, A. (2014). Nucleolin regulates phosphorylation and nuclear export of fibroblast growth factor 1 (FGF1). *PLoS One* *9*, e90687.
- Smallwood, P.M., Munoz-Sanjuan, I., Tong, P., Macke, J.P., Hendry, S.H., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nathans, J. (1996). Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 9850–9857.
- Smith, G., Ng, M.T., Shepherd, L., Herrington, C.S., Gourley, C., Ferguson, M.J., and Wolf, C.R. (2012). Individuality in FGF1 expression significantly influences platinum resistance and progression-free survival in ovarian cancer. *Br J Cancer* *107*, 1327–1336.
- Soldi, R., Mandinova, A., Venkataraman, K., Hla, T., Vadas, M., Pitson, S., Duarte, M., Graziani, I., Kolev, V., Kacer, D., *et al.* (2007). Sphingosine kinase 1 is a critical component of the copper-dependent FGF1 export pathway. *Exp Cell Res* *313*, 3308–3318.

- Sommerhoff, C.P., Bode, W., Pereira, P.J.B., Stubbs, M.T., Stürzebecher, J., Piechottka, G.P., Matschiner, G., and Bergner, A. (1999). The structure of the human β II-tryptase tetramer: Fo(u)r better or worse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 10984–10991.
- Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* *9*, 59–71.
- Sorensen, V., Wiedlocha, A., Haugsten, E.M., Khnykin, D., Wesche, J., and Olsnes, S. (2006a). Different abilities of the four FGFRs to mediate FGF-1 translocation are linked to differences in the receptor C-terminal tail. *J. Cell Sci.* *119*, 4332–4341.
- Sorensen, V., Nilsen, T., and Wiedlocha, A. (2006b). Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. *Bioessays* *28*, 504–514.
- Soulet, F. (2005). Exogenously Added Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) to NIH3T3 Cells Interacts with Nuclear Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) in a Cell Cycle-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* *280*, 25604–25610.
- Soulet, F., Al Saati, T., Roga, S., Amalric, F., and Bouche, G. (2001). Fibroblast Growth Factor-2 Interacts with Free Ribosomal Protein S19. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *289*, 591–596.
- Sözeri, O., Vollmer, K., Liyanage, M., Frith, D., Kour, G., Mark, G.E., and Stabel, S. (1992). Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene* *7*, 2259–2262.
- Spirito, P., Fu, Y.M., Yu, Z.X., Epstein, S.E., and Casscells, W. (1991). Immunohistochemical localization of basic and acidic fibroblast growth factors in the developing rat heart. *Circulation* *84*, 322–332.
- Srivastava, S., Weitzmann, M.N., Kimble, R.B., Rizzo, M., Zahner, M., Milbrandt, J., Ross, F.P., and Pacifici, R. (1998). Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. *J. Clin. Invest.* *102*, 1850–1859.
- Stachowiak, M.K., Maher, P.A., and Stachowiak, E.K. (2007). Integrative nuclear signaling in cell development—a role for FGF receptor-1. *DNA Cell Biol.* *26*, 811–826.
- Stambolic, V., Suzuki, A., De La Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., and Mak, T.W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* *95*, 29–39.
- Stathopoulos, A., Tam, B., Ronshaugen, M., Frasch, M., and Levine, M. (2004). *pyramus* and *thisbe*: FGF genes that pattern the mesoderm of *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* *18*, 687–699.
- Stenger, C., Naves, T., Verdier, M., and Ratinaud, M.-H. (2011). The cell death response to the ROS inducer, cobalt chloride, in neuroblastoma cell lines according to p53 status. *Int. J. Oncol.*
- Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., and Wahl, G.M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* *18*, 1660–1672.
- Strasser, A., Harris, A.W., Vaux, D.L., Webb, E., Bath, M.L., Adams, J.M., and Cory, S. (1990). Abnormalities of the immune system induced by dysregulated bcl-2 expression in transgenic mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *166*, 175–181.
- Strasser, A., Harris, A.W., Huang, D.C., Krammer, P.H., and Cory, S. (1995). Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J.* *14*, 6136.
- Sutherland, D., Samakovlis, C., and Krasnow, M.A. (1996). *branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* *87*, 1091–1101.

- Suzuki, S., Li, A.J., Akaike, T., and Imamura, T. (2001a). Intracerebroventricular infusion of fibroblast growth factor-1 increases Fos immunoreactivity in periventricular astrocytes in rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* *300*, 29–32.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., and Takahashi, R. (2001b). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 8662–8667.
- van Swieten, J.C., Brusse, E., de Graaf, B.M., Krieger, E., van de Graaf, R., de Koning, I., Maat-Kievit, A., Leegwater, P., Dooijes, D., Oostra, B.A., *et al.* (2003). A Mutation in the Fibroblast Growth Factor 14 Gene Is Associated with Autosomal Dominant Cerebral Ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* *72*, 191–199.
- Swygert, S.G., and Peterson, C.L. (2014). Chromatin dynamics: interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochim. Biophys. Acta* *1839*, 728–736.
- Szeberenyi, J., Cai, H., and Cooper, G.M. (1990). Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on neuronal differentiation of PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 5324–5332.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 621–632.
- Tajrishi, M.M., Tuteja, R., and Tuteja, N. (2011). Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun Integr Biol* *4*, 267–275.
- Takahashi, J.A., Mori, H., Fukumoto, M., Igarashi, K., Jaye, M., Oda, Y., Kikuchi, H., and Hatanaka, M. (1990). Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc Natl Acad Sci U A* *87*, 5710–5714.
- Takenaga, K., and Kozlova, E.N. (2006). Role of intracellular S100A4 for migration of rat astrocytes. *Glia* *53*, 313–321.
- Takimoto, R., and El-Deiry, W.S. (2000). Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene* *19*, 1735–1743.
- Tamura, I., Chaqour, B., Howard, P.S., Ikeo, T., and Macarak, E.J. (2008). Effect of fibroblast growth factor-1 on the expression of early growth response-1 in human periodontal ligament cells. *J. Periodontal Res.* *43*, 305–310.
- Tan, T., and Chu, G. (2002). p53 Binds and Activates the Xeroderma Pigmentosum DDB2 Gene in Humans but Not Mice. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 3247–3254.
- Tan, X., Martin, S.J., Green, D.R., and Wang, J.Y.J. (1997). Degradation of Retinoblastoma Protein in Tumor Necrosis Factor- and CD95-induced Cell Death. *J. Biol. Chem.* *272*, 9613–9616.
- Tang, Y., Zhao, W., Chen, Y., Zhao, Y., and Gu, W. (2008). Acetylation Is Indispensable for p53 Activation. *Cell* *133*, 612–626.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., and Goeddel, D.V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* *74*, 845–853.
- Tavormina, P.L., Bellus, G.A., Webster, M.K., Bamshad, M.J., Fraley, A.E., McIntosh, I., Szabo, J., Jiang, W., Jabs, E.W., Wilcox, W.R., *et al.* (1999). A novel skeletal dysplasia with developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys650Met mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *Am. J. Hum. Genet.* *64*, 722–731.
- Tawfic, S., Yu, S., Wang, H., Faust, R., Davis, A., and Ahmed, K. (2001). Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol. Histopathol.* *16*, 573–582.

- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 231–241.
- Taylor, W.R., Greenberg, A.H., Turley, E.A., and Wright, J.A. (1993). Cell motility, invasion, and malignancy induced by overexpression of K-FGF or bFGF. *Exp. Cell Res.* *204*, 295–301.
- Teishima, J., Shoji, K., Hayashi, T., Miyamoto, K., Ohara, S., and Matsubara, A. (2012). Relationship between the localization of fibroblast growth factor 9 in prostate cancer cells and postoperative recurrence. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* *15*, 8–14.
- Teitz, T., Wei, T., Valentine, M.B., Vanin, E.F., Grenet, J., Valentine, V.A., Behm, F.G., Look, A.T., Lahti, J.M., and Kidd, V.J. (2000). Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat. Med.* *6*, 529–535.
- Tekin, M., Öztürkmen Akay, H., Fitoz, S., Birnbaum, S., Cengiz, F., Sennaroğlu, L., İncesulu, A., Yüksel Konuk, E., Hasanefendioğlu Bayrak, A., Şentürk, S., *et al.* (2008). Homozygous FGF3 mutations result in congenital deafness with inner ear agenesis, microtia, and microdontia. *Clin. Genet.* *73*, 554–565.
- Terranova, C., Narla, S.T., Lee, Y.-W., Bard, J., Parikh, A., Stachowiak, E.K., Tzanakakis, E.S., Buck, M.J., Birkaya, B., and Stachowiak, M.K. (2015). Global Developmental Gene Programming Involves a Nuclear Form of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR1). *PLOS ONE* *10*, e0123380.
- Tham, K.-C., Kanaar, R., and Lebbink, J.H.G. (2016). Mismatch repair and homeologous recombination. *DNA Repair* *38*, 75–83.
- Thiele, C.J., Reynolds, C.P., and Israel, M.A. (1985). Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* *313*, 404–406.
- Thisse, B., and Thisse, C. (2005). Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol* *287*, 390–402.
- Thomas, K.A., Rios-Candelore, M., Giménez-Gallego, G., DiSalvo, J., Bennett, C., Rodkey, J., and Fitzpatrick, S. (1985). Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 6409–6413.
- Thomas-Mudge, R.J., Okada-Ban, M., Vandenbroucke, F., Vincent-Salomon, A., Girault, J.-M., Thiery, J.-P., and Jouanneau, J. (2004). Nuclear FGF-2 facilitates cell survival in vitro and during establishment of metastases. *Oncogene* *23*, 4771–4779.
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* *267*, 1456–1462.
- Thorns, V., Walter, G.F., and Licastro, F. (2002). Effects of IL6 and IL1beta on aFGF expression and excitotoxicity in NT2N cells. *J Neuroimmunol* *127*, 22–29.
- Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., and Zhao, J.J. (2014). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 7–24.
- Togari, A., Dickens, G., Kuzuya, H., and Guroff, G. (1985). The effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *J Neurosci* *5*, 307–316.
- Toledo, F., Krummel, K.A., Lee, C.J., Liu, C.-W., Rodewald, L.-W., Tang, M., and Wahl, G.M. (2006). A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network. *Cancer Cell* *9*, 273–285.
- Tomita, Y., Marchenko, N., Erster, S., Nemajero, A., Dehner, A., Klein, C., Pan, H., Kessler, H., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2006). WT p53, but Not Tumor-derived Mutants, Bind to Bcl2 via

- the DNA Binding Domain and Induce Mitochondrial Permeabilization. *J. Biol. Chem.* *281*, 8600–8606.
- Tomlinson, D., Baldo, O., Harnden, P., and Knowles, M. (2007). FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J. Pathol.* *213*, 91–98.
- Torii, S., Kusakabe, M., Yamamoto, T., Maekawa, M., and Nishida, E. (2004). Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev. Cell* *7*, 33–44.
- Torriglia, A., Leprêtre, C., Padrón-Barthe, L., Chahory, S., and Martin, E. (2008). Molecular mechanism of L-DNase II activation and function as a molecular switch in apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* *76*, 1490–1502.
- Trueb, B. (2011). Biology of FGFR1, the fifth fibroblast growth factor receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 951–964.
- Tsang, M., and Dawid, I.B. (2004). Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Sci STKE* *2004*, pe17.
- Tsujimoto, Y. (1989). Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene* *4*, 1331–1336.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* *226*, 1097–1099.
- Turner, N., and Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* *10*, 116–129.
- Tweddle, D.A., Malcolm, A.J., Cole, M., Pearson, A.D., and Lunec, J. (2001). p53 cellular localization and function in neuroblastoma: evidence for defective G1 arrest despite WAF1 induction in MYCN-amplified cells. *Am. J. Pathol.* *158*, 2067–2077.
- Tweddle, D.A., Pearson, A.D.J., Haber, M., Norris, M.D., Xue, C., Flemming, C., and Lunec, J. (2003). The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer Lett.* *197*, 93–98.
- Udayakumar, T.S., Stratton, M.S., Nagle, R.B., and Bowden, G.T. (2002). Fibroblast growth factor-1 induced promatrilysin expression through the activation of extracellular-regulated kinases and STAT3. *Neoplasia N. Y. N* *4*, 60–67.
- Ueba, T., Nosaka, T., Takahashi, J.A., Shibata, F., Florkiewicz, R.Z., Vogelstein, B., Oda, Y., Kikuchi, H., and Hatanaka, M. (1994). Transcriptional regulation of basic fibroblast growth factor gene by p53 in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *91*, 9009–9013.
- Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E., Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., Oren, M., and Haupt, Y. (1999). Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J.* *18*, 1805–1814.
- Untergasser, G., Steurer, M., Zimmermann, M., Hermann, M., Kern, J., Amberger, A., Gastl, G., and Gunsilius, E. (2007). The Dickkopf-homolog 3 is expressed in tumor endothelial cells and supports capillary formation. *Int. J. Cancer* *122*, 1539–1547.
- Urano, T., Oki, J., Ozawa, K., Miyakawa, K., Ueno, H., and Imamura, T. (1999). Distinct regulation of myoblast differentiation by intracellular and extracellular fibroblast growth factor-1. *Growth Factors Chur Switz.* *17*, 93–113.

- Valdes-Socin, H., Rubio Almanza, M., Tomá Fernáñez-Ladreda, M., Debray, F.G., Bours, V., and Beckers, A. (2014). Reproduction, Smell, and Neurodevelopmental Disorders: Genetic Defects in Different Hypogonadotropic Hypogonadal Syndromes. *Front. Endocrinol.* 5.
- Van den Berghe, L., Laurell, H., Huez, I., Zanibellato, C., Prats, H., and Bugler, B. (2000). FIF [fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-interacting-factor], a nuclear putatively antiapoptotic factor, interacts specifically with FGF-2. *Mol. Endocrinol.* 14, 1709–1724.
- Van Maerken, T., Rihani, A., Dreidax, D., De Clercq, S., Yigit, N., Marine, J.-C., Westermann, F., De Paepe, A., Vandesompele, J., and Speleman, F. (2011). Functional Analysis of the p53 Pathway in Neuroblastoma Cells Using the Small-Molecule MDM2 Antagonist Nutlin-3. *Mol. Cancer Ther.* 10, 983–993.
- Vara, J.Á.F., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* 30, 193–204.
- Vargas, M.R., Pehar, M., Cassina, P., Beckman, J.S., and Barbeito, L. (2006). Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis: Astrocytic GSH and motor neuron apoptosis. *J. Neurochem.* 97, 687–696.
- Veeck, J., and Dahl, E. (2012). Targeting the Wnt pathway in cancer: The emerging role of Dickkopf-3. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1825, 18–28.
- Vela, L., Gonzalo, O., Naval, J., and Marzo, I. (2013). Direct Interaction of Bax and Bak Proteins with Bcl-2 Homology Domain 3 (BH3)-only Proteins in Living Cells Revealed by Fluorescence Complementation. *J. Biol. Chem.* 288, 4935–4946.
- Vieira, A.V., Lamaze, C., and Schmid, S.L. (1996). Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 274, 2086–2089.
- Virdee, K., Bannister, A.J., Hunt, S.P., and Tolkovsky, A.M. (1997). Comparison Between the Timing of JNK activation, c-Jun Phosphorylation, and Onset of Death Commitment in Sympathetic Neurons. *J. Neurochem.* 69, 550–561.
- Visser, R., Landman, E.B.M., Goeman, J., Wit, J.M., and Karperien, M. (2012). Sotos Syndrome Is Associated with Dereglulation of the MAPK/ERK-Signaling Pathway. *PLoS ONE* 7, e49229.
- Wadgaonkar, R., and Collins, T. (1999). Murine double minute (MDM2) blocks p53-coactivator interaction, a new mechanism for inhibition of p53-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* 274, 13760–13767.
- Wagle, A., and Singh, J.P. (2000). Fibroblast growth factor protects nitric oxide-induced apoptosis in neuronal SHSY-5Y cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295, 889–895.
- Wagner, J.A., and D'Amore, P.A. (1986). Neurite outgrowth induced by an endothelial cell mitogen isolated from retina. *J. Cell Biol.* 103, 1363–1367.
- Walker, K.K., and Levine, A.J. (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 15335–15340.
- Wang, Y.-N., and Hung, M.-C. (2012). Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci.* 2, 1.
- Wang, J., Stockton, D.W., and Ittmann, M. (2004). The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression. *Clin. Cancer Res.* 10, 6169–6178.
- Wang, L., Yang, H.-J., Xia, Y.-Y., and Feng, Z.-W. (2010a). Insulin-like growth factor 1 protects human neuroblastoma cells SH-EP1 against MPP⁺-induced apoptosis by AKT/GSK-3 β /JNK signaling. *Apoptosis* 15, 1470–1479.

- Wang, L., Wang, X., Liang, Y., Diao, X., and Chen, Q. (2012a). S100A4 promotes invasion and angiogenesis in breast cancer MDA-MB-231 cells by upregulating matrix metalloproteinase-13. *Acta Biochim Pol* 59, 593–598.
- Wang, M.-J., Liu, S., Liu, Y., and Zheng, D. (2007). Actinomycin D enhances TRAIL-induced caspase-dependent and -independent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci. Res.* 59, 40–46.
- Wang, W.P., Lehtoma, K., Varban, M.L., Krishnan, I., and Chiu, I.M. (1989). Cloning of the gene coding for human class 1 heparin-binding growth factor and its expression in fetal tissues. *Mol Cell Biol* 9, 2387–2395.
- Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Jr, and Harris, C.C. (1999). GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3706–3711.
- Wang, Y.-N., Yamaguchi, H., Huo, L., Du, Y., Lee, H.-J., Lee, H.-H., Wang, H., Hsu, J.-M., and Hung, M.-C. (2010b). The Translocon Sec61 Localized in the Inner Nuclear Membrane Transports Membrane-embedded EGF Receptor to the Nucleus. *J. Biol. Chem.* 285, 38720–38729.
- Wang, Y.-N., Wang, H., Yamaguchi, H., Lee, H.-J., Lee, H.-H., and Hung, M.-C. (2010c). COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 498–504.
- Wang, Y.-N., Lee, H.-H., Lee, H.-J., Du, Y., Yamaguchi, H., and Hung, M.-C. (2012b). Membrane-bound Trafficking Regulates Nuclear Transport of Integral Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and ErbB-2. *J. Biol. Chem.* 287, 16869–16879.
- Warsito, D., Sjöström, S., Andersson, S., Larsson, O., and Sehat, B. (2012). Nuclear IGF1R is a transcriptional co-activator of LEF1/TCF. *EMBO Rep.* 13, 244–250.
- Wei, C.-L., Wu, Q., Vega, V.B., Chiu, K.P., Ng, P., Zhang, T., Shahab, A., Yong, H.C., Fu, Y., Weng, Z., *et al.* (2006). A Global Map of p53 Transcription-Factor Binding Sites in the Human Genome. *Cell* 124, 207–219.
- Wei, M.C., Zong, W.-X., Cheng, E.H.-Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727–730.
- Weiss, W.A., Aldape, K., Mohapatra, G., Feuerstein, B.G., and Bishop, J.M. (1997). Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J.* 16, 2985–2995.
- Wesche, J., Malecki, J., Wiedlocha, A., Ehsani, M., Marcinkowska, E., Nilsen, T., and Olsnes, S. (2005). Two nuclear localization signals required for transport from the cytosol to the nucleus of externally added FGF-1 translocated into cells. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 6071–6080.
- Wesche, J., Malecki, J., Wiedlocha, A., Skjerpen, C.S., Claus, P., and Olsnes, S. (2006). FGF-1 and FGF-2 require the cytosolic chaperone Hsp90 for translocation into the cytosol and the cell nucleus. *J Biol Chem* 281, 11405–11412.
- Wesche, J., Haglund, K., and Haugsten, E.M. (2011). Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J* 437, 199–213.
- Westermark, U.K., Wilhelm, M., Frenzel, A., and Henriksson, M.A. (2011). The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma. *Semin. Cancer Biol.* 21, 256–266.
- Westhoff, M.-A., Karpel-Massler, G., Brühl, O., Enzenmüller, S., La Ferla-Brühl, K., Siegelin, M.D., Nonnenmacher, L., and Debatin, K.-M. (2014). A critical evaluation of PI3K inhibition in Glioblastoma and Neuroblastoma therapy. *Mol. Cell. Ther.* 2, 1.

- Weylie, B., Zhu, J., Singh, U., Ambrus, S., and Forough, R. (2005). Phosphatidylinositide 3-Kinase Is Important in Late-Stage Fibroblast Growth Factor-1-Mediated Angiogenesis in vivo. *J. Vasc. Res.* *43*, 61–69.
- White, E. (2016). Autophagy and p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *6*, a026120.
- White, P.S., Thompson, P.M., Gotoh, T., Okawa, E.R., Igarashi, J., Kok, M., Winter, C., Gregory, S.G., Hogarty, M.D., Maris, J.M., *et al.* (2005). Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene* *24*, 2684–2694.
- Widmann, C., Gerwins, P., Johnson, N.L., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1998). MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 2416–2429.
- Wiedemann, M., and Trueb, B. (2000). Characterization of a Novel Protein (FGFRL1) from Human Cartilage Related to FGF Receptors. *Genomics* *69*, 275–279.
- Wiedlocha, A., Falnes, P.O., Madshus, I.H., Sandvig, K., and Olsnes, S. (1994). Dual mode of signal transduction by externally added acidic fibroblast growth factor. *Cell* *76*, 1039–1051.
- Wiedlocha, A., Falnes, P.O., Rapak, A., Klingenberg, O., Muñoz, R., and Olsnes, S. (1995). Translocation of cytosol of exogenous, CAAX-tagged acidic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* *270*, 30680–30685.
- Wiedlocha, A., Falnes, P.O., Rapak, A., Munoz, R., Klingenberg, O., and Olsnes, S. (1996). Stimulation of proliferation of a human osteosarcoma cell line by exogenous acidic fibroblast growth factor requires both activation of receptor tyrosine kinase and growth factor internalization. *Mol Cell Biol* *16*, 270–280.
- Wiedlocha, A., Nilsen, T., Wesche, J., Sorensen, V., Malecki, J., Marcinkowska, E., and Olsnes, S. (2005). Phosphorylation-regulated nucleocytoplasmic trafficking of internalized fibroblast growth factor-1. *Mol Biol Cell* *16*, 794–810.
- Willardsen, M., Hutcheson, D.A., Moore, K.B., and Vetter, M.L. (2014). The ETS transcription factor Etv1 mediates FGF signaling to initiate proneural gene expression during *Xenopus laevis* retinal development. *Mech. Dev.* *131*, 57–67.
- Willis, N.D., Cox, T.R., Rahman-Casañs, S.F., Smits, K., Przyborski, S.A., van den Brandt, P., van Engeland, M., Weijnenberg, M., Wilson, R.G., de Bruine, A., *et al.* (2008). Lamin A/C Is a Risk Biomarker in Colorectal Cancer. *PLoS ONE* *3*, e2988.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., *et al.* (2007). Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak. *Science* *315*, 856–859.
- Wolter, J., Angelini, P., and Irwin, M. (2010). p53 family: therapeutic targets in neuroblastoma. *Future Oncol.* *6*, 429–444.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* *139*, 1281–1292.
- Wong, A., Lamothe, B., Lee, A., Schlessinger, J., Lax, I., and Li, A. (2002). FRS2 alpha attenuates FGF receptor signaling by Grb2-mediated recruitment of the ubiquitin ligase Cbl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 6684–6689.
- Wong, Y.-C., Wang, X., and Ling, M.-T. (2004). Id-1 expression and cell survival. *Apoptosis* *9*, 279–289.
- Wu, Q.-F., Yang, L., Li, S., Wang, Q., Yuan, X.-B., Gao, X., Bao, L., and Zhang, X. (2012). Fibroblast Growth Factor 13 Is a Microtubule-Stabilizing Protein Regulating Neuronal Polarization and Migration. *Cell* *149*, 1549–1564.

- Wu, S., Wu, X., Zhu, W., Cai, W.J., Schaper, J., and Schaper, W. (2010). Immunohistochemical study of the growth factors, aFGF, bFGF, PDGF-AB, VEGF-A and its receptor (Flk-1) during arteriogenesis. *Mol Cell Biochem* 343, 223–229.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., and Levine, A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7, 1126–1132.
- Wu, Y., Mehew, J.W., Heckman, C.A., Arcinas, M., and Boxer, L.M. (2001). Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 20.
- Xia, W., Wei, Y., Du, Y., Liu, J., Chang, B., Yu, Y.-L., Huo, L.-F., Miller, S., and Hung, M.-C. (2009). Nuclear expression of epidermal growth factor receptor is a novel prognostic value in patients with ovarian cancer. *Mol. Carcinog.* 48, 610–617.
- Xiao, M., Bosch, M.K., Nerbonne, J.M., and Ornitz, D.M. (2013). FGF14 localization and organization of the axon initial segment. *Mol. Cell. Neurosci.* 56, 393–403.
- Xu, K., Chong, D.C., Rankin, S.A., Zorn, A.M., and Cleaver, O. (2009). Rasip1 is required for endothelial cell motility, angiogenesis and vessel formation. *Dev. Biol.* 329, 269–279.
- Yakovlev, A.G., Di Giovanni, S., Wang, G., Liu, W., Stoica, B., and Faden, A.I. (2004). BOK and NOXA Are Essential Mediators of p53-dependent Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 28367–28374.
- Yamada, K., Miyamoto, Y., Tsujii, A., Moriyama, T., Ikuno, Y., Shiromizu, T., Serada, S., Fujimoto, M., Tomonaga, T., Naka, T., *et al.* (2016). Cell surface localization of importin α 1/KPNA2 affects cancer cell proliferation by regulating FGF1 signalling. *Sci. Rep.* 6, 21410.
- Yamanaka, Y., Friess, H., Buchler, M., Beger, H.G., Uchida, E., Onda, M., Kobrin, M.S., and Korc, M. (1993). Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res* 53, 5289–5296.
- Yan, G.Z., and Ziff, E.B. (1995). NGF regulates the PC12 cell cycle machinery through specific inhibition of the Cdk kinases and induction of cyclin D1. *J. Neurosci.* 15, 6200–6212.
- Yang, C., Kaushal, V., Haun, R.S., Seth, R., Shah, S.V., and Kaushal, G.P. (2008). Transcriptional activation of caspase-6 and-7 genes by cisplatin-induced p53 and its functional significance in cisplatin nephrotoxicity. *Cell Death Differ.* 15, 530–544.
- Yang, X., Webster, J.B., Kovalenko, D., Nadeau, R.J., Zubanova, O., Chen, P.-Y., and Friesel, R. (2006). Sprouty genes are expressed in osteoblasts and inhibit fibroblast growth factor-mediated osteoblast responses. *Calcif. Tissue Int.* 78, 233–240.
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J.P., Weissman, A.M., and Ashwell, J.D. (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 288, 874–877.
- Yankner, B.A., Benowitz, L.I., Villa-Komaroff, L., and Neve, R.L. (1990). Transfection of PC12 cells with the human GAP-43 gene: effects on neurite outgrowth and regeneration. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 7, 39–44.
- Yoshida, K., and Gage, F.H. (1992). Cooperative regulation of nerve growth factor synthesis and secretion in fibroblasts and astrocytes by fibroblast growth factor and other cytokines. *Brain Res.* 569, 14–25.
- Yoshimura, N., Sano, H., Hashiramoto, A., Yamada, R., Nakajima, H., Kondo, M., and Oka, T. (1998). The expression and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in human breast cancer. *Clin Immunol Immunopathol* 89, 28–34.

- Yoshioka, S., King, M.L., Ran, S., Okuda, H., MacLean, J.A., McAsey, M.E., Sugino, N., Brard, L., Watabe, K., and Hayashi, K. (2012). WNT7A Regulates Tumor Growth and Progression in Ovarian Cancer through the WNT/ -Catenin Pathway. *Mol. Cancer Res.* *10*, 469–482.
- Yu, H., and Jove, R. (2004). The STATs of cancer — new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 97–105.
- Yu, X., and White, K.E. (2005). FGF23 and disorders of phosphate homeostasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* *16*, 221–232.
- Yu, J., Baron, V., Mercola, D., Mustelin, T., and Adamson, E.D. (2007). A network of p73, p53 and Egr1 is required for efficient apoptosis in tumor cells. *Cell Death Differ.* *14*, 436–446.
- Yuan, T.L., and Cantley, L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* *27*, 5497–5510.
- Zaharieva, B.M., Simon, R., Diener, P.-A., Ackermann, D., Maurer, R., Alund, G., Knönagel, H., Rist, M., Wilber, K., Hering, F., *et al.* (2003). High-throughput tissue microarray analysis of 11q13 gene amplification (CCND1, FGF3, FGF4, EMS1) in urinary bladder cancer: 11q13 amplification in bladder cancer. *J. Pathol.* *201*, 603–608.
- Zakrzewska, M., Sorensen, V., Jin, Y., Wiedlocha, A., and Olsnes, S. (2011). Translocation of exogenous FGF1 into cytosol and nucleus is a periodic event independent of receptor kinase activity. *Exp Cell Res* *317*, 1005–1015.
- Zenzmaier, C., Untergasser, G., Hermann, M., Dirnhofer, S., Sampson, N., and Berger, P. (2008). Dysregulation of Dkk-3 expression in benign and malignant prostatic tissue. *The Prostate* *68*, 540–547.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X L. *Cell* *87*, 619–628.
- Zhan, Q., Antinore, M.J., Wang, X.W., Carrier, F., Smith, M.L., Harris, C.C., and Fornace Jr, A.J. (1999). Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* *18*, 2892–2900.
- Zhan, X., Hu, X., Friesel, R., and Maciag, T. (1993). Long term growth factor exposure and differential tyrosine phosphorylation are required for DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells. *J Biol Chem* *268*, 9611–9620.
- Zhang, Y. (2001). A p53 Amino-Terminal Nuclear Export Signal Inhibited by DNA Damage-Induced Phosphorylation. *Science* *292*, 1910–1915.
- Zhang, L., Kharbanda, S., McLeskey, S.W., and Kern, F.G. (1999). Overexpression of fibroblast growth factor 1 in MCF-7 breast cancer cells facilitates tumor cell dissemination but does not support the development of macrometastases in the lungs or lymph nodes. *Cancer Res* *59*, 5023–5029.
- Zhang, X., Ibrahimi, O.A., Olsen, S.K., Umemori, H., Mohammadi, M., and Ornitz, D.M. (2006). Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family: THE COMPLETE MAMMALIAN FGF FAMILY. *J. Biol. Chem.* *281*, 15694–15700.
- Zhang, Y., Moheban, D.B., Conway, B.R., Bhattacharyya, A., and Segal, R.A. (2000). Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J. Neurosci.* *20*, 5671–5678.
- Zhen, Y., Sørensen, V., Skjerpen, C.S., Haugsten, E.M., Jin, Y., Wälchli, S., Olsnes, S., and Wiedlocha, A. (2012). Nuclear Import of Exogenous FGF1 Requires the ER-Protein LRRC59 and the Importins Kpn α 1 and Kpn β 1: Nuclear Import of FGF1 Requires LRRC59. *Traffic* *13*, 650–664.

- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., and Hung, M.C. (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 3, 973–982.
- Zhu, X., Komiya, H., Chirino, A., Faham, S., Fox, G.M., Arakawa, T., Hsu, B.T., and Rees, D.C. (1991). Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science* 251, 90–93.
- Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R., and Thompson, C.B. (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* 15, 1481–1486.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405–413.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). An APAF-1 - cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274, 11549–11556.

Annexes

I Matériels et méthodes

1 - Fractionnement cellulaire

Les cellules sont trypsinées et comptées sur cellules de Malassez pour obtenir $10 \cdot 10^6$ cellules pour chaque fractionnement cellulaire, toutes les manipulations sont effectuées sur glace. Après une centrifugation de 5 minutes à 900 rpm, les culots sont resuspendus dans 400 μ L de tampon de lyse. Après une incubation de 5 minutes dans la glace, 50 μ L sont prélevés de chaque tube, ce sont les extraits totaux. Une nouvelle centrifugation est effectuée à 4°C pendant 15 minutes à 3 000 g. 200 μ L de surnageant sont prélevés, ce sont les extraits cytosoliques. Le reste du surnageant est éliminé et 150 μ L de tampon de lyse des noyaux sont ajoutés, les tubes sont vortexés puis centrifugés à 4°C pendant 5 minutes à 14 000 rpm. Le surnageant est récupéré, c'est l'extrait nucléaire. Les différents extraits protéiques sont ensuite dosés par la méthode de Bradford, puis dénaturés et séparés par électrophorèse (SDS-PAGE, Western-Blot).

Tampon de lyse des cellules	Tampon de lyse des noyaux
MgCl ₂ 1mM	NaCl 3M
CaCl ₂ 1mM	EDTA 10mM
NP40 5%	NP40 5%
Sucrose 0,3M	H ₂ O
PBS 1X	

2 - RNA-Seq

Les cellules issues de deux clones cellulaires PC12 soit surexprimant le FGF1WT sous le contrôle d'un promoteur inductible à la dexaméthasone soit transfecté par un vecteur vide (contrôle) ont été traitées pendant 48h à la dexaméthasone afin d'induire l'expression du FGF1. Elles ont ensuite été traitées ou non à l'étoposide pendant 8h afin d'induire l'apoptose dépendante de p53. L'expérience a été réalisée en duplicat pour chacune de ces quatre conditions. Les ARN ont été extraits à l'aide du kit RNA NucleoSpin (Macherey-Nagel) d'après le protocole du fournisseur, puis envoyés à la plateforme de séquençage ImaGif. Leur qualité a été vérifiée, puis les ARNm polyA+ ont été purifiés. Les ARNm ont ensuite été séquencés sur un séquenceur Illumina HiSeq en Single Read 50 nt. Les analyses bioinformatiques ont été réalisées par la plateforme en utilisant les logiciels suivants : Cutadapt et FastQC pour l'étape de « trimming » (retirer les séquences des adaptateurs utilisés lors des constructions de bibliothèques), TopHat2 pour le « mapping » (positionnement des reads sur le

génomique) et IGV pour visualiser la répartition des reads sur le génome. Le comptage des séquences lues (« reads ») a été réalisé via HTSeq-Count, et l'analyse différentielle des quatre conditions par le package R DESeq2. Huit analyses différentielles ont été réalisées par la plateforme entre les quatre conditions de notre expérience. Les résultats sont exprimés en fold-change (FC) et les variations sont considérées comme significatives lorsque la valeur de la p-value ajustée P est inférieure à 0,01.

3 - Analyse de l'expression de gènes par RT-PCR

3.1 - Traitement des cellules et extraction des ARNm

Les cellules contrôle PC12 non transfectées (« PC12 »), ou transfectées par un vecteur vide (« Contrôle »), ou surexprimant le FGF1^{WT} ou une forme taggée V5/His (« FGF1^{WT-V5/His} ») sous le contrôle d'un promoteur inductible à la dexaméthasone ont été pré-traitées à la dexaméthasone pendant 48h puis traitées ou non par de l'étoposide pendant 4, 8 ou 16h. Les ARNm ont été extraits à l'aide du kit RNA NucleoSpin (Macherey-Nagel) d'après le protocole du fournisseur.

3.2 - Rétro-transcription et amplification par PCR

Les ARNm ont été extraits de cellules PC12 transfectées ou non par un vecteur d'expression du FGF1, traitées à l'étoposide (inducteur de p53) pendant 0, 4, 8 ou 16 heures. Une dilution des échantillons est effectuée afin d'avoir une concentration de transcrits égale à 500 ng/3µL.

Les niveaux de transcrits des différents échantillons ont été analysés par RT-PCR en utilisant les couples d'amorces présentés dans le tableau suivant. Les ARNs ont été rétro-transcrits en présence de la reverse transcriptase (RTase) dans le tampon approprié pendant 1h30 à 42°C. Une courte dénaturation de 3 minutes à 96°C est effectuée afin d'inactiver la RTase. La Taq-Polymérase Fisher a été utilisée dans le tampon approprié pour amplifier les fragments spécifiques des transcrits étudiés selon le protocole décrit précédemment dans (Renaud *et al.*, 1994). Pour chaque couple d'amorces utilisé, trois cycles différents d'amplification ont été effectués dans un premier temps (25, 30 et 35 cycles), puis le nombre de cycles a été ajusté en fonction de la concentration des différents ARNs étudiés. Pour l'amplification par PCR, une dénaturation des rétro-transcrits est effectuée à 96°C pendant 3 minutes, puis N cycles d'amplification PCR sont réalisés comprenant une dénaturation à 96°C pendant 30 secondes, une hybridation à 60°C pendant 30 secondes (sauf pour la RT-PCR des ARNr 18S, à 62°C), et une élongation à 72°C pendant 30 secondes. Les fragments amplifiés sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide 8%. Après coloration au BET, les fragments d'amplification sont révélés par UV (Syngene).

Tampon de rétrotranscription : RT		Tampon d'amplification : PCR		Gel acrylamide 8%	
TrisHCl	50 mM	TrisHCl	20 mM	TBE : Tris, Acide Borique, EDTA	0,5X
KCl	75 mM	KCl	50 mM	Acrylamide 40%	8%
MgCl ₂	3 mM	MgCl ₂	1,5 mM	2% bis Acrylamide	0,4%
Random Primer	100 ng/μL	dNTP	0,25 mM	APS 10%	0,075%
BSA	0,04 μg/μL	Oligo FOR	1 ng/μL	TEMED	1/1000
dNTP	1 mM	Oligo REV	1 ng/μL		
RNAsin	1,33 U/μL	Taq polymérase	0,05 U/μL		
RTase M-MLV	13,3 U/μL				

Gène	Amorce FOR (5'-3')	Amorce REV (5'-3')
<i>Jak1</i>	ACAGAATGGCTGTACGGTC	AGCACGTACATCCCCCTCCTC
<i>Anxa1</i>	TTGAGAAGTGCCTCACAACCA	AATTTCCGAACGGGAGACCAT
<i>Id1</i>	AAGTGGTGCTTGGTCTGTCG	CTCCTTGAGGCGTGAGTAGC
<i>Gap43</i>	AGGAGCCTAAACAAGCCGATG	GTCGGGCACTTTCCTTAGGTT
<i>Nf160</i>	ATGGCTCGTCATTTGCGAGA	ATCTGGTCTCTTACCCTCCA
<i>Etv1</i>	GTCAGCGTGGGAGAACTGTA	GTCTGGCACAAACTGCTCATC
<i>c-Jun</i>	GCCACCGAGACCGTAAAGAA	TAGCACTCGCCCAACTTCAG
<i>Fos</i>	ACTACGAGGCGTCATCCTCC	GTTGGCACTAGAGACGGACA
<i>Rasip1</i>	CGAGCCGTCCAAATCAGAAC	GGGGTAGTCAGTCCGTAAGC
<i>S100a4</i>	TCAGCACTTCTCTCTTGGT	GCCTGAGTATTTGTGGAAGGTG
<i>S100a6</i>	TTCATTGTGACGTGTGCTTC	CTCAGGGTGTGCTTGTACC
<i>Serpine1</i>	TGAGCGACACGCAACAAGAG	TGGGCTGTATGGGACTCTGGAA
<i>Dkk3</i>	GATGTTCCGAGAGGTAGAGGAG	CGTGTTGGTCTCGTTGTGGT

3.3 - Quantification et tests statistiques

La quantification des produits de PCR a été réalisée *via* le logiciel ImageQuant TL 8.1 (GE Healthcare). Les graphes représentent le ratio ARNm du transcrit étudié rapporté au niveau de l'ARNr 18S en unités arbitraires (UA). Le ratio de la condition contrôle sans étoposide est arbitrairement fixé à 1. Les histogrammes représentent le résultat d'une expérience, ou la moyenne de trois expériences indépendantes, les barres d'erreur figurant la SEM. Les *P*-values sont issues de *T*-tests de Student bilatéraux avec ns : $p > 0,05$; * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$. Elles se rapportent à la comparaison entre la condition annotée et le témoin non traité et non transfecté (PC12) ou transfecté par un vecteur vide (Contrôle), sauf lorsque c'est indiqué.

Titre : Étude de la voie d'action intracrine et nucléaire du FGF1 dans des cellules de type neuronal

Mots-clés : FGF1, p53, apoptose, neuroblastome, intracrine, voie d'action nucléaire

Résumé : Le FGF1 est un facteur de croissance non sécrété, localisé dans le cytosol et le noyau. Il induit la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires. Il est également impliqué dans la progression tumorale et peut conférer une chimiorésistance aux tumeurs qui le surexpriment.

Notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années aux activités intracrines du FGF1 en tant que régulateur de la différenciation et de la survie cellulaires. L'équipe a ainsi montré que le FGF1 intracellulaire a une activité anti-apoptotique dans plusieurs modèles cellulaires : cellules REtsAF (fibroblastes de rat), PC12 (phéochromocytome de rat), SH-SY5Y (neuroblastome humain) suite à l'induction de l'apoptose dépendante de p53 *via* un stress génotoxique. Dans les cellules PC12, un modèle d'étude de la différenciation neuronale, le FGF1

possède également une activité neurotrophique.

À l'aide de différentes formes mutantes du FGF1, nous avons cherché à mieux caractériser les mécanismes régulant son activité anti-apoptotique dans les cellules PC12 et SH-SY5Y, ainsi que son activité neurotrophique dans les cellules PC12. Nous avons pu montrer que le domaine C-terminal du FGF1 ainsi que ses modifications post-traductionnelles sont importants pour la régulation de ses activités intracellulaires ; et que la phosphorylation du FGF1 inhibe son activité anti-apoptotique dans les cellules PC12 et SH-SY5Y mais ne régule pas son activité de différenciation dans les cellules PC12.

Nos résultats montrent donc pour la première fois le rôle de la phosphorylation dans la régulation des activités du FGF1 et ce dans deux modèles cellulaires de rat et humain.

Title: Study of the intracrine and nuclear pathway of FGF1 in neuronal cells

Keywords: FGF1, p53, apoptosis, neuroblastoma, intracrine, nuclear pathway

Abstract: FGF1 is a non-secreted cytosolic and nuclear growth factor, inducing cell proliferation, differentiation and survival. FGF1 is also involved in tumor progression and can induce chemoresistance in FGF1 overexpressing tumors.

Our team has focused for several years on the FGF1 intracrine neurotrophic and survival activities. The team has shown that intracellular FGF1 is an anti-apoptotic factor in several cell lines : REtsAF (rat fibroblasts), PC12 (derived from a rat pheochromocytoma) and SH-SY5Y cells (derived from a human neuroblastoma) following the induction of p53-dependent apoptosis *via* a genotoxic stress. In PC12 cells, a model of neuronal differentiation, FGF1 is also a neurotrophic factor.

We aimed to better characterize the mechanisms regulating the anti-apoptotic activity of FGF1 by expressing various mutant forms of FGF1 in PC12 and SH-SY5Y cell lines. We have shown that FGF1 C-terminal domain and its post-translational modifications are important for the regulation of its intracellular activities ; and that FGF1 phosphorylation inhibits its anti-apoptotic activities in both PC12 and SH-SY5Y cell lines, but does not affect its differentiation activity in PC12 cells.

Thus, our results showed for the first time the crucial role of FGF1 phosphorylation in the regulation of its intracrine anti-apoptotic activity in both rat and human cellular models.

